

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŽIGA REGNER

**MAGISTRSKA NALOGA**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Univerza v Ljubljani  
Fakulteta za farmacijo



ŽIGA REGNER

**UPORABA BIOIZOSTEROV D-GLUTAMINSKE KISLINE PRI  
NAČRTOVANJU IN SINTEZI RIGIDIZIRANIH ANALOGOV  
TRIPEPTIDA Gly-L-Val-D-Glu**

**USING D-GLUTAMIC ACID BIOISOSTERES IN THE DESIGN AND  
SYNTHESIS OF RIGIDIZED TRIPePTIDE Gly-L-Val-D-Glu  
ANALOGS**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2017

Diplomsko naložbo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Žige Jakopina, mag. farm. Spektroskopske meritve in ostale analize so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo in na Inštitutu Jožef Stefan. Biološko vrednotenje končnih spojin je opravila doc. dr. Martina Gobec, mag. farm. na Fakulteti za farmacijo.

### **Zahvala**

Iskreno se zahvaljujem izr. prof. dr. Žigi Jakopinu za odlično mentorstvo, zelo pozitivno naravnano delovno okolje in vso strokovno pomoč pri izvedbi laboratorijskega dela.

Rad bi se zahvalil tudi svoji družini in vsem bližnjim prijateljem, ki so me vedno podpirali ter verjeli vame.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko naložbo izdelal samostojno pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Žige Jakopina, mag. farm.

Žiga Regner

Predsednik magistrske komisije: prof. dr. Joško Osredkar, mag. farm.

Član magistrske komisije: doc. dr. Jurij Trontelj, mag. farm.

# VSEBINA

<b>VSEBINA .....</b>	<b>II</b>
<b>POVZETEK.....</b>	<b>IV</b>
<b>KLJUČNE BESEDE .....</b>	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>V</b>
<b>KEYWORDS .....</b>	<b>V</b>
<b>SEZNAM OKRAJSAV.....</b>	<b>VI</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 IMUNSKI SISTEM.....	1
1.2 PRIROJENA IMUNOST .....	2
1.3 PRIDOBILJENA IMUNOST.....	4
1.4 PRR .....	6
1.4.1 RLR .....	6
1.4.2 TLR .....	7
1.4.3 NLR.....	8
1.4.3.1 Receptorji NOD2.....	10
1.5 NAČRTOVANJE, OPTIMIZACIJA IN UPORABNOST AGONISTOV NOD2 KOT ADJUVANSOV .....	11
1.6 STRATEGIJE OPTIMIZACIJE .....	13
1.6.1 Derivatizacija MDP .....	15
<b>2 NAMEN DELA.....</b>	<b>17</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>19</b>
<b>4 EKSPERIMENTALNI DEL .....</b>	<b>22</b>
4.1 REAKCIJSKA SHEMA 1 .....	22
4.1.1 SINTEZA ETIL (E)-(3-(4-HIDROKSI-3-METOKSIFENIL)AKRILOIL)GLICINATA (1).....	22
4.1.2 SINTEZA (E)-(3-(4-HIDROKSI-3-METOKSIFENIL)AKRILOIL) GLICINA (2) .....	23
4.1.3 SINTEZA (S)-1-ETOKSI-3-METIL-1-OKSOBUTAN-2-AMINIJEVEGA KLORIDA (3) .....	24
4.1.4 SINTEZA ETIL (E)-(3-(4-HIDROKSI-3-METOKSIFENIL) AKRILOIL)GLICIL-L-VALINATA (4)	
.....	25
4.1.5 SINTEZA (E)-(3-(4-HIDROKSI-3-METOKSIFENIL)AKRILOIL) GLICIL-L-VALINA (5).....	26
4.1.6 SINTEZA ETIL (1S,2S)-2-((S)-2-(2-((E)-3-(4-HIDROKSI-3-METOKSIFENIL)AKRILAMIDO)ACETAMIDO)-3-METILBUTANAMIDO)CIKLOHEKSAN-1-KARBOKSILATA (6a) .	27
4.1.7 SINTEZA ETIL (1R,2S)-2-((S)-2-(2-((E)-3-(4-HIDROKSI-3-METOKSIFENIL)AKRILAMIDO)ACETAMIDO)-3-METILBUTANAMIDO)CIKLOHEKSAN-1-KARBOKSILATA (6b) .....	29
4.1.8 SINTEZA ETIL (E)-1-((E)-(3-(4-HIDROKSI-3-METOKSIFENIL) AKRILOIL)GLICIL-L-VALIL)PIPERIDIN-4-KARBOKSILATA (6c) .....	31
4.2 REAKCIJSKA SHEMA 2 .....	33
4.2.1 SINTEZA BOC-L-VALINA (7).....	33
4.2.2 SINTEZA ETIL 2-AMINO-5-HIDROKSIBENZOATA (8).....	34
4.2.3 SINTEZA DIMETIL (S)-5-(2-((TERC-BUTOXIKARBONIL) AMINO)-3-METILBUTANAMIDO)IZOFTALATA (9).....	35
4.2.4 SINTEZA ETIL (S)-2-(2-((TERC-BUTOXIKARBONIL) AMINO)-3-METILBUTANAMIDO)-5-HIDROKSIBENZOATA (10).....	36
4.2.5 SINTEZA DIMETIL (S,E)-5-(2-(2-(3-(4-HIDROKSI-3-METOKSIFENIL)AKRILAMIDO)ACETAMIDO)-3-METILBUTANAMIDO)IZOFTALATA (11).....	37

4.2.6 SINTEZA ETIL (S,E)-5-HIDROKSI-2-(2-(2-(3-(4-HIDROKSI-3-METOKSIFENIL)AKRILAMIDO)ACETAMIDO)-3-METILBUTANAMIDO) BENZOATA (12).....	39
4.2.7 POSKUS SINTEZE DIMETIL (S)-2-(2-((TERC-BUTOXIKARBONIL)AMINO)-3-METILBUTANAMIDO) TEREFTALATA .....	41
4.2.8 SINTEZA DIMETIL (S)-2-(2-(((9H-FLUOREN-9-IL)METOKSI)KARBONIL)AMINO)-3-METILBUTANAMIDO) TEREFTALATA (13).....	42
4.2.9 SINTEZA DIMETIL (S)-2-(2-AMINO-3-METILBUTANAMIDO) TEREFTALATA (14).....	44
4.2.10 SINTEZA DIMETIL (S,E)-2-(2-(2-(3-(4-HIDROKSI-3-METOKSIFENIL)AKRILAMIDO)ACETAMIDO)-3-METILBUTANAMIDO) TEREFTALATA (15).....	45
4.2.11 POSKUS SINTEZE DIMETIL (S)-4-(2-(((9H-FLUOREN-9-IL)METOKSI)KARBONIL)AMINO)-3-METILBUTANAMIDO) IZOFITALATA .....	47
<b>5 REZULTATI IN RAZPRAVA.....</b>	<b>48</b>
5.1 UPORABA KLORIRNIH REAGENTOV PRI SINTEZI ETILNIH ESTROV (SINTEZA SPOJIN 3 IN 8) IN SINTEZI PEPTIDNE VEZI PREKO TVORBE KISLINSKEGA KLORIDA (SINTEZA SPOJINE 13) .....	48
5.1.1 <i>Tvorba kislinskega klorida in esterifikacija.....</i>	48
5.1.2 <i>Tvorba kislinskega klorida z uporabo oksalil klorida in sinteza peptidne vezи.....</i>	49
5.2 ALKALNA HIDROLIZA ETILNEGA ESTRA (SINTEZA SPOJIN 2 IN 5).....	50
5.3 UVEDBA IN ODSTRANITEV TERC-BUTIL KARBAMATNE ZAŠČITE .....	51
5.4 ZAŠČITNA SKUPINA FMOC – UPORABA, ODSTRANITEV (SINTEZA SPOJINE 14) .....	53
5.5 TVORBA PEPTIDNE VEZI Z UPORABO EDC, HOBT, DMAP (SINTEZA SPOJIN 1, 4, 6A, 6B, 6C, 9, 10, 15) .....	54
5.6 SINTEZA PEPTIDNE VEZI PREK TVORBE SIMETRIČNEGA ANHIDRIDA Z UPORABO EDC (SINTEZA SPOJINE 10).....	58
5.8 NEUSPEŠNI POSKUSI SKLAPLJANJA .....	59
5.9 BIOLOŠKO VREDNOTENJE SPOJIN .....	60
<b>6 SKLEPI .....</b>	<b>64</b>
<b>7 LITERATURA .....</b>	<b>65</b>

## **POVZETEK**

Receptorje NOD2 uvrščamo med znotrajcelične receptorje za prepoznavo vzorcev, ki zaznavajo produkt delne razgradnje peptidoglikana – muramil dipeptid (MDP, N-AcMur-L-Ala-D-Glu), ki je prisoten tako pri Gram pozitivnih kot pri Gram negativnih bakterijah ter je minimalni strukturni fragment z imunoadjuvantno aktivnostjo. Zaradi svoje vloge v signaliziranju med prirojenim in pridobljenim imunskim odzivom predstavljajo NOD2 receptorji potencialno novo tarčo pri iskanju nove generacije imunomodulatorjev, uporabnih kot adjuvansov v cepivih.

V magistrski nalogi smo načrtovali in sintetizirali potencialne agoniste receptorjev NOD2, izhajali pa smo iz predhodnih raziskav, v katerih so identificirali najbolj optimalen glikomimetik sladkornega dela molekule MDP. Rezultati so pokazali največjo NOD2 agonistično aktivnost dezmuramilpeptida s *trans*-feruloilglicinskim glikomimetikom. Ta spojina je predstavljala našo spojino vodnico, ki smo jo skušali optimizirati z vgraditvijo bioizosterov terminalne amino kisline (D-glutaminske kisline) v strukturno rigidizirane analoge tripeptida Gly-L-Val-D-Glu. NOD2 agonistično aktivnost sintetiziranih končnih spojin smo dali določiti na NOD2-specifičnih celicah HEK-Blue<sup>TM</sup> hNOD2, a rezultati niso pokazali nikakršne aktivnosti na tarčne receptorje. Zatorej smo sklepali, da je nespremenjena struktura D-glutaminske kisline na končnem mestu spojine nujno potrebna za vezavo na receptor in indukcijo NOD2 agonističnega delovanja.

## **KLJUČNE BESEDE**

Receptor NOD2, muramil dipeptid, adjuvans, dezmuramilpeptidi, D-glutaminska kislina, bioizosterija, rigidizacija

## **ABSTRACT**

NOD2 receptors are classified as intracellular pattern recognition receptors that detect the product of partial degradation of peptidoglycan – muramyl dipeptide (MDP, N-AcMur-L-Ala-D-Glu) – which is present in Gram positive as well as in Gram negative bacteria. It is the minimal structural motif with immunoadjuvant activity. Due to their role in signaling between innate and acquired immune response, NOD2 receptors represent a potential new target in the search for a new generation of immunomodulators, used as adjuvants in vaccines.

In the course of this Master's thesis we designed and synthesized potential NOD2 receptor agonists and our work based on the results of previously conducted research work in which the most suitable glycomimetic of the carbohydrate moiety of MDP was identified. Results showed that the desmuramylpeptide incorporating a *trans*-feruloylglycine glycomimetic possessed the strongest NOD2 agonistic activity, therefore it represented our lead compound. We then tried to optimize its activity by incorporating D-glutamic acid bioisosteres into the parent structure affording structurally rigidized analogs of Gly-L-Val-D-Glu tripeptide. Subsequently, the synthesized end compounds were screened for their NOD2 agonistic effect using NOD2-specific cells HEK-Blue<sup>TM</sup> hNOD2. Unfortunately, the obtained results revealed none of the synthesized compounds exerted any activity on target receptors. We therefore concluded that the modifications of D-glutamic acid moiety are not allowed and that its unchanged structure is necessary for binding to the NOD2 receptor and subsequent induction of NOD2 agonistic activity.

## **KEYWORDS**

NOD2 receptor, muramyl dipeptide, adjuvant, desmuramylpeptides, D-glutamic acid, bioisosterism, rigidization

# SEZNAM OKRAJŠAV

**ADP** = adenozin difosfat

**AIM** = inhibitor apoptoze makrofagov (angl. apoptosis inhibitor of macrophage)

**ALR** = AIM-u podobni receptorji

**APC** = antigen predstavitevne celice

**ASC** = PYD in CARD domeni vsebujoč protein (angl. association with the SNF1 complex)

**ATG16L** = z avtofagijo povezan protein 16-1

**ATP** = adenozin trifosfat

**BIR** = bakulovirusna domena za inhibicijo apoptoze (angl. baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat)

**Boc** = *terc*-butiloksikarbonil

**CARD** = domena za aktivacijo in rekrutiranje kaspaz (angl. caspase activation and recruitment domain)

**CDCl<sub>3</sub>** = devteriran kloroform

**CLR** = lektinski receptorji tipa C

**CTL** = citotoksični limfociti T

**d** = dublet

**D-Glu** = D-glutaminska kislina

**D-iGln** = D-izoglutamin

**DAMP** = s poškodbo povezani molekulski vzorci (angl. damage-associated molecular patterns)

**DBF** = dibenzofulven

**DBU** = 1,8-diazabiciklo[5.4.0]undec-7-en

**DED** = efektorska domena za smrt (angl. death effector domain)

**DKM** = diklorometan

**DMAP** = 4-dimetilaminopiridin

**DMF** = dimetilformamid

**DMSO-d<sub>6</sub>** = devteriran dimetilsulfoksid

**DNK** = dezoksiribonukleinska kislina

**dsDNK** = dvoverižna DNK

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

**ESI** = ionizacija z elektrorazprševanjem (angl. electrospray ionisation)

**Fmoc** = fluorenilmetyloksikarbonil

**Gly** = glicin

**GTP** = gvanozin trifosfat

**HD** = vijačna domena (angl. helix domain)

**HMGB1** = protein visoko-mobilne skupine 1 (angl. high mobility group box 1 protein)

**HOBt** = 1-hidroksibenzotriazol

**hPepT1** = človeški transporter peptidov 1

**HPLC** = tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

**HRMS** = masna spektrometrija visoke ločljivosti

**Hsp90** = protein toplotnega šoka 90 (angl. heat shock protein 90)

**IκB** = inhibitor NF-κB

**IL** = interlevkin

**IR** = infrardeča spektroskopija

**IRAK** = kinaza, povezana z receptorjem za interlevkin-1 (angl. interleukin-1 receptor-associated kinase)

**IRF** = interferone-regulirajoči dejavnik

**J** = sklopitevna konstanta

**L-Val** = L-valin

**Lgp2** = receptor 'laboratorij genetike in fiziologije' 2 (angl. laboratory of genetics and physiology receptor 2)

**LPS** = lipopolisaharid

**LRR** = z levcinom bogata zaporedja (angl. leucin-rich repeats)

**m** = multiplet

**MAPK** = z mitogeni-aktivirana proteinska kinaza

**MAVS** = protein mitohondrijskega protivirusnega signaliziranja (angl. mitochondrial antiviral-signaling protein)

**Mda5** = z diferenciacijo melanoma povezan antigen 5 (angl. melanoma differentiation-associated protein 5)

**MDP** = muramil dipeptid

**MeOD** = devteriran metanol

**Mf** = mobilna faza

**MHC** = poglavitni kompleks tkivne skladnosti (angl. major histocompatibility complex)

**MS** = masna spektrometrija

**MyD88** = primarni odziv mieloidne diferenciacije 88 (angl. myeloid differentiation primary response 88)

**NBD** = nukleotide-vezoča domena

**NF-κB** = jedrni faktor κB

**NLR** = NOD-u podobni receptorji

**NLRC** = proteini iz družine NLR, ki vsebujejo domeno CARD

**NLRP** = NOD, LRR in PYD vsebujoč protein

**NMR** = jedrska magnetna resonanca

**NOD** = nukleotide-vezoča oligomerizacijska domena

**NOS** = reaktivne dušikove zvrsti

**PAMP** = s patogeni povezani molekulski vzorci (angl. pathogen-associated molecular patterns)

**PGN** = peptidoglikan

**ppm** = delcev na milijon

**PRR** = receptorji za prepoznavo vzorcev (angl. pattern recognition receptors)

**PYD** = pirin-vsebujoča domena

**Rf** = retencijski faktor

**RIG-I** = z retinojsko kislino inducibilen gen I

**RIP2** = z receptorjem interagirajoča serin/treonin-protein kinaza 2 (angl. receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2)

**RLR** = receptorji podobni RIG-I

**RNK** = ribonukleinska kislina

**ROS** = reaktivne kisikove zvrsti

**s** = singlet

**SEAP** = izločena zarodna alkalna fosfataza (angl. secreted embryonic alkaline phosphatase)

**SGT1** = protein supresor G2 alela SKP1

**ssRNK** = enoverižna RNK

**t** = triplet

**TAB** = TAK1-vezoči protein

**TAK1** = s transformirajočim rastnim dejavnikom  $\beta$ -aktivirana kinaza 1 (angl. transforming growth factor beta-activated kinase 1)

**TFA** = trifluoroacetna kislina

**T<sub>H</sub>** = celica T pomagalka

**THF** = tetrahidrofuran

**TIR** = receptor Toll/interlevkin-1

**TLC** = tankoplastna kromatografija

**TLR** = Toll-u podobni receptorji

**TNF- $\alpha$**  = tumorje nekrotizirajoči faktor alfa

**t<sub>R</sub>** = retencijski čas

**WH** = domena vijačnica-obrat-vijačnica (angl. winged helix)

$\lambda$  = valovna dolžina

**δ** = kemijski premik

# 1 Uvod

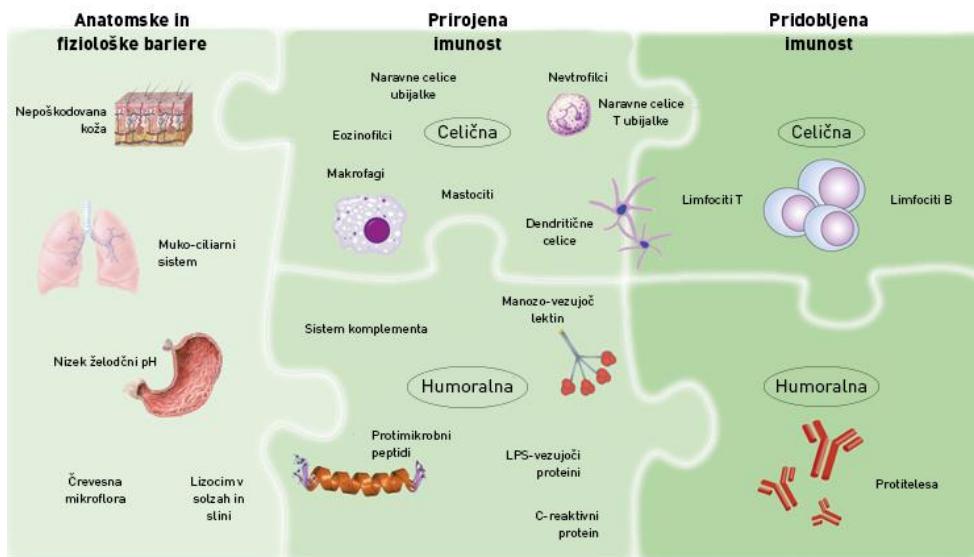
## 1.1 Imunski sistem

Človeški imunski sistem je skupek celic in molekul, ki med seboj sodelujejo z namenom zaščite lastnega organizma pred povzročitelji okužb iz okolja, kot so bakterije, virusi, paraziti in glive, ter ostalimi škodljivimi vplivi na človeško telo [1, 2]. Kljub temu da je imunski sistem precej izpopolnjen, lahko njegovo funkcijo ločimo na dve osnovni nalogi: (i) prepoznavo tako tujih snovi in organizmov, ki so vstopili v telo, kot tudi maligno spremenjenih lastnih celic ter (ii) odstranitev teh agensov [1]. Pri tem sodelujejo različne celice, porazdeljene po celiem telesu. Nekatere so se tekom evolucije organizirale v raznovrstne limfoidne organe, deljene na primarne, kjer imunske celice nastanejo in dozorijo (kostni mozeg in priželjc), ter sekundarne limfoidne organe, kjer dozorele imunske celice vstopajo v interakcije z antigeni in se nanje odzivajo (limfnii vozli, vranica in s črevesjem povezano limfoidno tkivo) [2]. Druge pa se skupaj s topnimi molekulami oz. mediatorji prosto gibljejo skozi telo po krvnem in limfnem obtoku [3].

Človeški imunski odziv je tradicionalno razdeljen na dve veji: prirojeno in pridobljeno imunost [4], a ta razdelitev je preveč poenostavljena, saj mnogi elementi pridobljenega imunskega odziva delujejo na temeljih prirojenega [5]. Zaradi pomembnih odkritij na področju pridobljene imunosti so bile raziskave prirojene imunosti rahlo v senci vse do preteklega desetletja, ko je širše raziskovanje na tem področju spodbudilo odkritje molekularnega mehanizma zaznavanja infekcij s posledičnim ojačenjem zaščitnega odziva organizma [4, 6]. Poenostavljeni si tako nadalje človeški protimikrobnii obrambni sistem lahko predstavljamo na treh nivojih: a) anatomske in fiziološke ovire; b) prirojena imunost in c) pridobljena imunost (slika 1) [5].

Anatomske in fiziološke ovire zagotavljajo ključno prvo obrambno linijo proti patogenim organizmom, vključujejo pa nepoškodovano kožo, mukociliarni sistem, nizek želodčni in vaginalni pH ter bakteriolitični encim lizocim v solzah, slini in ostalih izločkih. Pri osebkih s hudimi opeklinami kože ali s primarno ciliarno diskinezijo so opazili izjemno povečano nagnjenost k okužbam, kar ponazarja, da nedotaknjena odziva prirojene in pridobljene imunosti ne zmoreta kompenzirati odpovedi esencialnih anatomskeh in fizioloških barier [5]. Na povsem drugačen način telo varuje normalna bakterijska flora v črevesju, ki zavira

rast mnogih potencialno patogenih bakterij in gliv na površinskih predelih črevesja preko tekmovanja za esencialna hranila ali pa z izločanjem bakteriostatičnih snovi (npr. nekatere komenzalne bakterije izločajo mlečno kislino po presnovi glikogena) [1, 7, 8].



Slika 1: Trije osnovni nivoji človeškega imunskega sistema, prijeljeno po [5].

Po potencialnem uspešnem vdoru mikroorganizmov v telo pride nato do interakcije s celicami in topnimi mediatorji, ki so del prirojenega imunskega odziva [1].

## 1.2 Prirojena imunost

Na prirojeni imunski odziv lahko gledamo kot na enostavne, a precej kompleksne sisteme, prisotne v vseh mnogoceličnih organizmih [3, 5], ki omogočajo ključen in predvsem hiter sistemski odziv za preprečitev okužbe in ohranjanje homeostaze [9]. Ti sistemi variirajo od že prej omenjenih zunanjih telesnih ovir do visoko razvitetih receptorjev, sicer sposobnih prepoznavanja širokega spektra patogenih organizmov z izjemno učinkovitostjo, a se njihov odziv ne poveča pri ponovnih interakcijah z enakim povzročiteljem okužbe [1, 3, 8]. Pri tem prvem, hitrejšem odgovoru na vdor patogena v telo sodelujejo tako celični kot tudi humoralni elementi prirojene imunosti, ki izvršujejo vrsto nalog: (tabela 1)

### 1. Celični elementi:

- Hematopoetske celice: makrofagi, dendritične celice, mastociti, nevtrofilci, eozinofilci, naravne celice ubijalke in naravne celice T ubijalke
- Nehematopoetske celice: epitelne celice (npr. kože, dihalnih poti, urogenitalnega in prebavnega trakta)

2. Humoralni elementi: proteini komplementa, LPS-vezoči protein, C-reaktivni protein skupaj z ostalimi proteini akutne faze, protimikrobnii peptidi in manozovoč lektin [5]

**Tabela I: Celični in humoralni elementi, vpleteni v prirojen imunski odziv**

Mehanizem obrambe	Vpleteni celični in humoralni elementi prirojene imunosti
<b>Fagocitoza</b> [1, 9]	Nevtrofilci, makrofagi, bazofilci, eozinofilci
<b>Liza celic</b> [1, 9]	Naravne celice ubijalke, sistem komplementa, lizocim
<b>Ekstracelularni odziv na večje patogene (npr. parazitske črve)</b> [1]	Eozinofilci
<b>Opsonizacija</b> [9]	Sistem komplementa
<b>Kemotaksa</b> [9]	Sistem komplementa
<b>Protivirusna imunost celice</b> [9]	Interferoni
<b>Sproženje vnetja</b> [1]	Sistem komplementa, makrofagi, mastociti, bazofilci
<b>Predstavitev antigenov celicam pridobljene imunosti</b> [1, 11]	Dendritične celice, makrofagi

Kljub temu da so nenehno prisotni in aktivni, so zgoraj naštetni elementi zmožni med primarno okužbo sprožiti specifičen odziv in tudi vnetje. Ta odziv je specifičen predvsem zaradi t.i. receptorjev za prepoznavanje vzorcev (PRR), izraženih tako na površini kot tudi v citosolu celic, ki so sposobni zaznavanja kompleksnih polisaharidov, glikolipidov, lipoproteinov, nukleotidov in nukleinskih kislin [9] ter tudi endogenih ne-mikrobnih 'signalov nevarnosti' [12].

Prepoznavo invazivnih mikroorganizmov in ostalih dejavnikov nevarnosti v telesu preko PRR lahko v grobem razdelimo na 3 osnovne strategije. Pri prvi se prirojena imunost opira na omejen nabor receptorjev, katerih genski zapis se prenaša na potomce v praktično enaki obliki, ti receptorji pa zaznavajo »mikrobne oziroma telesu tuje« ohranjene molekulske strukture, izražene v veliko različnih mikrobih. Zanje se uporablja tudi izraz *s patogeni*

*povezani molekulski vzorci* (PAMP, angl. pathogen-associated molecular patterns), medenje pa spadajo npr.: bakterijski LPS, flagelin in muramil dipeptid (MDP) [5, 10].

Druga strategija temelji na zaznavi pogostih presnovnih produktov in drugih molekul, ki se povečano izražajo in izločajo med lizo celic ali poškodbo tkiva, do česar pride tako zaradi z okužbo povezanega kot tudi sterilnega (t.j. brez prisotnosti zunanjega dejavnika okužbe) vnetja. S skupnim imenom so jih poimenovali *s poškodbo povezani molekulski vzorci* (DAMP, angl. damage-associated molecular patterns), med dobro okarakterizirane primere pa spadajo protein HMGB1 (protein visoko-mobilne skupine 1) in drugi endogeni alarmni, proteini toplotnega šoka (Hsp) ter sečna kislina [5, 10].

Pri tretji strategiji pa receptorji prirojene imunosti prepoznavajo »manjkajoče, telesu lastne« molekule, izražene pri normalnih zdravih celicah, ki pa niso izražene pri okuženih celicah ali mikrobih. Po zaznavi teh ligandov se sproži inhibitorni signal, ki prepreči aktivacijo imunskega odziva proti lastnim celicam. Ta sistem dobro ponazarjajo naravne celice ubijalke, ki po ustrezni prepoznavi preko inhibitornih receptorjev, specifičnih za MHC razreda I, preferenčno napadejo celice, pri katerih je izražanje proteinov MHC razreda I zmanjšano (npr. kot posledica virusne okužbe ali stresa) [5, 11].

Po vezavi zgoraj omenjenih ligandov s PRR pride do hitre aktivacije obrambnih mehanizmov: izločanja citokinov in kemokinov, fagocitoze, sinteze ROS/NOS in ostalih protimikrobnih mehanizmov, prav tako pa pride do interakcije z drugo vejo imunskega odziva v obliki predstavitve antigenov celicam pridobljenega imunskega odziva [10].

### 1.3 Pridobljena imunost

Pridobljena imunost se je prvič pojavila pri vretenčarjih, razvila pa se je kot odgovor na ogromno variabilnost v strukturi antigenov in sposobnost mutacije patogenih organizmov, ki jim je omogočala izognitev prirojenim imunskim obrambnim mehanizmom [1, 12].

Med poglavite lastnosti pridobljenega imunskega odziva spadajo: daljši čas do dosega funkcionalne učinkovitosti (od nekaj ur do nekaj dni), specifičnost imunskega odziva glede na epitope makromolekul in izboljšanje imunskega odziva pri vsakem nadalnjem soočenju z določenim patogenom (t.i. imunski spomin) [1, 5]. Glavne efektorske celice predstavljajo limfociti [16], ki jih delimo na dve glavni veji – limfocite B in limfocite T [17], ki na

svojih plazemskih membranah izražajo specifično prirejene receptorje, ki lahko prepoznao praktično neskončen nabor antigenov, izraženih na najrazličnejših mikroorganizmih [1].

**Limfociti B** se razvijejo v kostnem mozgu in predstavljajo humoralno pridobljeno imunost, saj so sposobni tvorbe molekul (t.i. protiteles), ki lahko specifično prepoznao patogen in hkrati mobilizirajo različne druge komponente imunskega odziva. Vsaka celica B lahko tvori le eno strukturno specifično protitelo, ga nato v transmembranski obliki predstavi na svoji površini, tam pa deluje kot receptor za strukturno specifičen, komplementaren antigen. Po vezavi antiga na pripadajoč B-celični receptor pride do prenosa signala ter razvoja ali v t.i. plazmatko, ki je kratko živeča celica, sposobna izločanja protiteles, komplementarnih predhodno vezanemu antigenu, ali v spominsko celico B, ki je dolgo živeča in sposobna nadaljnje aktivacije ter kasnejšega razvoja v plazmatko [1, 12, 15].

**Limfociti T** pa se razvijejo v priželjcu in predstavljajo predvsem celično-posredovan imunski odziv pridobljene imunosti [1], delimo pa jih na citotoksične limfocite T (CTL), T celice pomagalke (T<sub>H</sub> celice), spominske T celice, regulatorne T celice in naravne celice T ubijalke. Njihove vloge zajemajo raznolike efektorske funkcije: (i) lahko direktno sodelujejo pri ubijanju okuženih celic (CTL, učinkoviti predvsem proti znotrajceličnim patogenom); (ii) lahko preko direktnega celičnega stika ali signaliziranja preko citokinov povečajo tako imunski odziv celic T kot tudi celic B (T<sub>H2</sub> celice); (iii) lahko povzročijo aktivacijo mononuklearnih fagocitov, naravnih celic ubijalk in citolitičnih T celic (T<sub>H1</sub> celice); (iv) ter regulirajo imunske odzive z zmanjševanjem poškodb tkiva zaradi avtoreaktivnosti ali prevelikega vnetnega odziva (T<sub>H17</sub> celice in regulatorne T celice) [15]. Limfociti T prepoznavajo okužene celice s pomočjo T-celičnih receptorjev, prisotnih na njihovih plazemskih membranah. CTL zaznavajo antigene, ki so vezani na molekule MHC tipa I (te molekule so prisotne na vseh celicah z jedrom), medtem ko T<sub>H</sub> celice in regulatorne T celice zaznavajo antigene, vezane na molekule MHC tipa II, ki so prisotne na antigen-predstavljvenih celicah (APC), med katere spadajo dendritične celice, makrofagi in limfociti B [1].

Za ustrezan induciran specifičen imunski odziv s strani limfocitov pa je ključnega pomena medsebojna povezanost prirojene in pridobljene imunosti [6]. Kritični za to povezavo so PRR, ki določijo izvor antigenov, prepoznanih s strani limfocitov, katerim nato posredujejo informacije za časovno ustrezan in vrstno specifičen nadaljnji imunski odziv [1, 5, 11].

## 1.4 PRR

Kot je bilo omenjeno že zgoraj, so receptorji za prepoznavanje vzorcev ključni tako pri hitri aktivaciji mehanizmov prirojene imunosti [10], kot tudi pri indukciji kasnejšega specifičnega imunskega odziva [6, 16] preko zaznavanja različnih nespecifičnih molekulskih vzorcev [5, 10]. Identificiranih in okarakteriziranih je bilo več razredov PRR, med katere spadajo Tollu-podobni receptorji (TLR), NOD-u podobni receptorji (NLR), receptorji, podobni RIG-I (RLR), lektinski receptorji tipa C (CLR) in AIM-u podobni receptorji (ALR) [1, 17].

Obstoj več različnih razredov PRR, ki so sposobni prepoznati enak mikroorganizem, je zelo pomemben, saj zagotavlja inducirane imunske odzive tudi v primeru onemogočenega posameznega receptorja ali nadaljnje signalne poti določenega receptorja s strani patogena [18, 19].

### 1.4.1 RLR

RIG-u podobne helikaze so pred kratkim odkrita skupina proteinov (RIG-I, Mda5 in Lgp2) [28, 33], ki delujejo v citoplazmi celic kot znotrajcelični senzorji virusnih komponent [1, 6]. RIG-I in Mda5 vsebuje zaporedni domeni CARD, ki sta pomembni za nadaljnji prenos signalov, vmes se nahaja helikazna domena, ki je podobna tudi pri ostalih RLR. V primeru RIG-I vsebuje njegova helikazna domena vezavno mesto za ATP, ki je ključno za aktivnost, a tega vezavnega mesta ne najdemo pri Mda5. Dodatno vsebuje RIG-I tudi zaviralno domeno, ki zavira njegovo aktivnost. Lgp2 vsebuje RNK-helikazno domeno, ampak mu manjkata domeni CARD [6], ta protein pa deluje kot negativni ali pozitivni regulator RIG-I in Mda5, kar je odvisno od vrste zaznanega virusa [25]. RIG-I in Mda5 zaznavata enovijačne in dvovijačne RNK s 5'-trifosfatno skupino, ki izvirajo iz RNK virusov in replicirajočih DNK virusov, prepoznav pa nato vodi do aktivacije prirojenih protivirusnih imunskega odzivov, predvsem preko indukcije interferonov tipa I in vnetnih citokinov v večini tipov celic [6, 28]. Protivirusni odzivi na RNK viruse preko RIG-I in Mda5 so širokospektralni, a z različno specifičnostjo. Hkrati pa aktivacija le RLR ne zadostuje za zaščito proti nekaterim virusom (virus influence, respiratorni sincicijski virus, virus limfocitičnega horiomeningitisa), saj je v teh primerih potrebna aktivacija imunskega odzivov tudi preko TLR7, kar kaže na to, da je za uspešno protivirusno obrambo potrebno sodelovanje med RLR in TLR [6].

## 1.4.2 TLR

Med vsemi družinami PRR so najprej odkrili TLR, zato so tudi najširše preučevani [26]. TLR so membranski glikoproteini tipa I, sestavljeni iz zunajcelične domene LRR, transmembranske domene in citoplazemske domene TIR [27]. Sposobni so prepoznavanja širokega nabora molekul, povezanih s patogeni: proteinov, sladkorjev, lipidov, nukleinskih kislin in kompleksnejših derivatov proteinov, sladkorjev in lipidov [28]. Pri ljudeh so do sedaj odkrili 10 različnih podtipov TLR [27], izraženi pa so na raznolikih imunskeih in neimunskeih celicah, kot so limfociti B, naravne celice ubijalke, dendritične celice, makrofagi, fibroblasti, epitelne in endotelne celice, pojavljajo pa se tako na površini celic (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6) kot tudi na membranah endosomov (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) [1, 6].

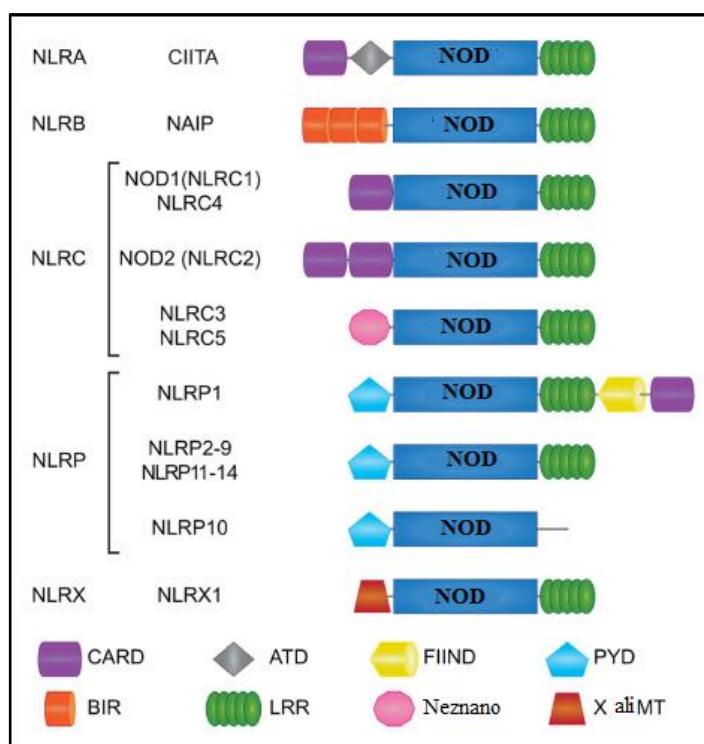
Stimulacija TLR z vezavo ustreznih molekul na te receptorje povzroči ekspresijo več genov, vpletenih v imunske odzive [1, 5, 6]. Prepoznav komponent mikrobov vodi v dimerizacijo receptorjev; v primeru TLR2 se tvori heterofilni dimer s TLR1 ali TLR6, pri ostalih pa pride do tvorbe homodimerov [29]. Dimerizacija sproži aktivacijo signalnih poti preko adaptorskih molekul, vezanih na citoplazemske TIR domene. Univerzalen adaptor predstavlja protein MyD88 (primarni odziv mieloidne diferenciacije 88), saj vstopa v interakcijo z vsemi TLR, razen TLR3 (receptor za dsDNK) [26], in preko aktivacije različnih IRAK kinaz (kinaze, povezane z receptorjem za interleukin-1) nadalje sproži indukcijo sinteze vnetnih citokinov in interferonov tipa I ter ostale imunske odzive. To poteka preko translokacije transkripcijskih faktorjev, npr. NF- $\kappa$ B in IRF 3 (interferone-regulirajoči dejavnik 3), v jedro celice [5]. Pri specifičnih pripadnikih lahko opazimo rahlo drugačen vzorec spremenjene ekspresije genov. Na primer pri aktivaciji TLR3 in TLR4 je vpletен drugačen mehanizem, preko katerega pride do indukcije sinteze interferonov tipa I kot pri TLR7, TLR8 in TLR9 [24, 25], pri TLR2 in TLR5 pa do te indukcije sploh ne pride [26–28].

TLR predstavljajo zelo pomemben člen v signaliziranju med prirojeno in pridobljeno imunostjo, mnoge predklinične in klinične študije pa so že pokazale možnost uporabe prečiščenih agonistov TLR kot adjuvansov v cepivih [34], saj lahko s stimulacijo APC učinkovito usmerijo in spodbudijo dozorevanje  $T_H$  celic v specifične  $T_H$  fenotipe, usmerjene proti specifičnim tipom okužb. Primera teh fenotipov sta  $T_{H1}$  (sintesa interferona- $\gamma$ , usmerjenega proti virusnim, intracelularnim bakterijskim in parazitskim

okužbam) in T<sub>H</sub>17 (sinteza IL-17, ki spodbuja vnetje in sproži kemotakso). V humani medicini je do sedaj, kljub mnogim raziskavam, registriran za uporabo kot adjuvans le en agonist TLR, monofosforil lipid A, zelo obetavne pa so študije uporabe kombinacije agonistov TLR in NLR kot adjuvansov [34].

### 1.4.3 NLR

NLR so družina proteinov, ki jih najdemo v citosolu celic in so sposobni zaznavanja določenih PAMP in DAMP [5, 6]. Pri sesalcih so odkrili 23 predstavnikov, a funkcija večine je zaenkrat še slabo raziskana [20, 35]. Analize strukture domen in evolucijske analize delijo te predstavnike v 4 poddružine: NLRA, NLRB, NLRP in NLRC (kamor zaradi filogenetske povezave in homologije spadajo tudi NLRC3, NLRC5 in NLRX1) (slika 2) [20].



Slika 2: Shematski prikaz posameznih domen različnih NLR (prijezeno po [19])

Njihova struktura je tripartitna (slika 2):

- na C-terminalnem koncu se nahajajo zaporedja LRR, ključna za prepoznavanje mikrobnih komponent [36],
- centralno locirana je domena NOD, ki lahko sproži oligomerizacijo ter posledično nastanek kompleksa za aktivacijo in tvorbo proteinov, vpletenih v nadaljnje

signaliziranje. Domeno NOD pri NLR sestavlja sedem genetsko zelo ohranjenih molekulskih vzorcev, vključujoč ATP/GTP-azno specifično zanko, vezavno mesto za Mg<sup>2+</sup> in 5 drugih specifičnih molekulskih vzorcev [36, 37].

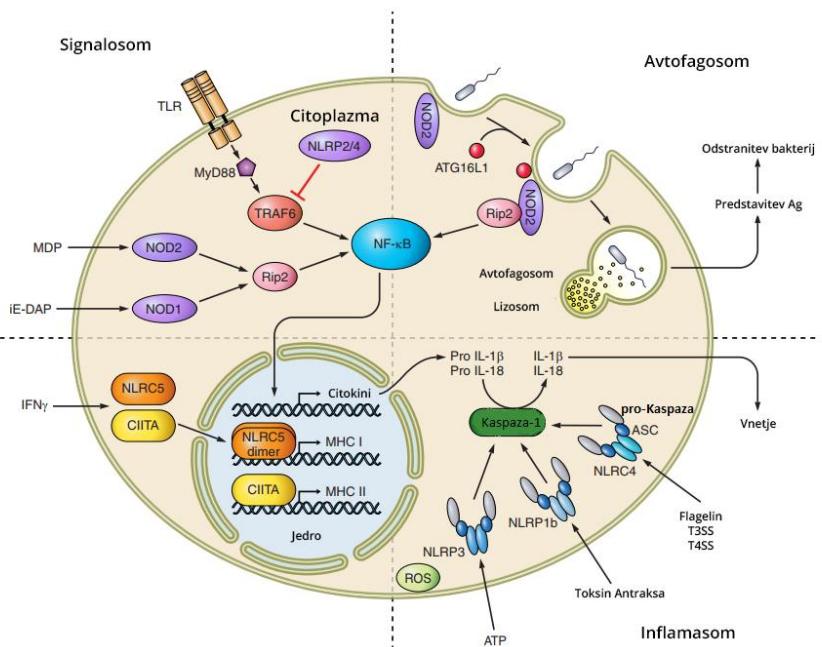
- Variabilne domene na N-terminalnem koncu: CARD, DED, PYD ali BIR. Te domene so ključne za prenos signala preko homotipskih povezav protein-protein [36].

Vezava ustreznih ligandov sproži preko posameznih domen signalno kaskado reakcij, ki vodi do različnih učinkov (slika 3):

- a) aktivacija NF-κB ali
- b) nastanek citoplazemskega večproteinskega kompleksa, znanega kot inflamasom, z namenom indukcije sinteze vnetnih citokinov [6, 38–41] ali
- c) signaliziranje celične smrti po mikrobnii infekciji (avtofagija, slika 3 - zgoraj desno) [42].

Aktivacija NF-κB signalne poti je ključna pri regulaciji in koordinaciji imunskih obrambnih odzivov. V mirujočem stanju najdemo neaktivne podenote NF-κB v citosolu, kjer jih inhibitorni IκB proteini ohranljajo ločene [43]. Po mikrobnem vdoru pa nato pride do fosforilacije in proteosomalne degradacije IκB proteinov, kar povzroči dimerizacijo podenot NF-κB, ki tako lahko vstopijo v celično jedro in tam preko transkripcijskih in translacijskih signalov povečajo produkcijo neaktivnih pro-oblik vnetnih citokinov (pro-IL-1β, pro-IL-18) [6, 43]. Nadalje pa predstavlja drug korak dozoritev v zrele, sekretorne oblike citokinov s pomočjo inflamasoma [6].

Inflamasom (slika 3 - desno spodaj, skupaj z aktivirajočimi ligandi) je multimeren proteinski kompleks, katerega cilj je aktivacija kaspaze-1 prek povezovalnega proteina ASC (PYD in CARD domeni vsebujoč protein). Osrednje komponente aktivacije inflamasoma so pripadniki NLR, saj preko njih prihaja do interakcij proteinov s pro-obliko kaspaze-1. Od štirih do sedaj identificiranih inflamasomov so trije regulirani preko NLR (NLRP1, NLRP3 in NLRC4). Aktivacija inflamasoma vodi v dozoritev vnetnih citokinov IL-1β in IL-18 [6, 44, 45], prav tako pa lahko pride v fagocitnih celicah po aktivaciji inflamasoma do piroptoze celice, kar predstavlja obliko vnetne, od kaspaze-1 odvisne celične smrti (v primeru nastanka NLRP1 inflamasoma) [6, 46].



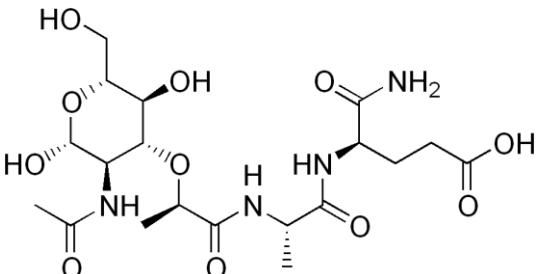
Slika 3: Shema možnih interakcij NLR (prirejeno po [20])

#### 1.4.3.1 Receptorji NOD2

V družini NLR med najbolj preučevane receptorje spada NOD2 (imenovan tudi NLRC-2), ki je izražen v številnih celicah v telesu, vključujuč enterocite [47], Gobletove celice [48], zarodne celice [49], Panethove celice [50], mastocite [51], dendritične celice [52], makrofage [53], limfocite B [54] in limfocite T [55]. NOD2 deluje kot znotrajcelični PRR za MDP (muramil dipeptid, slika 4), produkt delne razgradnje peptidoglikana (PGN), ki je prisoten tako pri Gram pozitivnih kot Gram negativnih bakterijah [8, 56, 57]. Načini vstopa MDP v evkariontske celice še niso popolnoma razjasnjeni, a predlaganih je bilo nekaj poti.

Gostiteljska celica lahko internalizira MDP preko fagocitoze celotne bakterije, endocitoze, privzema fragmentov PGN iz zunanjih membranskih veziklov [58, 59], transmembranskih kanalčkov (npr. hPepT1) [60] ali pa MDP vstopi preko bakterijskega sekretornega sistema [61] (slika 5).

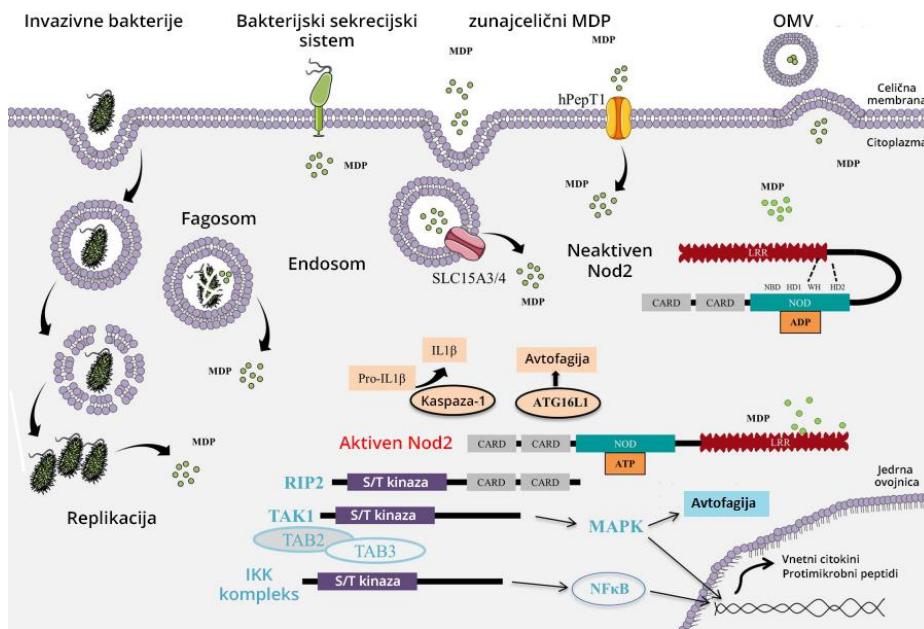
Protein NOD2 sestavlja tri različne domene: dve CARD ter LRR in NOD domeni. Domena NOD vsebuje nukleotide-vezočo domeno (NBD), domeno vijačnica-obrat-vijačnica (WH) in dve vijačni domeni (HD1 in HD2). Interakcija med NBD in WH je



Slika 4:Muramil dipeptid (MDP; N-Acilmuramyl-L-alanil-D-Izoglutamin)

za MDP (muramil dipeptid, slika 4), produkt delne razgradnje peptidoglikana (PGN), ki je prisoten tako pri Gram pozitivnih kot Gram negativnih bakterijah [8, 56, 57]. Načini vstopa MDP v evkariontske celice še niso popolnoma razjasnjeni, a predlaganih je bilo nekaj poti. Gostiteljska celica lahko internalizira MDP

pomembna za stabilizacijo proteina v neaktivni obliki, posredovana pa je lahko preko vezanega ADP [62] ali pa brez vezanega nukleotida [63]. Neaktivno stanje ohranja tudi interakcija s šaperoni, vključujoč Hsp90 in SGT1 [64].



Slika 5: Shema mehanizmov vstopa MDP v celice in mehanizma delovanja receptorjev NOD2 (prirejeno po[56])

Po vezavi MDP na domeno LRR pride do konformacijskih sprememb NBD, WH in HD1 preko HD2, kar omogoči izmenjavo ADP za ATP, samo-oligomerizacijo (indukcija nastanka signalizirajočega kompleksa – nodosoma), migracijo k plazemski membrani in nadaljnje signaliziranje, posredovano prek efektorskih domen CARD [56, 62]. Najprej pride do homotipskih interakcij med paroma domen CARD proteinov NOD2 in RIP2, čemur sledijo interakcije s kinazo TAK1 ter TAB2 in TAB3. Nodosom inducira aktivacijo tako MAPK in NF- $\kappa$ B signalnih poti, ki vodita do že prej omenjene povečane sinteze vnetnih citokinov, protimikrobnih molekul [66] in mucinov [48]. Interakcija NOD2 s kaspazo-1 [67] povzroči sekrecijo IL-1 $\beta$ , interakcija z ATG16L1 pa avtofagijo in predstavitev antigenov s pomočjo MHC tipa II [68] (slika 3). Poročali so tudi o mogoči zaznavi virusne ssRNK preko NOD2, kar povzroči njegovo aktivacijo in translokacijo proti mitohondriju, kjer naj bi se vezal na in aktiviral protein MAVS preko svojih domen NOD in LRR. Nadalje pride do aktivacije IRF3 in IRF7 ter indukcije interferonov tipa I [69].

## **1.5 Načrtovanje, optimizacija in uporabnost agonistov NOD2 kot adjuvansov**

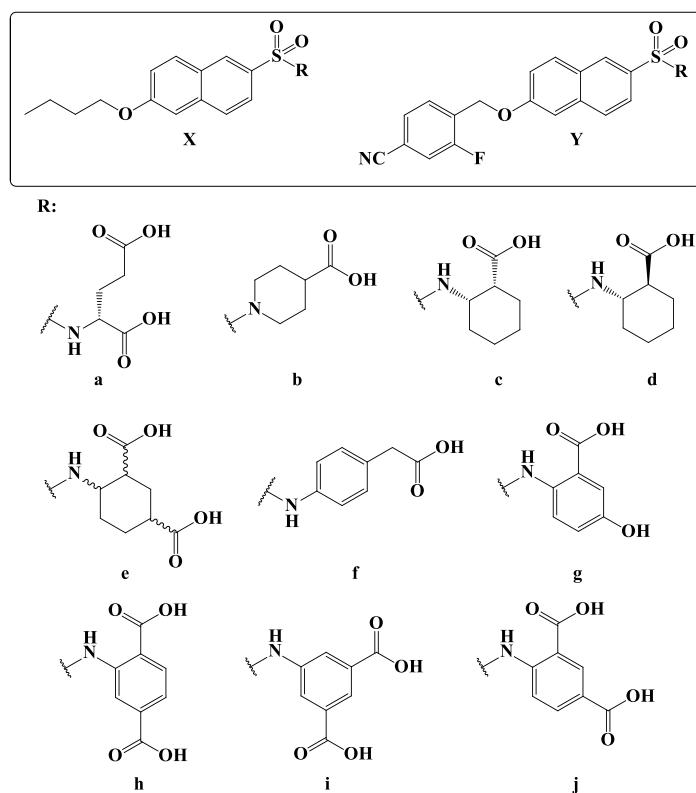
V zadnjih letih pa je večjega poudarka deležna vloga različnih PRR (TLR in NLR) pri koordiniranju ustreznega imunskega odziva, njihovi ligandi v vlogi adjuvansov pa so postali predmet raziskav, povezanih z ustvarjanjem modernih kombiniranih cepiv, prirejenih specifičnim patogenom [34]. Termin "adjuvans" izhaja iz latinske besede adjuvare (slov. pomagati), po definiciji farmacevtskega terminološkega slovarja pa je adjuvans sestavina, ki ima sama po sebi malo ali nič farmakološkega učinka, v kombinaciji z drugimi sestavinami pa lahko poveča ali spremeni njihovo osnovno farmakološko delovanje, npr. v cepivih [70]. Tradicionalna cepiva so osnovana na živih oslabljenih patogenih, mrtvih deaktiviranih organizmih ali deaktiviranih bakterijskih toksinov, ki pa jih povezujejo z občasnimi neželenimi reakcijami, med drugim nespecifično imunogenostjo in toksičnostjo [71]. Da bi se v čim večji meri izognili tem reakcijam, se je strategija načrtovanja modernih cepiv usmerila k uporabi prečiščenih sintetičnih antigenov kot cepiv. A takšni antigeni so tipično šibko imunogeni in za nastanek robustnega in vztrajnega imunskega odziva potrebujejo prisotne adjuvanse [34]. Nadalje predstavlja korist uporabe adjuvansov tudi zmanjšanje količine (odmerka) potrebnega antigena ali injekcij, potrebnih za dosego imunosti, kar posledično zmanjša ceno izdelave cepiv [34]. Najširše uporabljeni adjuvansi v človeških cepivih so trenutno: i) aluminijev hidroksid in aluminijev fosfat, ki deluje kot aktivatorja inflamasoma NLRP3, preko katerega sprožita sinteza vnetnih citokinov interlevkina-1 $\beta$  in interlevkina 18, prav tako hkrati olajšata tudi fagocitozo antigena, saj gre za neraztopljene delčke anorganskih soli, na katere je adsorbiran antigen, APC jih tako posledično lažje fagocitirajo [72]; in ii) emulzije O/V s skvalenom, a mehanizem delovanja le-teh ostaja pretežno neznan in kontroverzen [73]. Ena izmed pomanjkljivosti zgoraj omenjenih adjuvansov je slabo induciranje T-celično posredovanega imunskega odziva, saj so zmožni sprožiti le humoralni in Th2 celični odziv, ki pa sta neučinkovita proti mnogim tipom infekcij, predvsem tistih, ki vključujejo znotrajcelične patogene [74]. Čeprav so agonisti receptorjev NOD sposobni sprožiti vnetni odziv (karakteriziran z izločanjem citokinov, kemokinov, protimikrobnih peptidov in reaktivnih kisikovih ter dušikovih zvrsti), pa slednji ni dovolj močen. Več *in vitro* študij je pokazalo, da delujejo agonisti NOD sinergistično z agonisti TLR pri nastanku Th1 in Th17 fenotipov T celic pomagalk in pripadajočih citokinskih profilov, kar kaže na ključnost

interakcij med obema tipoma PRR pri potencirjanju prirojenega in pridobljenega imunskega odziva [34]. Novejše raziskave se tako usmerjajo v iskanje nove generacije adjuvansov, povezanih s PRR (tudi kombinacije agonistov NLR in TLR), ki lahko modulirajo in nadzirajo nastajanje tako humoralnih kot tudi T-celičnih imunskih odzivov preko zaznavanja bakterijskih komponent [34]. Ena izmed slednjih je že prej omenjeni MDP (sestavljen iz N-acetilmuraminske kisline, L-alanina in D-izoglutamina), ligand receptorja NOD2, ki predstavlja minimalni strukturni fragment peptidoglikana z imunoадjuvantno aktivnostjo [75]. Mnoge študije pa so pokazale, da aplikacija MDP različnim gostiteljem povzroči različne toksične učinke, vključujuč pirogenost, levkopenijo, občutljivost na endotoksine, indukcijo artritisa in granulom [76], hkrati pa je izkazal MDP tudi slabo permeabilnost preko celičnih membran in hitro eliminacijo [77], zato se je razvoj usmeril v sintezo optimiziranih spojin z manjšo toksičnostjo in boljšimi farmakokinetičnimi lastnostmi.

## 1.6 Strategije optimizacije

Pri optimizaciji spojin se na področju farmacevtske kemije pogosto poslužujemo koncepta uporabe bioizosternih zamenjav posameznih fragmentov molekul pri racionalnem načrtovanju novih molekul iz spojine vodnice. Bioizosteri predstavljajo atome, skupine, ione in molekule, ki imajo podobne fizikalno-kemijske lastnosti (podoben volumen, podobno obliko, podobno število elektronov in njihovo razporeditev v zunanji lupini) ter delujejo na enako tarčo (agonistično ali antagonistično). Možne posledice omenjenih modifikacij spojin vodnic z bioizosteri so raznolike in lahko vključujejo: spremembo učinka, jakosti, selektivnosti in biološke uporabnosti, boljše ADME lastnosti (absorpcija, porazdelitev, metabolizem in eliminacija molekule), zmanjšanje stranskih učinkov, večjo kemijsko stabilnost in zmanjšanje stroškov sinteze [78]. A vse to hkrati pomeni tudi, da se bioizosteri v glavnem ne obnašajo enako kot prvotne skupine, ki jih nadomeščajo, in zato lahko posledično na določene tarče delujejo, na druge pa ne (možna izguba učinka), kar je seveda v veliki meri odvisno od medmolekulskih interakcij med molekulo in tarčo [79]. Bioizostere lahko razdelimo v dve glavni skupini: klasične in neklasične bioizostere. Med klasične bioizostere spadajo zamenjave mono-, dvo-, tri- ali tetravalentnih atomov ali skupin za podobne (primer: OH – NH<sub>2</sub>), prav tako pa tudi obročni ekvivalenti (primer: benzen – tiofen). Vse ostale oblike bioizosterije spadajo med neklasične in vsebujejo zamenjave obroča z verigo (primer: estradiol – dietilstilbestrol), verige z obročem (primer:

GABA – muscimol) in zamenjave funkcionalnih skupin (primer: OH – SO<sub>2</sub>NH) [78]. Zelo pomemben vidik pri načrtovanju optimiziranih spojin pa je tudi rigidizacija, pri kateri zmanjšamo prosto energijo sistema, najpogosteje z uvedbo dvojnih vezi ali obročnih sistemov, s tem pa zmanjšamo tudi izgubo vezavne entropije, saj je ligand pri vezavi na tarčo v dosti bolj »urejenem« stanju, kot pa bi bil v primeru prisotne večje fleksibilnosti in s tem več možnih konformacij molekule. Seveda pa mora biti sama rigidizirana konformacija ustrezena za ustrezeno vezavo. S tem lahko pri rigidiziranih spojinah potencialno dosežemo energetsko ugodnejšo in ustrezejšo vezavo v aktivno mesto tarče in s tem večji selektivnost ter aktivnost [80]. Pristop rigidizacije z uvedbo rigidiziranih bioizosternih mimetikov v molekule se je izkazal za uspešnega v raziskavi Sosiča in sodelavcev [81], kjer so raziskovali vpliv uvedbe mimetikov D-glutaminske kisline v sulfonamidne zaviralce (prikazani na sliki 6) tarčnega encima MurD (Mur ligaza, odgovorna za vezavo D-Glu na peptidni del bakterijskega peptidoglikana) na njihovo inhibitorno aktivnost, spojine z vgrajenimi mimetiki (spojine **X** in **Y** z mimetiki **b** – **j**, slika 6) pa so pokazale signifikantno izboljšane aktivnosti v primerjavi s spojinama vodnicama z ohranljeno osnovno strukturo D-Glu (spojini **X** in **Y** z mimetikom **a**, slika 6).



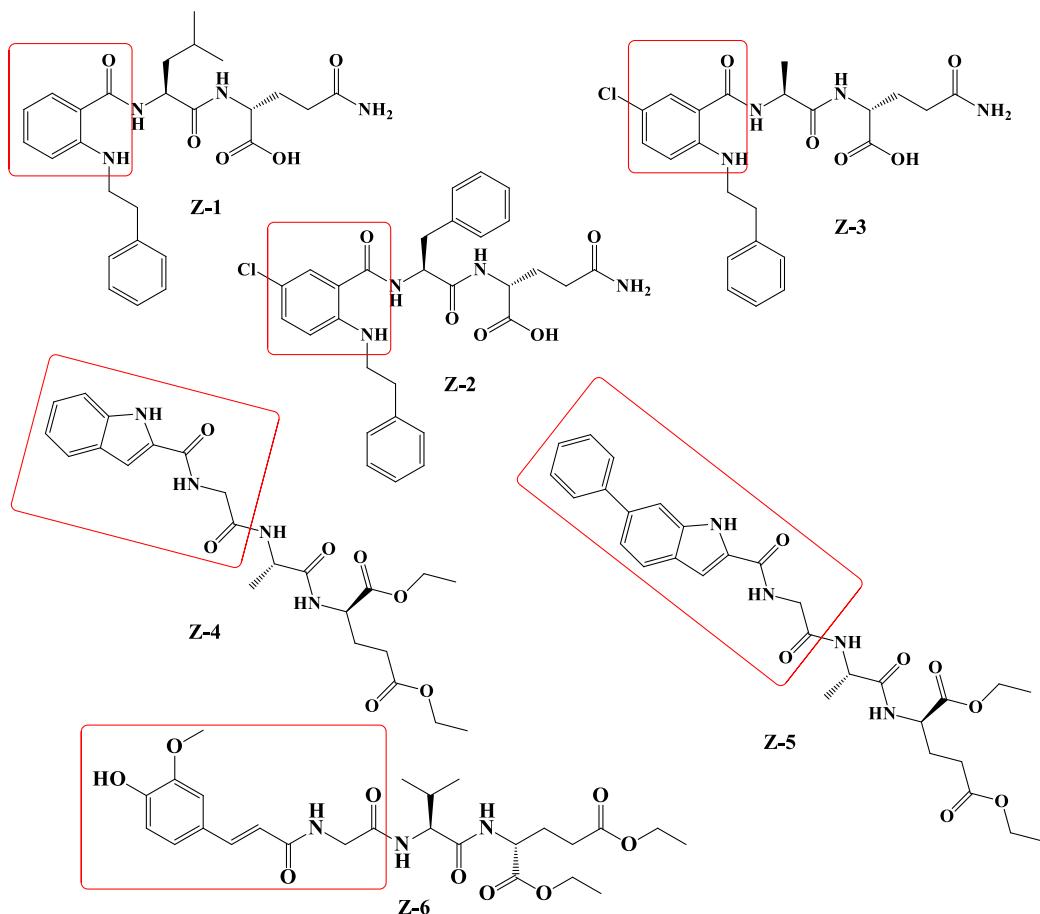
Slika 6: Strukture druge generacije sulfonamidnih zaviralcev MurD; **X** in **Y** predstavlja osnovna skeleta, spodaj pa so predstavljeni D-Glu (**a**) in njeni rigidni mimetiki(**b-j**); prizadeno po [81]

### 1.6.1 Derivatizacija MDP

Z namenom optimizacije prej omenjenega MDP je bilo sintetiziranih mnogo analogov in derivatov, eden najbolj obetajočih pa je bil murabutid, ki predstavlja varno in apirogeno različico MDP, vendar je za potencialno *in vivo* uporabnost njegova eliminacija iz telesa prehitra, prav tako pa aplikacija *per os* ni mogoča [82]. Med zanimivejše alternative tako spadajo manj hidrofilni dezmuramilpeptidi, v katerih je slatkorni del molekule MDP zamenjan z glikomimetikom, peptidni del pa v večini analogov ostaja nespremenjen (uporaba dipeptida L-Ala-D-iGln ali L-Ala-D-Glu), saj menjava L-Ala z D-Ala ali D-izoGln z L-izoGln izniči sposobnost aktivacije receptorja NOD2 [83]. Zaradi dejstva, da dezmuramilpeptidi v celice vstopajo s pomočjo pasivne absorpcije, ki je odvisna od njihove lipofilnosti [84], so se raziskave usmerile v sintezo bolj lipofilnih derivatov. Rezultati predhodnih študij so pokazali tudi, da uvedba lipofilnega substituenta v MDP lahko poveča njegovo adjuvantno aktivnost [77].

Iz teh razlogov je bilo sintetiziranih nekaj obetavnih analogov, pri katerih je bil slatkorni del molekule MDP zamenjan z različnimi aromatskimi in heteroaromatskimi skupinami, najbolj obetavni med njimi so prikazani na sliki 7. Zhao je s sodelavci v svoji raziskavi [77] slatkorni del molekule zamenjal z *o*-aminobenzojsko kislino (slika 7, spojine **Z-1** do **Z-3**), kar je signifikantno povečalo imunoadjuvantno aktivnost *ex vivo* v primerjavi z MDP, ta ugotovitev pa je skladna s predhodno navedbo o pozitivnem učinku uvedbe lipofilnega substituenta v MDP. Potrdil pa je tudi domnevo, da slatkorni del za adjuvantno delovanje (aktivacijo receptorja NOD2) ni nujno potreben [77]. Prav tako pa je tudi Jakopin s sodelavci [85] sintetiziral več potencialnih analogov z različnimi heteroaromatskimi skupinami namesto slatkornega dela, ki so izhajale iz saharinskega in indolnega obročnega sistema, saj sta aromatska dela predstavljala dober  $\pi$ -elektronski nadomestek glukozaminskega ostanka v spojni vodnici. S sintezo različnih acikličnih substituiranih derivatov karboksilnih kislin različnih dolžin na saharinskem obroču so želeli ohraniti specifičen položaj karbonilne skupine N-acetil muraminskega dela MDP, za katerega se je včasih predvidevalo, da je ključen pri prepoznavi in vezavi na NOD2 [86]. Sintetizirane spojine so pokazale le šibko stimulacijo imunskega odziva, ki so jo izmerili posredno, in sicer preko izločanja TNF- $\alpha$ , še največjo med njimi pa je imel dezmuramilpeptid, ki je imel namesto slatkornega dela za osnovo indolni obročni sistem z vezanim glicinom (slika 7, spojina **Z-4**). Nadalje so spojino **Z-4** modificirali z zamenjavo indol-2-ilnega fragmenta s sorodnimi mimetiki, prav tako pa so manjše spremembe uveli

v peptidni (Gly-L-Ala-D-Glu) del. Največjo NOD-2 agonistično aktivnost je pokazala spojina s 6-fenilindoilglicinskim glikomimetikom, rezultati pri ostalih spojinah pa so pokazali tudi, da uvedba estrov na D-glutaminskem delu poveča agonistično aktivnost, najverjetneje zaradi olajšanega prehoda preko celične membrane (koncept predzdravila) [87].

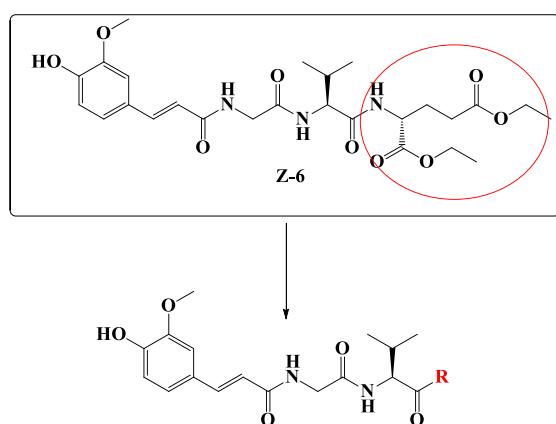


Slika 7: Najbolj obetavni dezmuramilpeptidni derivati iz predhodnih raziskav z označenimi glikomimetiki

V eni izmed nadaljnjih raziskav [88] pa so se usmerili v še bolj specifično iskanje zamenjave sladkornega dela molekule in rezultati so pokazali največjo NOD2 agonistično aktivnost (primerljivo z aktivnostjo MDP) spojine **dietil ((E)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil-D-glutamata** (spojina **Z-6**, slika 7), v katero je namesto sladkornega dela vgrajen *trans*-feruloylglicinski glikomimetik. Ta spojina bo tako predstavljala našo spojino vodnico, ki jo bomo poskušali nadalje optimizirati.

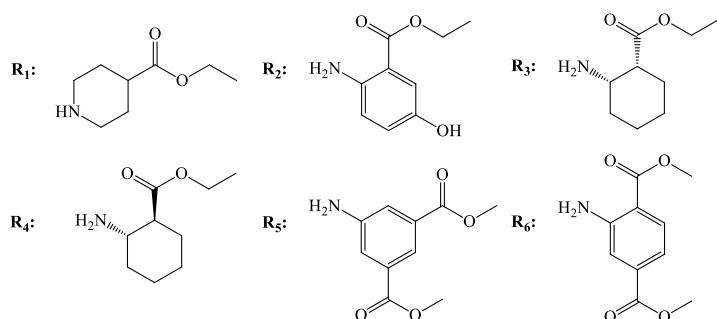
## 2 Namen dela

Pripravili bomo dezmuramilpeptidne derivate spojine **Z-6** (slika 8) z vgraditvijo bioizosterov terminalne amino kisline (D-glutaminske kisline) v strukturno rigidizirane analoge tripeptida Gly-L-Val-D-Glu (sliki 8 in 9) in preverili vpliv teh zamenjav na NOD2 agonistično delovanje na NOD2 receptorje. S tem bomo lahko pomembno prispevali k razvoju potencialnih novih spojin, ki bi lahko bile uporabne predvsem kot del novih kombinacij cepiv ali pri terapiji bolezni, ki vključujejo signalno pot preko receptorja NOD2.



Slika 8: Mesto modifikacije spojine vodnica

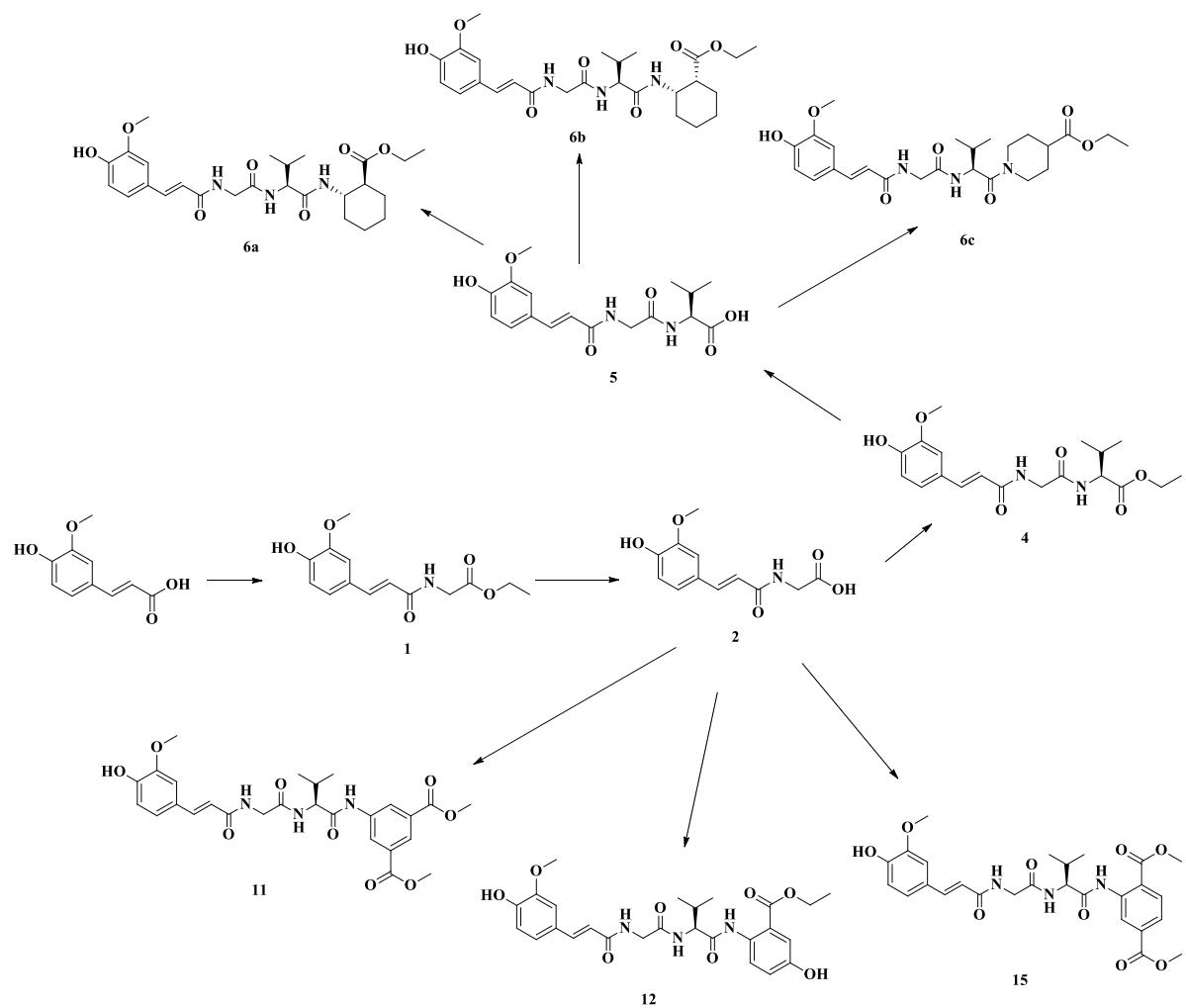
Sinteze se bomo lotili na dva različna načina, saj bomo imeli opravka z različno reaktivnimi estri karboksilnih kislin s prisotno aminsko skupino (slika 9). V prvem primeru bomo najprej sintetizirali ustrezeno kislino (enako tridelno ogrodje pri vseh končnih spojinah, spojina **5**, slika 10), na katero bomo nato vezali dobro reaktivne alifatske amine (**R<sub>1</sub>**, **R<sub>3</sub>** in **R<sub>4</sub>**; slika 9). V drugem primeru pa bomo najprej manj reaktivne aromatske amine (**R<sub>2</sub>**, **R<sub>5</sub>** in **R<sub>6</sub>**; slika 9) vezali na L-valin z zaščiteno aminsko skupino in nato na dobljene spojine pripojili prva dva fragmenta želenih produktov (spojina **2**, slika 10).



Slika 9: Uporabljeni bioizosteri estrov D-glutaminske kisline

Za uporabo fragmentov, prikazanih na sliki 9, smo se odločili na podlagi rezultatov že prej omenjene raziskave Sosiča in sodelavcev [81], kjer so pokazali uspešnost posnemanja D-glutaminske kisline z njenimi bioizosteri ter uspešnost pristopa rigidizacije molekule z namenom izboljšanja selektivnosti vezave in aktivnosti.

Sintetizirane končne spojine bomo na koncu fizikalno-kemijsko in spektroskopsko ovrednotili ter s pomočjo kolegov iz Katedre za klinično biokemijo ovrednotili tudi njihovo NOD2 agonistično aktivnost na celicah HEK-Blue<sup>TM</sup> hNOD2.



Slika 10: Celotna sintezna shema

### **3 MATERIALI IN METODE**

#### Uporabljene kemikalije (reagenti in topila):

Pri delu smo uporabili reagente in topila različnih proizvajalcev (Merck, Sigma-Aldrich, Janssen, Acros Organics, Bachem, Fluka), ki so bili uporabljeni brez dodatnega prečiščevanja.

#### Laboratorijska oprema:

- tehtnica METTLER TOLEDO® PB403-S/FACT Precision Balance
- magnetno mešalo IKA® RCT basic IKAMAG Magnetic stirrer
- rotavapor BÜCHI® type R-114
- UV svetilka CAMAG UV-cabinet II ( $\lambda = 254$  nm/366 nm)
- kugelrohr BÜCHI® Glass Oven B-580

#### Kromatografske metode:

##### ➤ *Tankoplastna kromatografija (TLC):*

Za detekcijo spojin s tankoplastno kromatografijo smo uporabili razrezane plošče Kieselgel 60 F254 (0,20 mm nanos silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem), ki smo jih gledali pod UV svetlobo v zgoraj navedeni UV svetilki ( $\lambda = 254$  nm in/ali 366 nm), uporabili pa smo različne mobilne faze in ninhidrin kot orositveni reagent.

##### ➤ *Kolonska kromatografija:*

Za čiščenje produktov s kolonsko kromatografijo smo kot stacionarno fazo uporabljali silikagel z velikostjo delcev 0,040–0,063 mm (Merck, Darmstadt, Nemčija) ter različne mobilne faze in steklene kolone različnih velikosti.

##### ➤ *Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC):*

HPLC analize smo izvajali na instrumentu Agilent Technologies HP 1100 z UV-VIS detektorjem G1365B, kolono Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 x 150 mm, 5  $\mu\text{m}$  delci) ob uporabi predkolone in pri pretoku 1 mL/min. Kot eluent smo izbrali zmes acetonitrila in 0,1% raztopine trifluoroacetne kisline v

vodi, pri čemer smo spremenjali gradient: med 1. in 30. minuto s 30 % na 80 % acetonitrila ter med 30. in 35. minuto z 80 % na 90 % acetonitrila.

### Določanje tališč

Tališča spojin smo določali s talilnim mikroskopom z ogrevalno mizico Wagner & Munz Polytherm A in termometrom 52 II Thermometer proizvajalca Fluka. Tališča niso korigirana.

### Jedrska magnetna resonanca (NMR)

$^1\text{H}$  NMR spektri so bili posneti pri 400 MHz na spektrometru Bruker Avance DPX<sub>400</sub> na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.  $^{13}\text{C}$  NMR spektri so bili posneti pri 100 MHz na spektrometru Bruker Avance DPX<sub>400</sub> na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani. Vzorce smo raztopili v DMSO-d<sub>6</sub>, CDCl<sub>3</sub> ali MeOD in kot interni standard uporabili tetrametilsilan. Spektre smo procesirali s programom MestReC.

### Masna spektrometrija (MS)

Masni spektri (meritve s tehniko ESI in meritve HRMS) so bili posneti na masnem spektrometru AutoSpec Q-TOF Premier (proizvajalec: Micromass, Manchester, Velika Britanija) v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

### Infrardeča spektroskopija (IR)

IR spektri so bili posneti na spektrometru Perkin Elmer 1600 Series FT-IR na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

### Nomenklatura, risanje spojin in računanje cLogP vrednosti

Za poimenovanje, risanje spojin in računanje njihovih cLogP vrednosti smo uporabili program ChemDraw Ultra 12.0 proizvajalca CambridgeSoft.

### Biološko testiranje končnih spojin

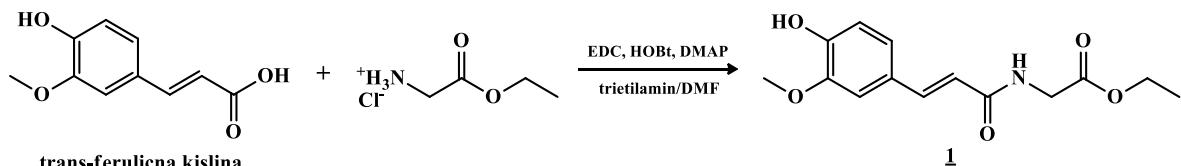
Sintetizirane spojine smo dali biološko ovrednotiti na Katedro za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani, kjer so določili njihovo NOD2 agonistično aktivnost. Za testiranje so uporabili NOD2-specifične celice HEK-Blue™ hNOD2 in reagent QUANTI-Blue™ proizvajalca InvivoGen. K 180 µL suspenzije omenjenih celic so dodali 20 µL 20 µM raztopine sintetiziranih spojin ozziroma 20 µM raztopine MDP (pozitivna kontrola), pri čemer so kot topilo uporabili gojitveni medij. Testiranje so izvedli v dveh paralelkah. Pri negativni kontroli so suspenziji celic dodali le gojitveni medij. Celice so nato skupaj z ustreznimi slepimi vzorci inkubirali 18 ur v 5 % atmosferi ogljikovega dioksida pri temperaturi 37 °C. Po končani inkubaciji in dodatni 30-minutni inkubaciji v mediju za analizo so supernatantu celic ob prisotnosti reagenta QUANTI-Blue™ spektrofotometrično izmerili količino izločene zarodne alkalne fosfataze (SEAP). Absorbanco so izmerili pri 655 nm.

## 4 EKSPERIMENTALNI DEL

### 4.1 REAKCIJSKA SHEMA 1

#### 4.1.1 SINTEZA ETIL (E)-(3-(4-HIDROOKSI-3-METOKSIFENIL)AKRILOIL)GLICINATA (**1**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

V 50 mL bučko smo najprej natehtali 1,40 g etil glicinata × HCl (10 mmol; 1 eq), ga raztopili v DMF (12 mL) in 6,96 mL trietilamina (50 mmol; 5 eq), nato pa dodali še 1,94 g *trans*-ferulične kisline (10 mmol; 1 eq), 1,92 g EDC (10 mmol; 1 eq), 1,35 g HOBr (10 mmol; 1 eq) in nekaj kristalov DMAP (katalitična količina) ter mešali pri sobni temperaturi preko noči. Po 24 urah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali konec reakcije ter izvedli izolacijo. Reakcijsko zmes smo zlili na 175 mL vode, nato pa ekstrahirali z etil acetatom (3 × 50 mL). Združene organske faze smo sprali z 1M HCl (2 × 50 mL), enkrat 50 mL vode, nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 50 mL) in enkrat 50 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo na koncu posušili še z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, prefiltrirali in topilo odstranili z odsesavanjem pod znižanim tlakom. Dobili smo 920 mg spojine **1**.

PRODUKT:

**Izgled:** okrast amorfen prašek

**Izkoristek:** 33 %

**Rf:** 0,44 (Mf: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9/1)

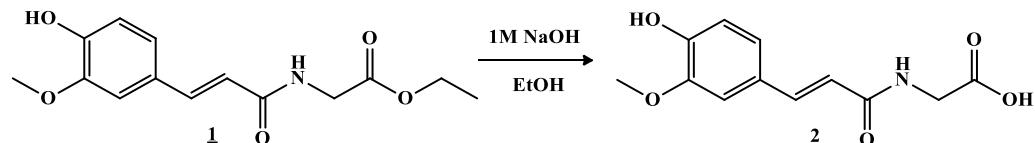
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  [ppm] = 1.24 (t, 3H,  $J$  = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.13–4.20 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> in NHCH<sub>2</sub>), 6.33 (d, 1H,  $J$  = 15.6 Hz, CH=CH), 6.69 (t, 1H,  $J$  = 5.6 Hz, NH), 6.83 (d, 1H,  $J$  = 8.4 Hz, H-Ar), 6.89 (d, 1H,  $J$  = 2.0 Hz, H-Ar), 6.95 (dd, 1H,  $J$  = 8.0 Hz,  $J$  = 2.0 Hz, H-Ar), 7.50 (d, 1H,  $J$  = 15.6 Hz, CH=CH)

**MS (ESI):** m/z (%) = 280,1 [M+H]<sup>+</sup>

#### 4.1.2 SINTEZA (*E*)-(3-(4-HIDROKSI-3-METOKSIFENIL)AKRILOIL)GLICINA (2)

REAKCIJA:



#### POSTOPEK:

V 50 mL bučko smo najprej natehtali 0,92 g spojine **1** (3,3 mmol; 1eq), jo raztopili v 8 mL etanola, dodali 13 mL 1M NaOH (13,2 mmol; 4eq) in reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi. Po 4 urah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali konec reakcije ter izvedli izolacijo. Najprej smo z odsesavanjem pod znižanim tlakom odstranili večino etanola, nakar smo preostanku dodali 5 mL vode in ga z 1M HCl nakisali do pH 2. Izpadlo oborino smo odfiltrirali s presesavanjem in jo v sušilniku pri 70 °C posušili do suhega. Dobili smo 680 mg spojine **2**.

#### PRODUKT:

**Izgled:** okrast amorfen prašek

**Izkoristek:** 82 %

**Rf:** 0,78 (Mf: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9/1)

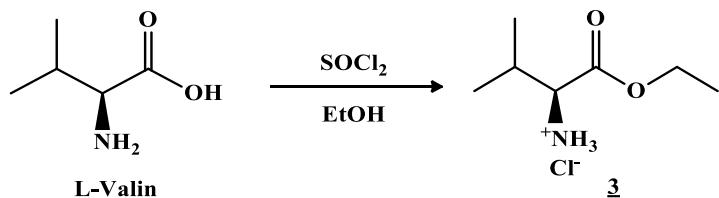
#### <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):

$\delta$  [ppm] = 3.80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.86 (d, 2H, *J* = 6.0 Hz, NHCH<sub>2</sub>), 6.54 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, CH=CH), 6.79 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-Ar), 7.01 (dd, 1H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 2.0 Hz, H-Ar), 7.14 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, H-Ar), 7.34 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, CH=CH), 8.24 (t, 1H, *J* = 5.6 Hz, NH), 9.46 (s, 1H, OH), 12.59 (br s, 1H, COOH)

**MS (ESI):** m/z (%) = 250,1 [M-H]<sup>-</sup>

### 4.1.3 SINTEZA (S)-1-ETOksi-3-METIL-1-OKSOBUTAN-2-AMINIJEVEGA KLORIDA (3)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

V 50 mL bučko smo najprej natehtali 1,17 g L-valina (10 mmol, 1eq), ga raztopili v 20 mL absolutnega etanola in na ledeni kopeli ohladili na 0 °C. Po kapljicah smo dodali 0,80 mL tionil klorida (11 mmol; 1,1eq) in odstranili ledeno kopel, nato pa reakcijsko zmes premaknili na oljno kopel pri temperaturi refluksa (80 °C) ter pustili mešati čez noč. Ko smo s tankoplastno kromatografijo zaznali konec reakcije, smo izvedli izolacijo. Najprej smo topilo odstranili z odsesavanjem pod znižanim tlakom, nato pa oljnat ostanek suspendirali v dietil etru, kar je povzročilo izoboritev produkta. Izpadlo oborino smo odfiltrirali s presesavanjem in jo v sušilniku pri 30 °C posušili do suhega ter dobili 1,12 g spojine **3**.

PRODUKT:

**Izgled:** bel amorfen prašek

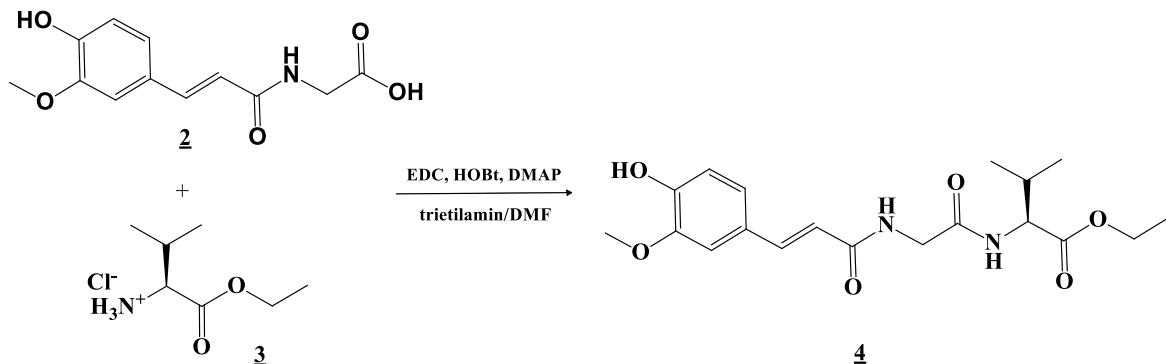
**Izkoristek:** 62 %

**Rf:** 0,82 (Mf: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9/1)

**Referanca za spojino 3:** [89]

## 4.1.4 SINTEZA ETIL-(E)-(3-(4-HIDROKSI-3-METOKSIFENIL)AKRILOIL)GLICIL-L-VALINATA (4)

REAKCIJA:



### POSTOPEK:

V 50 mL bučko smo najprej natehtali 0,48 g spojine **3** (2,63 mmol; 1 eq), jo raztopili v DMF (8 mL) in 1,1 mL trietylamina (7,89 mmol; 3 eq), nato pa dodali še 0,66 g spojine **2** (2,63 mmol; 1 eq), 0,50 g EDC (2,63 mmol; 1 eq), 0,36 g HOBr (2,63 mmol; 1 eq) in nekaj kristalov DMAP (katalitična količina) ter mešali pri sobni temperaturi preko noči. Po 24 urah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali konec reakcije ter izvedli izolacijo. Reakcijsko zmes smo zlili na 100 mL vode, nato pa ekstrahirali z etil acetatom ( $3 \times 50\text{mL}$ ). Združene organske faze smo sprali z 1M HCl ( $3 \times 50\text{ mL}$ ), enkrat 50 mL vode, nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> ( $3 \times 50\text{ mL}$ ) in enkrat 50 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo na koncu posušili še z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, prefiltrirali in topilo odstranili z odsesavanjem pod znižanim tlakom. Dobili smo 614 mg spojine **4**.

### PRODUKT:

**Izgled:** jantaren amorfen prašek

**Izkoristek:** 62 %

**Rf:** 0,53 (Mf: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9/1)

### <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

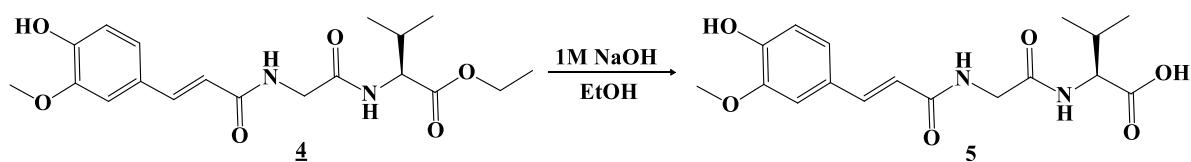
$\delta$  [ppm] = 0.92 (d, 3H,  $J = 6.8$  Hz, CH<sub>3</sub>-Val), 0.96 (d, 3H,  $J = 6.8$  Hz, CH<sub>3</sub>-Val), 1.28 (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.16–2.24 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.92 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.11–4.15 (m, 1H, NHCH<sub>2</sub>), 4.17–4.25 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.53–4.56 (m, 1H,  $\alpha$ -CH), 5.84 (br s, 1H, OH), 6.32 (d, 1H,  $J = 15.6$  Hz,

$\text{CH}=\text{CH}$ ), 6.39 (t, 1H,  $J = 4.8$  Hz,  $\text{NH}$ ), 6.60 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz,  $\text{H-Ar}$ ), 7.01 (d, 1H,  $J = 1.6$  Hz,  $\text{H-Ar}$ ), 7.06 (dd, 1H,  $J = 8.8$  Hz,  $J = 1.6$  Hz,  $\text{H-Ar}$ ), 7.58 (d, 1H,  $J = 15.6$  Hz,  $\text{CH}=\text{CH}$ )

**MS (ESI):** m/z (%) = 377,2 [M-H]<sup>-</sup>

#### 4.1.5 SINTEZA (*E*)-(3-(4-HIDROksi-3-METOKSIFENIL)AKRILOIL)GLICIL-L-VALINA (**5**)

REAKCIJA:



#### POSTOPEK:

V 50 mL bučko smo najprej natehtali 0,60 g spojine **4** (1,57 mmol; 1 eq), jo raztopili v 8 mL etanola, dodali 6,3 mL 1M NaOH (6,3 mmol; 4 eq) in mešali pri sobni temperaturi. Po 4 urah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali konec reakcije ter izvedli izolacijo. Najprej smo z odsesavanjem pod znižanim tlakom odstranili večino etanola, nakar smo preostanek z 1M HCl počasi nakisali do pH 2. Vodno fazo smo ekstrahirali z etilacetatom (4 × 30 mL), združene organske faze pa nato sprali z enkrat 30 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo na kocu posušili še z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, prefiltrirali in topilo odstranili z odsesavanjem pod znižanim tlakom. Dobili smo 333 mg spojine **5**.

#### PRODUKT:

**Izgled:** jantarno olje

**Izkoristek:** 61 %

**Rf:** 0,50 (Mf: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9/1)

#### <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

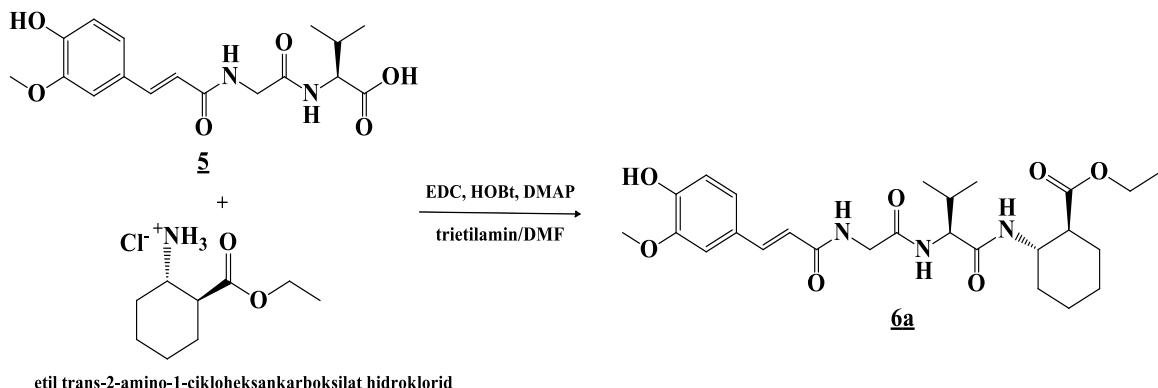
$\delta$  [ppm] = 0.92 (d, 3H,  $J = 6.8$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-Val}$ ), 0.96 (d, 3H,  $J = 6.8$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-Val}$ ), 2.16–2.24 (m, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 3.92 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.11–4.15 (m, 1H,  $\text{NHCH}_2$ ), 4.53–4.56 (m, 1H,  $\alpha\text{-CH}$ ), 5.84 (br s, 1H, OH), 6.32 (d, 1H,  $J =$

15.6 Hz,  $\text{CH}=\text{CH}$ ), 6.39 (t, 1H,  $J = 4.8$  Hz, NH), 6.60 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz, H-Ar), 7.01 (d, 1H,  $J = 1.6$  Hz, H-Ar), 7.06 (dd, 1H,  $J = 8.8$  Hz,  $J = 1.6$  Hz, H-Ar), 7.58 (d, 1H,  $J = 15.6$  Hz,  $\text{CH}=\text{CH}$ )

**MS (ESI):** m/z (%) = 349,1 [M-H]<sup>-</sup>

#### 4.1.6 SINTEZA ETIL (1S,2S)-2-((S)-2-(2-((E)-3-(4-HIDROOKSI-3-METOKSIFENIL) AKRILAMIDO)ACETAMIDO)-3-METILBUTANAMIDO)CIKLOHEKSAN-1-KARBOKSILATA (6a)

REAKCIJA:



#### POSTOPEK:

V 50 mL bučko smo najprej natehtali 0,085 g spojine **5** (0,24 mmol; 1 eq), jo raztopili v DMF (2 mL) in 0,06 mL trietilamina (0,45 mmol; 1,9 eq), nato pa dodali še 0,031 g etil *trans*-2-amino-1-cikloheksankarboksilata × HCl (0,15 mmol; 0,6 eq), 0,03 g EDC (0,15 mmol; 0,6 eq), 0,02 g HOBr (0,15 mmol; 0,6 eq) in nekaj kristalov DMAP (katalitična količina) ter reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi. Po 48 urah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali konec reakcije ter izvedli izolacijo. Reakcijsko zmes smo zlili na približno 35 mL vode, nato pa vodno fazo ekstrahirali z diklorometanom (4 × 20 mL). Združene organske faze smo sprali z 1M HCl (3 × 20 mL), vodo (3 × 50 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 20 mL) in enkrat 20 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, prefiltrirali in topilo odstranili z odsesavanjem pod znižanim tlakom. Surov produkt smo očistili še s pomočjo kolonske kromatografije in dobili smo 65 mg spojine **6a**.

**PRODUKT:****Izgled:** okrast amorfni prašek**Izkoristek:** 87 %**Tališče:** 108 – 112 °C**R<sub>f</sub>:** 0,43 (Mf: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9/1)**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD):**

$\delta$  [ppm] = 0.92–0.97 (m, 6H, 2 × CH<sub>3</sub>-Val), 1.19–1.40 (m, 6H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub> in CH<sub>2</sub>A), 1.47–1.56 (m, 1H, CH<sub>2</sub>B), 1.75–1.77 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.84–2.13 (m, 3H, CH<sub>2</sub>, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.39–2.52 (m, 1H, CHCOO), 3.86–4.18 (m, 9H, OCH<sub>3</sub>, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, NHCH<sub>2</sub>, NHCH in  $\alpha$ -CH), 6.53 (dd, 1H,  $J$  = 15.8 Hz,  $J$  = 0.8 Hz, CH=CH), 6.82 (dd, 1H,  $J$  = 8.0 Hz,  $J$  = 1.6 Hz, H-Ar), 7.06 (dd, 1H,  $J$  = 8.8 Hz,  $J$  = 0.8 Hz, H-Ar), 7.16 (t, 1H,  $J$  = 1.6 Hz, H-Ar), 7.51 (dd, 1H,  $J$  = 15.6 Hz,  $J$  = 6.0 Hz, CH=CH)

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD):**

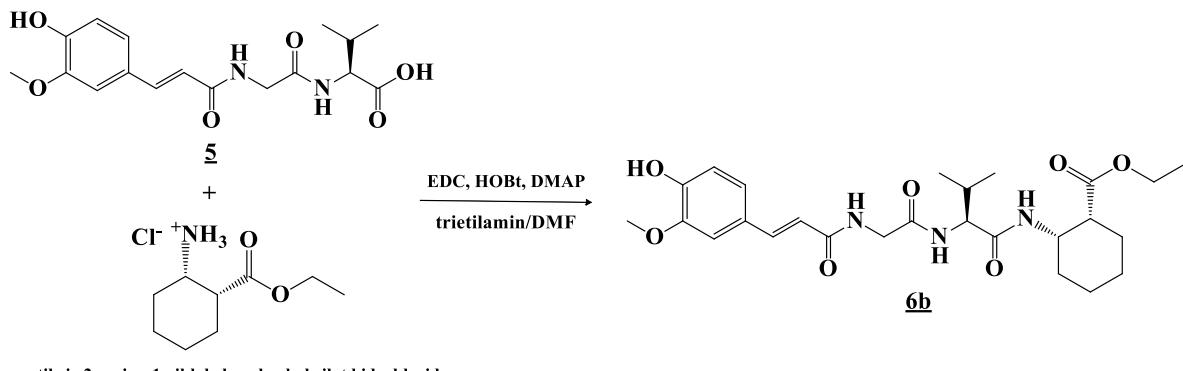
$\delta$  [ppm] = 14.50, 14.57, 18.33, 18.41, 19.70, 19.74, 25.72, 25.87, 30.30, 30.52, 32.00, 32.24, 33.22, 33.40, 43.82, 44.01, 50.22, 50.39, 50.91, 50.98, 56.41, 60.15, 60.24, 61.72, 61.76, 111.59, 116.51, 118.06, 118.12, 123.45, 128.13, 142.87, 142.94, 149.33, 150.08, 169.62, 171.58, 171.74, 172.42, 175.83, 175.86\*

**MS (ESI):** m/z (%) = 504,3 [M+H]<sup>+</sup>**IR (ATR):**  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = 3276, 2937, 2360, 2342, 1725, 1645, 1513, 1449, 1374, 1268, 1124, 1031, 979, 845, 812, 669**HPLC (254 nm):** 96,3%, t<sub>r</sub> = 7,04 (in 7,94)<sup>\*</sup> min.**HRMS:** Izračunano za C<sub>26</sub>H<sub>38</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> m/z: 504,2715 [M+H]<sup>+</sup>, izmerjeno 504,2710.

<sup>\*</sup>(opazili smo podvojevanje določenih signalov, saj je ta spojina zmes dveh diastereomerov)

#### **4.1.7 SINTEZA ETIL (1R,2S)-2-((S)-2-(2-((E)-3-(4-HIDROKSI-3-METOKSIFENIL)AKRIL AMIDO)ACETAMIDO)-3-METILBUTANAMIDO)CIKLOHEKSAN-1-KARBOKSILATA (6b)**

REAKCIJA:



#### **POSTOPEK:**

V 50 mL bučko smo najprej natehtali 0,026 g spojine **5** (0,075 mmol; 1 eq), jo raztopili v DMF (1 mL) in 0,03 mL trietylamina (0,230 mmol; 3 eq), nato pa dodali še 0,015 g etil *cis*-2-amino-1-cikloheksankarboksilata × HCl (0,075 mmol; 1 eq), 0,015 g EDC (0,075 mmol; 1 eq), 0,010 g HOEt (0,075 mmol; 1 eq) in nekaj kristalov DMAP (katalitična količina) ter reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi. Po 72 urah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali konec reakcije ter izvedli izolacijo. Reakcijsko zmes smo zlili na približno 35 mL vode, nato pa vodno fazo ekstrahirali z diklorometanom (4 × 20 mL). Združene organske faze smo sprali z 1M HCl (3 × 20 mL), vodo (3 × 50 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 20 mL) in enkrat 20 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, prefiltrirali in topilo odstranili z odsesavanjem pod znižanim tlakom ter dobili 29 mg spojine **6b**.

#### **PRODUKT:**

**Izgled:** okrast amorfen prašek

**Izkoristek:** 76 %

**Tališče:** 93 – 97 °C

**Rf:** 0,43 (Mf: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9/1)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  [ppm] = 0.85–0.95 (m, 6H, 2 × CH<sub>3</sub>-Val), 1.18–1.26 (m, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.28–1.42 (m, 3H, CH<sub>2</sub> in CH<sub>2A</sub>), 1.55–1.65 (m, 3H, CH<sub>2</sub> in CH<sub>2B</sub>), 1.72–1.87 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.95–2.13 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.70–2.78 (m, 1H, CHCOO), 3.85 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.03–4.24 (m, 5H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, NHCH<sub>2</sub> in NHCH), 4.30–4.42 (m, 1H,  $\alpha$ -CH), 6.36–6.43 (m, 1H, CH=CH), 6.86 (dd, 1H,  $J$  = 8.0 Hz,  $J$  = 2.0 Hz, H-Ar), 6.96 (s, 1H, H-Ar), 7.00–7.02 (m, 1H, NHCH<sub>2</sub>), 7.12–7.15 (m, 1H, H-Ar), 7.28–7.33 (m, 1H,  $J$  = 8.4 Hz, NH), 7.56 (dd, 1H,  $J$  = 15.6 Hz,  $J$  = 6.0 Hz, CH=CH)

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  [ppm] = 14.15, 14.17, 18.04, 18.23, 19.14, 22.64, 29.17, 29.57, 31.36, 31.44, 43.39, 44.25, 44.31, 47.89, 55.91, 58.66, 58.72, 60.55, 60.65, 109.96, 110.02, 114.85, 117.55, 117.64, 122.09, 122.16, 127.26, 127.31, 141.61, 141.66, 146.84, 147.59, 166.75, 166.81, 169.32, 169.39, 170.07, 170.23, 173.92, 174.00\*

**MS (ESI):** m/z (%) = 504,3 [M+H]<sup>+</sup>

**IR (ATR):**  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = 3275, 2939, 2360, 2341, 1646, 1515, 1449, 1374, 1251, 1124, 1032, 983, 669

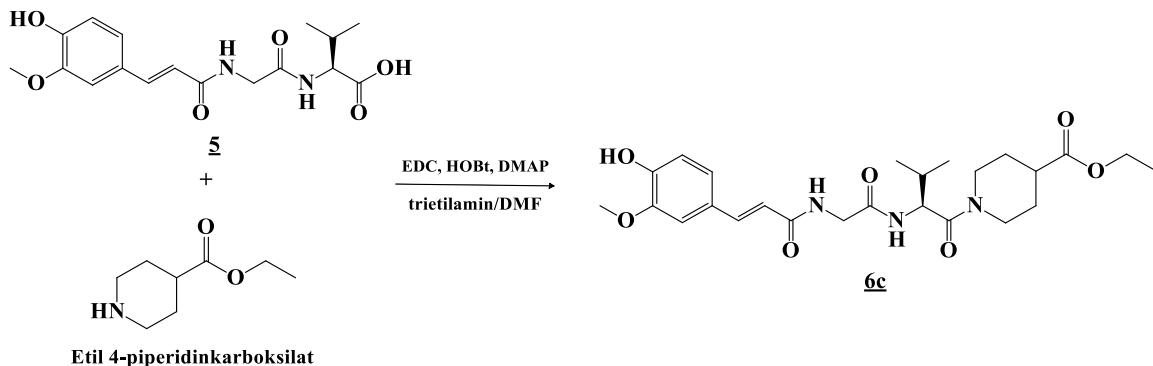
**HPLC (254 nm):** 98,7%, t<sub>r</sub> = 8,85 (in 9,25)<sup>\*</sup> min.

**HRMS:** Izračunano za C<sub>26</sub>H<sub>38</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> m/z: 504,2717 [M+H]<sup>+</sup>, izmerjeno 504,2710.

<sup>\*</sup>(opazili smo podvojevanje določenih signalov, saj je ta spojina zmes dveh diastereomerov)

#### **4.1.8 SINTEZA ETIL (E)-1-((E)-(3-(4-HIDROKSI-3-METOKSIFENIL)AKRILOIL)GLICIL-L-VALIL)PIPERIDIN-4-KARBOKSILATA (6c)**

**REAKCIJA:**



#### **POSTOPEK:**

V 50 mL bučko smo najprej natehtali 0,100 g spojine **5** (0,285 mmol; 1,6 eq), jo raztopili v DMF (3 mL) in 0,073 mL trietilamina (0,529 mmol; 3 eq), nato pa dodali še 0,027 mL etil 4-piperidinkarboksilata (0,176 mmol; 1 eq), 0,034 g EDC (0,176 mmol; 1 eq), 0,024 g HOBr (0,176 mmol; 1 eq) in nekaj kristalov DMAP (katalitična količina) ter reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi. Po 72 urah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali konec reakcije ter izvedli izolacijo. Reakcijsko zmes smo zlili na približno 35 mL vode, nato pa vodno fazo ekstrahirali z diklorometanom (4 × 20 mL). Združene organske faze smo sprali z 1M HCl (3 × 20 mL), vodo (3 × 50 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 20 mL) in enkrat 20 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, prefiltrirali in topilo odstranili z odsesavanjem pod znižanim tlakom. Surov produkt smo očistili še s pomočjo kolonske kromatografije in dobili 54 mg spojine **6c**.

#### **PRODUKT:**

**Izgled:** bel amorfen prašek

**Izkoristek:** 63 %

**Tališče:** 90 – 94 °C

**Rf:** 0,53 (Mf: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9/1)

#### **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  [ppm] = 0.85–0.94 (m, 6H, 2 × CH<sub>3</sub>-Val), 1.23 (t, 3H,  $J$  = 7.6 Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.52–1.77 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.89–2.00 (m, 3H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) in

CHCOO), 2.49–2.54 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.86 (t, 1H, *J* = 10.8 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.17 (t, 1H, *J* = 12.0 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.93–3.99 (m, 1H, NHCH<sub>2</sub>), 4.07–4.15 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.31–4.39 (m, 1H, NHCH<sub>2</sub>), 4.81–4.85 (m, 1H,  $\alpha$ -CH), 6.28 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, CH=CH), 6.81–6.94 (m, 3H, 2 x H-Ar), 7.04–7.10 (t, 1H, *J* = Hz, NHCH<sub>2</sub>), 7.32–7.39 (m, 1H, NH), 7.48 (dd, 1H, *J* = 15.6 Hz, *J* = 3.2 Hz, CH=CH)

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  [ppm] = 14.18, 17.45, 17.49, 19.63, 19.75, 27.72, 27.92, 28.41, 28.56, 30.96, 31.49, 31.51, 40.64, 40.87, 41.49, 41.62, 43.11, 43.49, 45.06, 45.37, 53.56, 53.61, 55.89, 60.75, 109.99, 114.92, 117.44, 122.22, 122.27, 127.13, 127.16, 141.57, 146.93, 147.65, 166.73, 169.22, 169.36, 169.92, 169.99, 173.87, 174.08\*

**MS (ESI):** m/z (%) = 490,3 [M+H]<sup>+</sup>

**IR (ATR):**  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = 3293, 2964, 1725, 1619, 1513, 1449, 1372, 1270, 1179, 1123, 1035, 979, 846, 817, 635

**HPLC (254 nm):** 97,5%,  $t_r$  = 7,04 min.

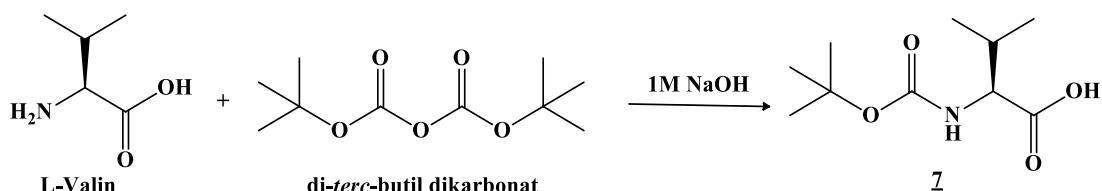
**HRMS:** Izračunano za C<sub>25</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> m/z: 490,2553 [M+H]<sup>+</sup>, izmerjeno 490,2561.

\*(opazili smo podvojevanje določenih signalov, saj je ta spojina zmes dveh diastereomerov)

## 4.2 REAKCIJSKA SHEMA 2

### 4.2.1 SINTEZA BOC-L-VALINA (7)

REAKCIJA:



### POSTOPEK:

V 100 mL bučko smo najprej natehtali 3,515 g L-valina (30 mmol; 1 eq), ga raztopili v 30 mL 1M NaOH in zmes ohladili na 0 °C. Vzporedno smo v drugo bučko natehtali 8,510 g di-*terc*-butil dikarbonata (39 mmol; 1,3 eq), ki smo ga raztopili v 40 mL dioksana. Nato smo zmes di-*terc*-butil dikarbonata in dioksana po kapljicah dodajali raztopini L-valina v 1M NaOH ter reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi. Po 24 urah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali konec reakcije ter izvedli izolacijo. Najprej smo z odsesavanjem pod znižanim tlakom odstranili večino dioksana, nato pa preostanku dodali 50 mL vode, ga prenesli v ljiljan in ekstrahirali z enkrat 30 mL dietil etra. Vodno fazo smo ohladili na 0 °C, počasi nakisali do pH 2-3 z 1M HCl in ekstrahirali z etil acetatom (3 × 50 mL). Združene organske faze smo na koncu sprali s 50 mL nasičene raztopine NaCl, organsko fazo posušili še z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, prefiltrirali ter topilo odstranili z odsesavanjem pod znižanim tlakom in dobili 4,80 g spojine 7.

### PRODUKT:

**Izgled:** bel amorfen prašek

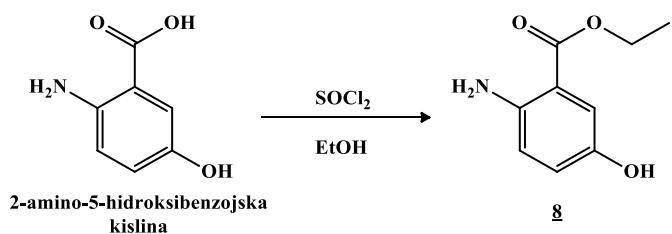
**Izkoristek:** 74 %

**R<sub>f</sub>:** 0,50 (Mf: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9/1)

**Referanca za spojino 7:** [90]

## **4.2.2 SINTEZA ETIL 2-AMINO-5-HIDROKSIBENZOATA (8)**

**REAKCIJA:**



**POSTOPEK:**

V 50 mL bučko smo najprej natehtali 0,766 g 2-amino-5-hidroksibenzojske kisline (5 mmol; 1 eq), jo raztopili v 20 mL absolutnega etanola in na ledeni kopeli ohladili na 0 °C. Nato smo po kapljicah dodali 0,40 mL tionil klorida (5,5 mmol; 1,1 eq) in po celotnem dodatku premaknili reakcijsko zmes na oljno kopel, kjer smo jo segrevali pri temperaturi refluksa (80 °C) ter pustili mešati čez noč. Ko smo s tankoplastno kromatografijo zaznali konec reakcije, smo izvedli izolacijo. Najprej smo topilo odstranili z odsesavanjem pod znižanim tlakom, nato pa trden ostanek raztopili v 50 mL diklorometana in 40 mL nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub>. Fazi smo ločili in organsko fazo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, prefiltrirali ter topilo odstranili z odsesavanjem pod znižanim tlakom in dobili 625 mg spojine **8**.

**PRODUKT:**

**Izgled:** rjavkast amorfen prašek

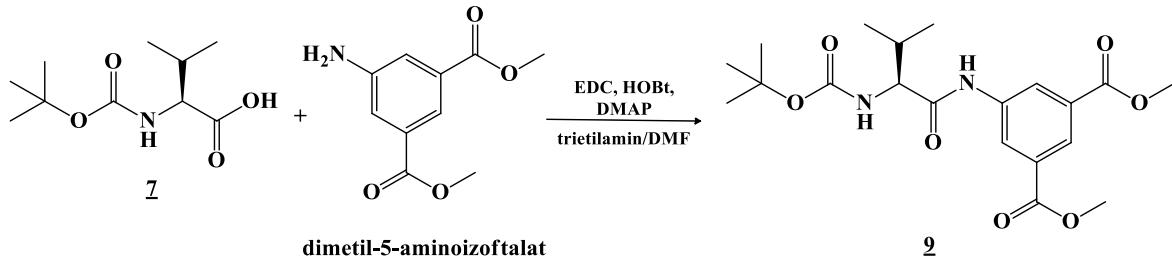
**Izkoristek:** 69 %

**Rf:** 0,75 (Mf: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9/1)

**Referanca za spojino 8:** [91]

### 4.2.3 SINTEZA DIMETIL (S)-5-((TERC-BUTOXIKARBONIL)AMINO)-3-METILBUTANAMIDOIZOFATALATA (**9**)

REAKCIJA:



**POSTOPEK:**

V 50 mL bučko smo najprej natehtali 0,649 g dimetil 5-aminoizoftalata (3,1 mmol; 1 eq), ga raztopili v DMF (3 mL) in 1,3 mL trietylamina (9,3 mmol; 3 eq), nato pa dodali še 0,673 g spojine **7** (3,1 mmol; 1 eq), 0,595 g EDC (3,1 mmol; 1 eq), 0,419 g HOBr (3,1 mmol; 1 eq) in nekaj kristalov DMAP (katalitična količina) ter reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi. Po 48 urah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali konec reakcije ter izvedli izolacijo. Reakcijsko zmes smo zlili na približno 100 mL vode, nato pa vodno fazo ekstrahirali z etil acetatom (3 × 50 mL). Združene organske faze smo sprali z 1M HCl (2 × 30 mL), enkrat 30 mL vode, nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 30 mL) in enkrat 30 mL nasičene raztopine NaCl. Ker smo s tankoplastno kromatografijo zaznali izgubo produkta v kisli vodni fazi, smo jo reekstrahirali s 50 mL etil acetata, ga sprali s 30 mL 1M HCl, 30 mL nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub> in 30 mL nasičene raztopine NaCl. Združene organske faze smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, prefiltrirali in topilo odstranili z odsesavanjem pod znižanim tlakom ter dobili 100 mg spojine **9**.

**PRODUKT:**

**Izgled:** okrast amorfen prašek

**Izkoristek:** 8 %

**Rf:** 0,76 (Mf: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9/1)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**

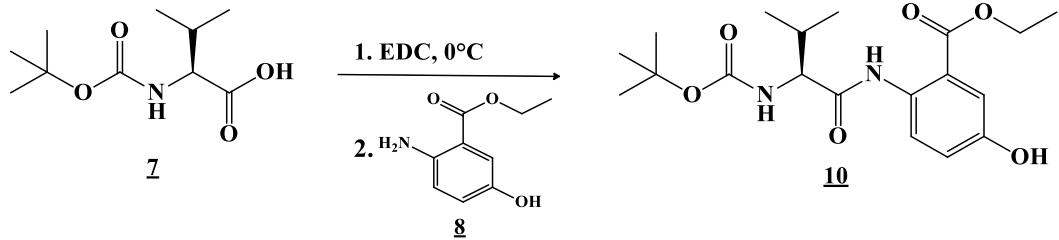
$\delta$  [ppm] = 0.98–1.01 (m, 3H, 2 × CH<sub>3</sub>-Val), 1.43 (s, 9H, O*t*Bu), 2.09–2.13 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.84 (s, 6H, 2 × OCH<sub>3</sub>), 4.21 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz,  $\alpha$ -CH), 5.51

(d, 1H,  $J = 8.4$  Hz, NH), 8.22–8.31 (m, 2H,  $2 \times$  H-Ar), 8.47 (s, 1H, H-Ar), 9.50 (s, 1H, NH-Ar)

**MS (ESI):** m/z (%) = 409,2 [M+H]<sup>+</sup>

#### 4.2.4 SINTEZA ETIL (S)-2-((TERC-BUTOXIKARBONIL)AMINO)-3-METILBUTANAMIDO-5-HIDROKSIBENZOATA (**10**)

REAKCIJA:



#### POSTOPEK:

V 50 mL bučko smo najprej natehtali 0,217 g spojine **7** (1,0 mmol; 1 eq), jo raztopili v približno 5 mL diklorometana in na ledeni kopeli ohladili na 0 °C. Nato smo dodali 0,096 g EDC (0,5 mmol; 0,5 eq) in reakcijsko zmes na sobni temperaturi mešali 3 ure, nakar smo dodali še 0,091 g spojine **8** (0,5 mmol; 0,5 eq), 1 mL THF ter reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi čez noč. Ker po 24 urah reakcija še ni potekla do konca, smo reakcijsko zmes prestavili na oljno kopel in segrevali pri 50 °C. Po 24 urah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali konec reakcije ter izvedli izolacijo. Reakcijski zmesi smo dodali 50 mL diklorometana in ga spirali z 1M HCl (4 × 20 mL), enkrat 20 mL vode, enkrat 20 mL nasičene raztopino NaHCO<sub>3</sub> in enkrat 20 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo nato posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, prefiltrirali in topilo odstranili z odsesavanjem pod znižanim tlakom ter dobili 66 mg spojine **10**.

#### PRODUKT:

**Izgled:** okrast amorfen prašek

**Izkoristek:** 35 %

**Rf:** 0,56 (Mf: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9/1)

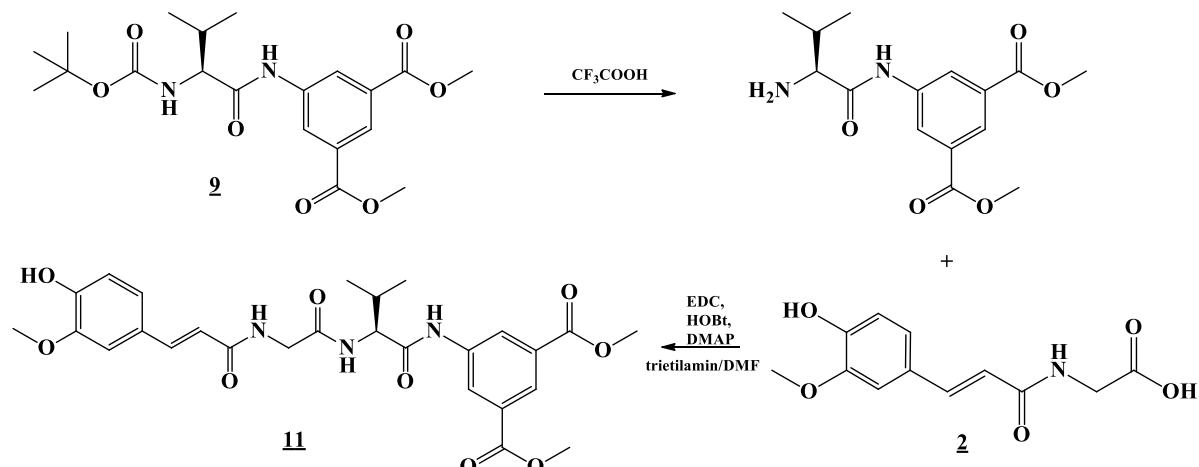
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  [ppm] = 0.93–1.01 (m, 6H, 2 × CH<sub>3</sub>-Val), 1.31–1.46 (m, 12H, O*t*Bu in CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.24–2.29 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.10–4.14 (m, 1H,  $\alpha$ -CH), 4.26–4.31 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 5.23 (d, 1H,  $J$  = 8.4 Hz, NH), 6.96–6.98 (m, 1H, H-Ar), 7.41–7.44 (m, 1H, H-Ar), 8.02 (br s, 1H, OH), 8.42 (d, 1H,  $J$  = 8.8 Hz, H-Ar), 11.20 (s, 1H, NH-Ar)

**MS (ESI):** m/z (%) = 379,2 [M-H]<sup>+</sup>

**4.2.5 SINTEZA DIMETIL (*S,E*)-5-(2-(2-(3-(4-HIDROKSI-3-METOKSIFENIL)AKRILAMIDO)ACETAMIDO)-3-METILBUTANAMIDO)IZOFTALATA (11)**

REAKCIJA:



**POSTOPEK:**

V 50 mL bučko smo najprej natehtali 0,093 g spojine **9** (0,228 mmol; 1 eq), jo raztopili v približno 5 mL diklorometana, raztopino na ledeni kopeli ohladili na 0°C in potem po kapljicah dodali 1 mL trifluorocetne kisline (TFA; prebitna količina; (13 mmol; 57 eq)). Nato smo ledeno kopel odstavili in reakcijsko zmes 3 ure mešali pri sobni temperaturi, dokler nismo s tankoplastno kromatografijo zaznali konca reakcije. Topilo smo nato odstranili z odsesavanjem pod znižanim tlakom, nato pa oljnati preostanek dvakrat trituirali s po 10 mL dietil etra, potem pa eter previdno oddekantirali. Trden preostanek smo raztopili v 1,5 mL DMF, dodali 0,189 mL trietylamina (1,368 mmol; 6 eq), 0,057 g spojine **2** (0,228 mmol; 1 eq), 0,044 g EDC (0,228 mmol; 1 eq), 0,031 g HOBr (0,228

mmol; 1 eq) in nekaj kristalov DMAP (katalitična količina) ter reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi. Po 72 urah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali konec reakcije ter izvedli izolacijo. Reakcijsko zmes smo zlili na približno 35 mL vode, nato pa vodno fazo ekstrahirali z diklorometanom ( $4 \times 20$  mL). Združene organske faze smo sprali z 1M HCl ( $4 \times 20$  mL), vodo ( $3 \times 50$  mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> ( $2 \times 20$  mL) in enkrat 20 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, prefiltrirali in topilo odstranili z odsesavanjem pod znižanim tlakom. Surov produkt smo očistili še s pomočjo kolonske kromatografije in dobili 88 mg spojine **11**.

## PRODUKT:

**Izgled:** jantaren amorfen prašek

**Izkoristek:** 71 %

**Tališče:** 122 – 126 °C

**Rf:** 0,49 (Mf: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9/1)

### **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  [ppm] = 0.97–1.25 (m, 6H, 2 × CH<sub>3</sub>-Val), 2.21–2.33 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.77 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.84 (s, 6H, 2 × OCH<sub>3</sub>), 4.22–4.27 (m, 1H, NHCH<sub>2A</sub>), 4.37–4.42 (m, 1H, NHCH<sub>2B</sub>), 4.79–4.83 (m, 1H,  $\alpha$ -CH), 6.52 (d, 1H,  $J$  = 16.0 Hz, CH=CH), 6.76 (d, 1H,  $J$  = 8.0 Hz, NH), 6.90–6.97 (m, 2H, 2 x H-Ar), 7.61 (d, 1H,  $J$  = 16.4 Hz, CH=CH), 7.68 (s, 1H, H-Ar), 7.81 (d, 1H,  $J$  = 8.8 Hz, NH), 8.35 (s, 1H, H-Ar), 8.57–8.59 (m, 2H, 2 x H-Ar), 9.96 (s, 1H, NH-Ar)

### **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  [ppm] = 18.53, 19.28, 28.05, 32.01, 52.42, 55.71, 59.27, 110.27, 114.64, 117.69, 121.73, 125.12, 126.23, 127.31, 131.13, 131.25, 138.62, 141.68, 146.58, 147.36, 165.80, 165.93, 167.39, 169.91, 170.66

**MS (ESI):** m/z (%) = 542,2 [M+H]<sup>+</sup>

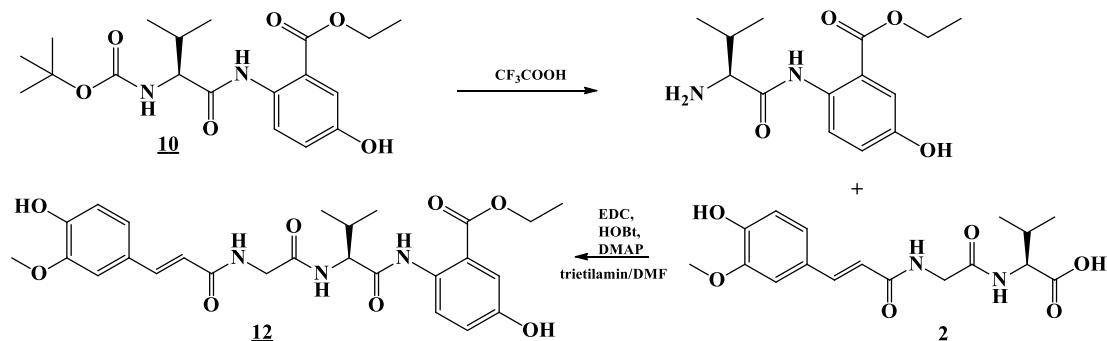
**IR (ATR):**  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = 3276, 2361, 1725, 1651, 1601, 1513, 1436, 1340, 1244, 1123, 1031, 812, 756, 721, 669

**HPLC (254 nm):** 94,7%, t<sub>r</sub> = 10,67 min.

**HRMS:** Izračunano za C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub> m/z: 542,2139 [M+H]<sup>+</sup>, izmerjeno 542,2128.

#### **4.2.6 SINTEZA ETIL (S,E)-5-HIDROKSI-2-(2-(3-(4-HIDROKSI-3-METOKSIFENIL)AKRILAMIDO)ACETAMIDO)-3-METILBUTANAMIDO) BENZOATA (12)**

REAKCIJA:



POSTOPEK:

V 50 mL bučko smo najprej natehtali 0,066 g spojine **10** (0,174 mmol; 1 eq), jo raztopili v približno 5 mL diklorometana, raztopino na ledeni kopeli ohladili na 0°C in potem po kapljicah dodali 1 mL trifluorocetne kisline (13 mmol; 75 eq). Nato smo ledeno kopel odstavili in reakcijsko zmes 3 ure mešali pri sobni temperaturi, dokler nismo s tankoplastno kromatografijo zaznali konca reakcije. Topilo smo nato odstranili z odsesavanjem pod znižanim tlakom, nato pa oljnati preostanek dvakrat trituirali s po 10 mL dietil etra, potem pa eter odpareli pod znižanim tlakom. Trden preostanek smo nadalje raztopili v 1 mL DMF, dodali 0,144 mL trietilamina (1,044 mmol; 6 eq), 0,044 g spojine **2** (0,174 mmol; 1 eq), 0,033 g EDC (0,174 mmol; 1 eq), 0,024 g HOBr (0,174 mmol; 1 eq) in nekaj kristalov DMAP (katalitična količina) ter reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi. Po 48 urah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali konec reakcije ter izvedli izolacijo. Reakcijsko zmes smo zlili na približno 35 mL vode, nato pa vodno fazo ekstrahirali z diklorometanom (4 × 20 mL). Združene organske faze smo sprali z 1M HCl (4 × 20 mL), enkrat 20 mL vode, nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 20 mL) in enkrat 20 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, prefiltrirali in topilo odstranili z odsesavanjem pod znižanim tlakom ter dobili 50 mg spojine **12**.

PRODUKT:

**Izgled:** okrast amorfen prašek

**Izkoristek:** 56 %

**Tališče:** 116 – 120 °C

**R<sub>f</sub>:** 0,47 (Mf: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9/1)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD):**

$\delta$  [ppm] = 0.96–1.00 (m, 6H, 2 × CH<sub>3</sub>-Val), 1.32 (t, 3H,  $J$  = 7.2 Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>),  
2.27–2.36 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.18 (s, 2H, NHCH<sub>2</sub>),  
4.28–4.35 (m, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> in  $\alpha$ -CH), 6.48 (d, 1H,  $J$  = 15.6 Hz,  
CH=CH), 6.74 (d, 1H,  $J$  = 8.4 Hz, H-Ar), 6.95–7.00 (m, 2H, 2 × H-Ar),  
7.08 (d, 1H,  $J$  = 2.0 Hz, H-Ar), 7.39 (d, 1H,  $J$  = 3.2 Hz, H-Ar), 7.43 (d,  
1H,  $J$  = 15.6 Hz, CH=CH), 8.30 (d, 1H,  $J$  = 9.2 Hz, H-Ar)

**<sup>13</sup>C NMR (100MHz, MeOD):**

$\delta$  [ppm] = 14.47, 18.07, 19.84, 31.29, 43.80, 56.38, 61.75, 62.77, 111.57, 116.47,  
117.59, 118.20, 119.25, 122.21, 123.38, 123.42, 128.14, 133.65, 142.76,  
149.30, 150.02, 154.53, 169.12, 169.57, 171.63, 172.51

**MS (ESI):** m/z (%) = 514,2 [M+H]<sup>+</sup>

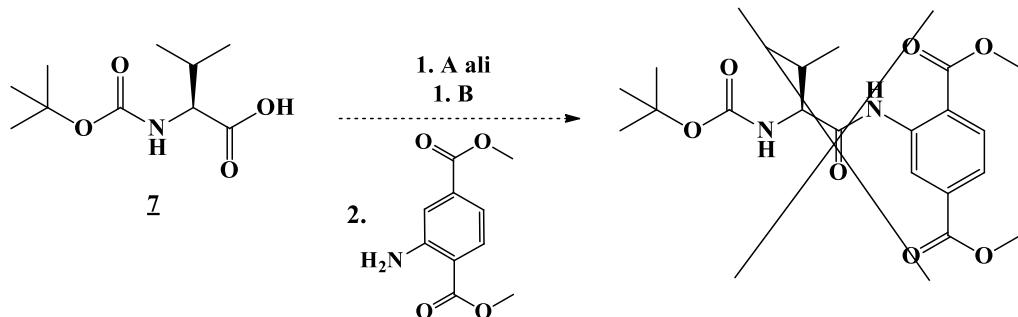
**IR (ATR):**  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = 3286, 2361, 2342, 1652, 1589, 1513, 1436, 1229, 1123, 1078, 1028,  
977, 820, 787, 754, 669, 609

**HPLC (254 nm):** 96,3%, t<sub>r</sub> = 8,02 min.

**HRMS:** Izračunano za C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub> m/z: 514,2189 [M+H]<sup>+</sup>, izmerjeno 514,2178.

## 4.2.7 POSKUS SINTEZE DIMETIL (S)-2-((TERC-BUTOXIKARBONIL)AMINO)-3-METILBUTANAMIDO)TEREFTALATA

REAKCIJA:



**A: DKM, 0,5 eq EDC x HCl (3 ure; sobna T)**

**B: acetonitril, TCT, trietilamin (2,5 ure; sobna T)**

### POSTOPEK A:

V 10 mL bučko smo najprej natehtali 0,416 g spojine **7** (1,92 mmol; 1 eq), jo raztopili v približno 5 mL diklorometana in na ledeni kopeli ohladili na 0 °C. Nato smo dodali 0,184 g EDC × HCl (0,96 mmol; 0,5 eq) in reakcijsko zmes na sobni temperaturi mešali 3 ure, nakar smo dodali še 0,201 g dimetil aminotereftalata (0,96 mmol; 0,5 eq) ter reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi čez noč. Po 18 urah smo izvedli izolacijo po naslednjem postopku: reakcijski zmesi smo dodali 30 mL diklorometana in ga spirali z 1M HCl (4 × 20 mL), enkrat 20 mL vode, nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 20 mL) in enkrat 20 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo nato posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, prefiltrirali in topilo odstranili z odsesavanjem pod znižanim tlakom. Niti po pretečenem času aktivacije (prvih 3 urah) niti po izolaciji nismo s tankoplastno kromatografijo zaznali nastanka želenega produkta.

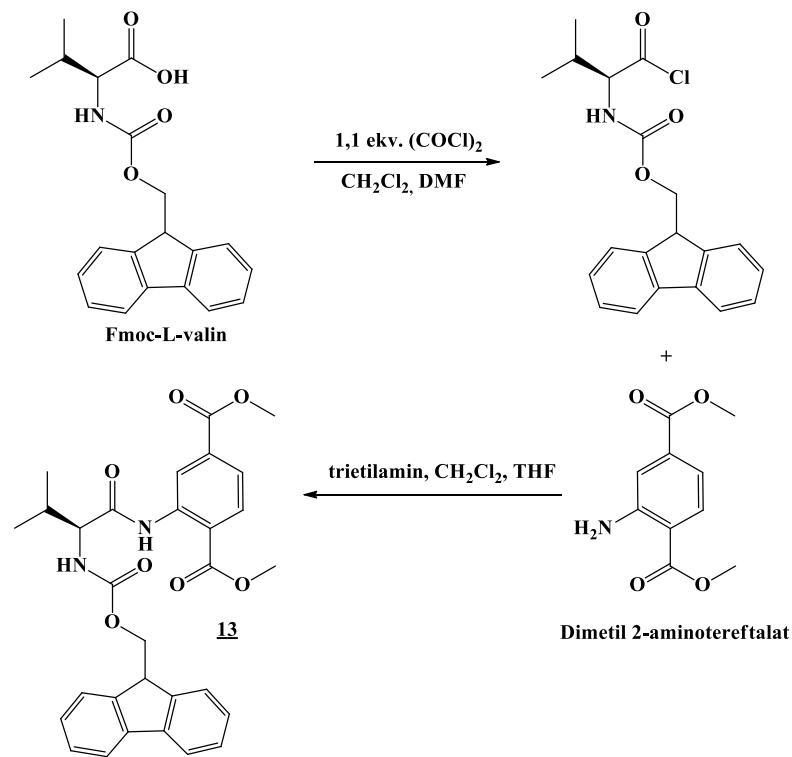
### POSTOPEK B:

V 10 mL bučko smo najprej natehtali 0,257 g Boc-valina (1,18 mmol; 1 eq), ga raztopili v 5 mL acetonitrila, dodali 0,33 mL trietilamina (2,37 mmol; 2 eq) in 0,218 g triklorotiazina (TCT; 1,18 mmol; 1 eq) ter reakcijsko zmes na sobni temperaturi mešali 1 uro, nakar smo dodali še 0,246 g dimetil aminotereftalata (1,18 mmol; 1 eq) ter reakcijsko zmes nadalje mešali pri sobni temperaturi. Po 2,5 urah smo izvedli izolacijo po naslednjem postopku:

najprej smo odnučali oborino 1 in jo sprali s 3 mL acetonitrila, ki smo ga skupaj s prejšnjim filtratom (od oborine 1) nato odparili pod znižanim tlakom. Potem smo suh preostanek raztopili v 30 mL diklorometana in ga spirali z nasičeno raztopino  $\text{NaHCO}_3$  ( $2 \times 20$  mL), 1M HCl ( $4 \times 20$  mL) in enkrat 20 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo posušili z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , prefiltrirali in topilo odstranili z odsesavanjem pod znižanim tlakom ter dobili oborino 2, ki pa je žal predstavljala stranski produkt, cianurično kislino, želenega produkta pa nismo uspeli sintetizirati.

#### **4.2.8 SINTEZA DIMETIL (S)-2-(2-((9H-FLUOREN-9-IL)METOKSI)KARBONIL)AMINO)-3-METILBUTANAMIDO) TEREFTALATA (13)**

REAKCIJA:



#### **POSTOPEK:**

V 50 mL bučko smo najprej natehtali 0,679 g Fmoc-L-valina (2 mmol; 1 eq), ga raztopili v 10 mL diklorometana, raztopino na ledeni kopeli ohladili na  $0^\circ\text{C}$  in potem po kapljicah dodali 189  $\mu\text{L}$  oksaliklorida (2,2 mmol; 1,1 eq). Po celotnem dodatku smo dodali še

kapljico DMF (katalitična količina), ledeno kopel odstavili, nato pa reakcijsko zmes še za 3 ure na oljni kopeli segrevali pri 40 °C. Nato smo s tankoplastno kromatografijo potrdili, da se je kislina kvantitativno pretvorila do ustreznegra kislinskega klorida. V drugo 50 mL bučko smo nato natehtali 0,418 g dimetil 2-aminotereftalata (2 mmol; 1 eq) in ga raztopili v zmesi 5 mL trietilamina, 2 mL diklorometana in 1 mL THF ter raztopino na ledeni kopeli ohladili na 0 °C. V to bučko smo nato po kapljicah dodali predhodno pripravljeno raztopino kislinskega klorida v diklorometanu in reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi. Po 48 urah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali konec reakcije ter izvedli izolacijo. Najprej smo odparili topilo pod znižanim tlakom, nato pa suh preostanek raztopili v 40 mL diklorometana in ga spirali z 1M HCl (4 × 20 mL), enkrat 20 mL vode, nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 20 mL) in enkrat 20 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, prefiltrirali in topilo odstranili z odsesavanjem pod znižanim tlakom ter dobili 286 mg spojine **13**.

## **PRODUKT:**

**Izgled:** jantaren amorfni prašek

**Izkoristek:** 27 %

**Rf:** 0,23 (Mf: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9/1)

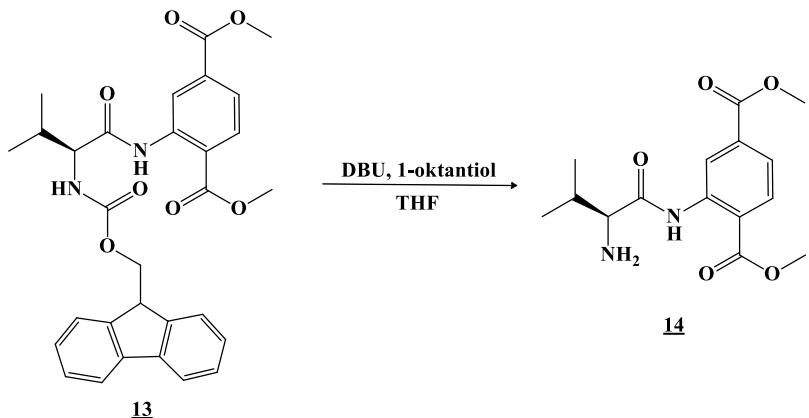
## **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  [ppm] = 1.00–1.08 (m, 3H, 2 × CH<sub>3</sub>-Val), 2.34–2.42 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.86 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.94 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.25–4.40 (m, 3H, CH in OCH<sub>2</sub>), 4.47–4.51 (m, 1H,  $\alpha$ -CH), 5.53 (d, 1H,  $J$  = 8.4 Hz, NH), 7.28–7.32 (m, 2H, 2 × H-Ar), 7.37–7.42 (m, 2H, 2 × H-Ar), 7.62–7.68 (m, 2H, 2 × H-Ar), 7.75–7.76 (m, 3H, 3 × H-Ar), 8.09 (d, 1H,  $J$  = 8.4 Hz, H-Ar), 9.36 (d, 1H,  $J$  = 1.2 Hz, NH-Ar), 11.49 (s, 1H, NH-Ar)

**MS (ESI):** m/z (%) = 531,2 [M+H]<sup>+</sup>

## 4.2.9 SINTEZA DIMETIL (S)-2-(2-AMINO-3-METILBUTANAMIDO) TEREFTALATA (14)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

V 10 mL bučko smo natehtali 0,210 g spojine 13 (0,40 mmol; 1 eq), jo raztopili v 5 mL THF, nato pa v raztopino dodali najprej 0,7 mL 1-oktantiola (4,00 mmol; 10 eq; 97% reagent) in nato še 12,2  $\mu$ L DBU (0,08 mmol; 0,2 eq; 98% reagent) ter pustili mešati na sobni temperaturi. Po 3 urah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali konec reakcije ter izvedli izolacijo. Najprej smo pod znižanim tlakom odparili topilo, nato pa preostanek s konsistenco gela tritirirali z dietil etrom (5 mL) in petrol etrom (5 mL). Izpadlo belo oborino smo odilftrirali s presesavanjem, posušili in dobili 58 mg spojine 14. Celotno količino sintetizirane surove spojine smo takoj uporabili pri naslednji reakciji.

PRODUKT:

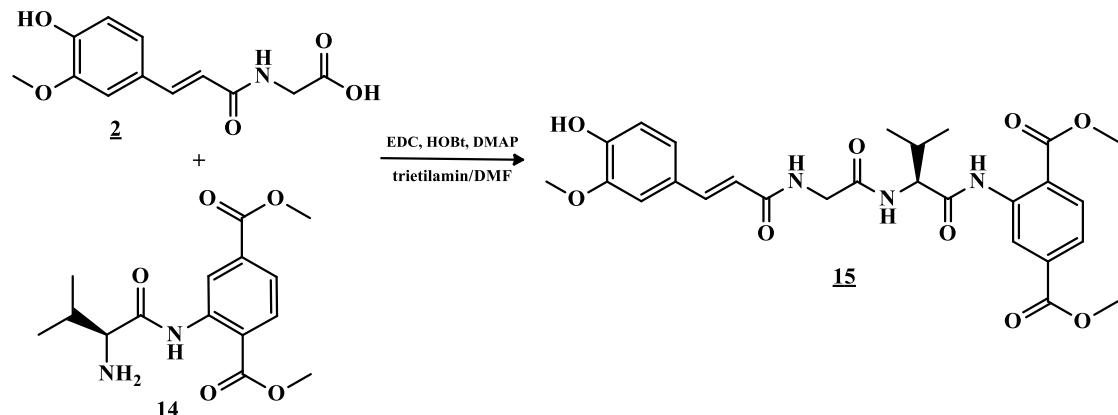
**Izgled:** bel amorfen prašek

**Izkoristek:** 47 %

**R<sub>f</sub>:** 0,48 (Mf: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9/1)

#### **4.2.10 SINTEZA DIMETIL (S,E)-2-(2-(2-(3-(4-HIDROKSI-3-METOKSIFENIL)AKRILAMIDO)ACETAMIDO)-3-METILBUTANAMIDO)TEREFTALATA (15)**

REAKCIJA:



**POSTOPEK:**

V 25 mL bučko smo najprej natehtali 0,058 g spojine 14 (0,19 mmol; 1 eq), jo raztopili v DMF (1 mL) in 0,158 mL trietilamina (1,14 mmol; 6 eq), nato pa dodali še 0,048 g spojine 2 (0,19 mmol; 1 eq), 0,036 g EDC (0,19 mmol; 1 eq), 0,026 g HOBr (0,19 mmol; 1 eq) in nekaj kristalov DMAP ter reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi. Po 120 urah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali konec reakcije ter izvedli izolacijo. Reakcijsko zmes smo zlili na približno 35 mL vode, nato pa vodno fazo ekstrahirali z diklorometanom (4 × 20 mL). Združene organske faze smo sprali z 1M HCl (4 × 20 mL), enkrat 20 mL vode, nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 20 mL) in enkrat 20 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, prefiltrirali in topilo odstranili z odsesavanjem pod znižanim tlakom. Surov produkt smo očistili še s pomočjo kolonske kromatografije in dobili 28 mg spojine 18.

**PRODUKT:**

**Izgled:** jantaren amorfen prašek

**Izkoristek:** 27 %

**Tališče:** 109 – 113 °C

**R<sub>f</sub>:** 0,58 (Mf: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9/1)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  [ppm] = 1.00–1.04 (m, 6H, 2 × CH<sub>3</sub>-Val), 2.36–2.44 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.85 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.88 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.90 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.27–4.38 (m, 1H, NHCH<sub>2</sub>), 4.52–4.56 (m, 1H,  $\alpha$ -CH), 6.32 (d, 1H,  $J$  = 15.6 Hz, CH=CH), 6.83 (d, 1H,  $J$  = 8.0 Hz, H-Ar), 6.92–6.96 (m, 2H, H-Ar), 7.07–7.09 (m, 1H, NHCH<sub>2</sub>), 7.50 (d, 1H,  $J$  = 15.6 Hz, CH=CH), 7.59 (d, 1H,  $J$  = 7.6 Hz, NH), 7.68 (dd, 1H,  $J$  = 8.0 Hz,  $J$  = 2.0 Hz, H-Ar), 7.98 (d, 1H,  $J$  = 8.8 Hz, H-Ar), 9.31 (s, 1H, OH), 11.44 (s, 1H, NH-Ar)

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$  [ppm] = 17.66, 19.45, 30.68, 43.82, 52.61, 52.81, 55.92, 60.08, 109.58, 114.70, 117.22, 118.33, 121.11, 122.40, 123.59, 127.05, 130.91, 135.31, 140.76, 141.87, 146.73, 147.61, 166.01, 166.93, 167.99, 170.06, 170.28\*

**MS (ESI):** m/z (%) = 542,2 [M+H]<sup>+</sup>

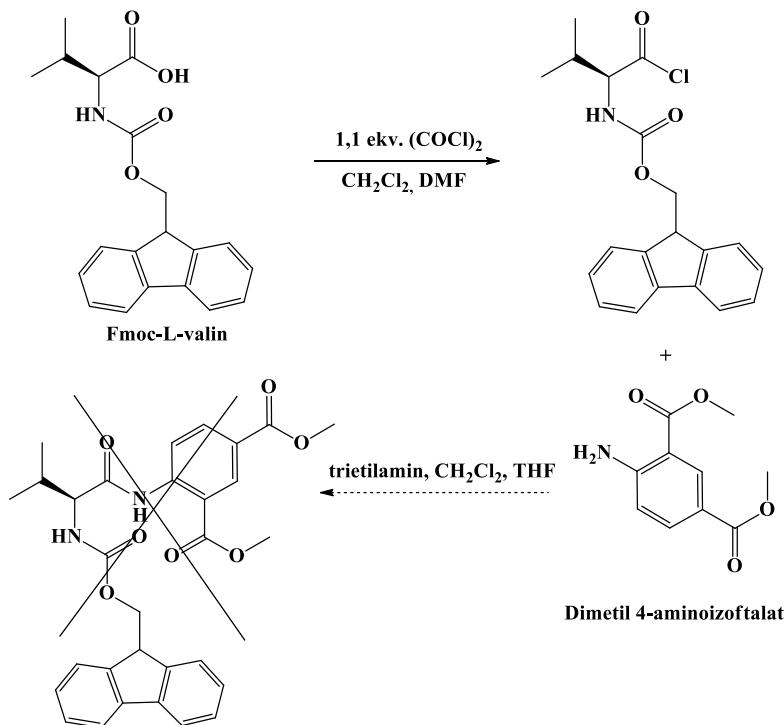
**IR (ATR):**  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = 3287, 2361, 2341, 1647, 1582, 1514, 1418, 1247, 1110, 1082, 1030, 984, 848, 811, 754, 669

**HPLC (254 nm):** 96,7%, t<sub>r</sub> = 12,11 min.

**HRMS:** Izračunano za C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub> m/z: 542,2139 [M+H]<sup>+</sup>, izmerjeno 542,2129.

## 4.2.11 POSKUS SINTEZE DIMETIL (S)-4-((9H-FLUOREN-9-IL)METOKSI)KARBONILAMINO)-3-METILBUTANAMIDO)IZOFTALATA

REAKCIJA:



### POSTOPEK:

V 25 mL bučko smo najprej natehtali 0,340 g Fmoc-L-valina (1 mmol; 1 eq), ga raztopili v 5 mL diklorometana, raztopino na ledeni kopeli ohladili na 0 °C in potem po kapljicah dodali 95  $\mu\text{L}$  oksaliklorida (1,1 mmol; 1,1 eq). Po celotnem dodatku smo dodali še kapljico DMF (katalitična količina), ledeno kopel odstavili, nato pa reakcijsko zmes še za 3 ure na oljni kopeli segrevali pri 50 °C. Nato smo s tankoplastno kromatografijo potrdili, da se je kislina kvantitativno pretvorila do ustreznega kislinskega klorida. V drugo 25 mL bučko smo nato natehtali 0,209 g dimetil 2-aminotereftalata (1 mmol; 1 eq) in ga raztopili v zmesi 3 mL trietylamina, 2 mL diklorometana in 1 mL THF ter raztopino na ledeni kopeli ohladili na 0 °C. V to bučko smo nato po kapljicah dodali predhodno pripravljeno raztopino kislinskega klorida v diklorometanu in reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi. Po 48 urah s tankoplastno kromatografijo nismo zaznali nastanka produkta, zato smo reakcijo prekinili in s pomočjo kolonske kromatografije regenerirali uporabljeni amin.

## 5 REZULTATI IN RAZPRAVA

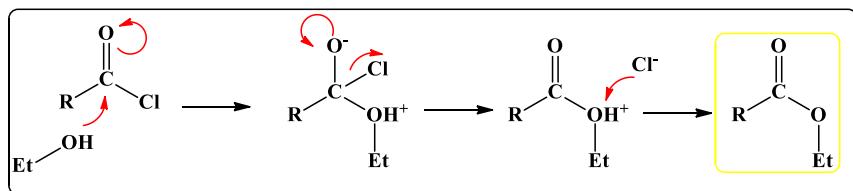
### 5.1 Uporaba klorirnih reagentov pri sintezi etilnih estrov (sinteza spojin 3 in 8) in sintezi peptidne vezi preko tvorbe kislinskega klorida (sinteza spojine 13)

#### 5.1.1 Tvorba kislinskega klorida in esterifikacija

2-amino-5-hidroksibenzojsko kislino in L-valin smo pred neželenimi reakcijami na karboksilni skupini zaščitili tako, da smo ju pretvorili v etilna estra. Obstaja dosti različnih načinov esterifikacije, navadno se uporablja kislinska/bazična kataliza v prisotnosti alkohola, a so te reakcije dolgotrajnejše, izkoristki so majhni, prav tako pa esterifikacije aromatskih karboksilnih kislin s prisotnimi fenolnimi in/ali aminskimi skupinami niso vedno kemoselektivne (potek reakcije samo na želeni funkcionalni skupini). Ker smo imeli opravka z 2-amino-5-hidroksibenzojsko kislino in L-valinom, smo v prvem primeru žeeli doseči kemoselektivnost reakcije, pri drugem pa ohraniti želeno optično sučnost. Iz teh razlogov smo uporabili metodo esterifikacije s tionil kloridom ( $\text{SOCl}_2$ ), ki se je v literaturi izkazala za zelo učinkovito, z izkoristki med 46 % in 93 % za etilne estre substituiranih aromatskih karboksilnih kislin, nižji izkoristki se sicer pojavljajo pri *ortho*-substituiranih derivatih, kar lahko pripišemo nastanku intramolekularnih H-vezi [92]. V primeru esterifikacije L-valina pa so izkoristki še višji, med 90 % in 100 % [93].

$\text{SOCl}_2$  je močan klorirni reagent in karboksilne kisline pretvori v kislinske kloride. Na začetku pride do napada kisika na žveplo, kar povzroči odcep kloridnega aniona, ta pa nato napade elektrofilni karbonilni ogljik. Nastali intermedijat je nestabilen, odcepita se  $\text{SO}_2$  in kloridni anion, ki nato odcepi proton, da se tvorita  $\text{HCl}$  in želen kislinski klorid (slika 12). Nastali kislinski kloridi pa so zaradi prisotnosti elektron-privlačne skupine (klora) zraven elektrofilnega karbonilnega ogljika, ki je tako bolj dovezten za napad nukleofila, manj resonančno stabilizirani in zatorej reaktivnejši od pripadajočih kislin. Nadalje lahko reagirajo z najrazličnejšimi nukleofili (nukleofilna substitucija). V našem primeru smo kot topilo uporabili absolutni etanol, ki je bil tako v vlogi topila kot tudi nukleofila (hidroksilna skupina) ter je tako s kislinskim kloridom potekla esterifikacija pri temperaturi refluksa [84, 85]. Pri tej reakciji pride najprej do napada kisika v hidroksilni skupini alkohola na močno elektrofilen karbonilni ogljik kislinskega klorida, odcepi se kloridni

anion, ki nato v drugem koraku odcepi proton, tvorita se HCl ter želen ester. Mehanizem je predstavljen na sliki 11.

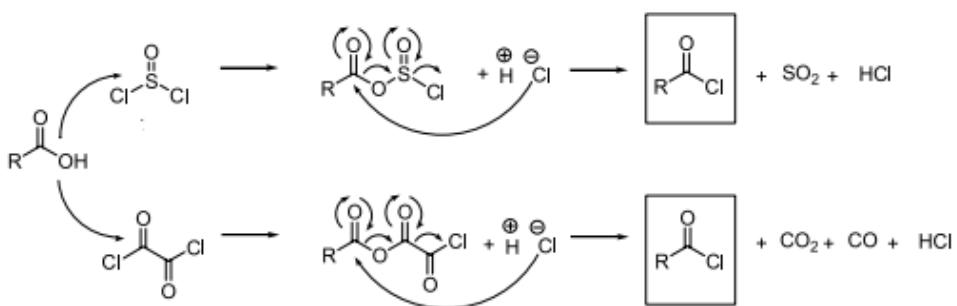


Slika 11: Mehanizem sinteze etilnih estrov iz kislinskega klorida in etanola, pritejeno po [95]

Po končani reakciji smo izvedli enostavno izolacijo, kjer smo najprej pod znižanim tlakom odpareli topilo, nato pa trden ostanek suspendirali v dietil etru, s čimer smo se znebili nezreagiranega tionil klorida, produkt pa se je izoboril. Pri reakciji ni bilo opaziti kakšnih posebnosti, pri esterifikaciji 2-amino-5-hidroksibenzojske kisline je bil izkoristek reakcije 69 %, pri L-valinu pa 62 %. Pri prvem primeru bi lahko izgube pripisali ali izolaciji ali pa že prej omenjenemu nastanku intramolekularnih H-vezi, pri drugem pa je izkoristek slabši najverjetnejše zaradi izgub pri izolaciji.

### 5.1.2 Tvorba kislinskega klorida z uporabo oksalil klorida in sinteza peptidne vezi

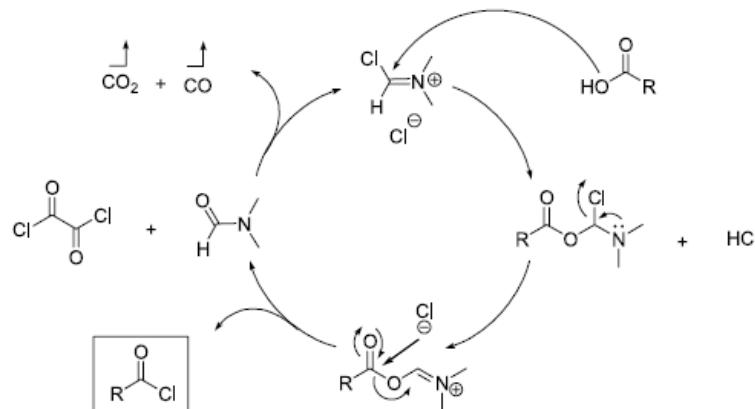
Tako kot  $\text{SOCl}_2$  tudi oksalil klorid,  $(\text{COCl})_2$ , spada med klorirne reagente, ki iz karboksilnih kislin tvorijo kislinske kloride, a pri uporabi le-tega je potrebna posebna pazljivost zaradi sproščanja ogljikovega monoksida, ki predstavlja določeno varnostno tveganje. Hkrati ima uporaba klorirnih reagentov dodatno pomanjkljivost zaradi tvorbe HCl, kar predstavlja problem predvsem pri substratih, občutljivih na kisle pogoje, med



Slika 12: Mehanizma tvorbe kislinskih kloridov z uporabo tionil klorida (zgornja shema) in oksalil klorida (spodnja shema) [96]

drugim pri Boc-zaščitenih aminih, kjer lahko pride do odščite zaščitne skupine. Mehanizem tvorbe kislinskega klorida s pomočjo  $(\text{COCl})_2$  je prikazan na sliki 12. V našem

primeru smo želeli aktivirati karboksilno skupino Fmoc-L-valina, ki smo mu dodali 1,1 eq  $(COCl)_2$ . Dodatno pri reakciji pomaga dodatek kapljice DMF, ki deluje kot katalizator in pospeši hitrost reakcije (slika 13), saj prav tako reagira z oksalil kloridom in tvori aktivirano zvrst, ki nato reagira s karboksilno kislino, ta adukt pa v nadalnjih korakih razpade na želen kislinski klorid in DMF, ki lahko ponovno vstopi v cikel [96].



**Slika 13:** Katalitična vloga DMF; reakcija z oksalil kloridom, nastanek aktivirane zvrsti, reakcija s karboksilno kislino, tvorba kislinskega klorida in regeneracija DMF [96]

Dodatek  $(COCl)_2$  smo izvajali pri  $0\text{ }^\circ C$ , saj je reakcija močno eksotermna, nato pa reakcijsko zmes še 3 ure segrevali na oljni kopeli pri  $40\text{ }^\circ C$ . Ko smo s tankoplastno kromatografijo potrdili, da se je kislina kvantitativno pretvorila do ustreznega kislinskega klorida, izolacije nismo izvajali, saj smo z reakcijsko zmesjo takoj prešli v drug del reakcije – sklapljanje z dimetil aminoterftalatom (DMATF). Kot topila smo uporabili diklorometan, THF (zaradi slabe topnosti) in trietilamin, ki je imel dodatno funkcijo, kot nenukleofilna baza je deloval kot »past« za sproščeno HCl. Izkoristek reakcije je bil nizek (27 %), a glede na izjemno slabo reaktivnost uporabljenega amina je bilo pomembno predvsem, da je reakcija uspešno potekla. Neuspeli poskusi vezave omenjenega fragmenta (DMATF) so opisani v točki 5.8.

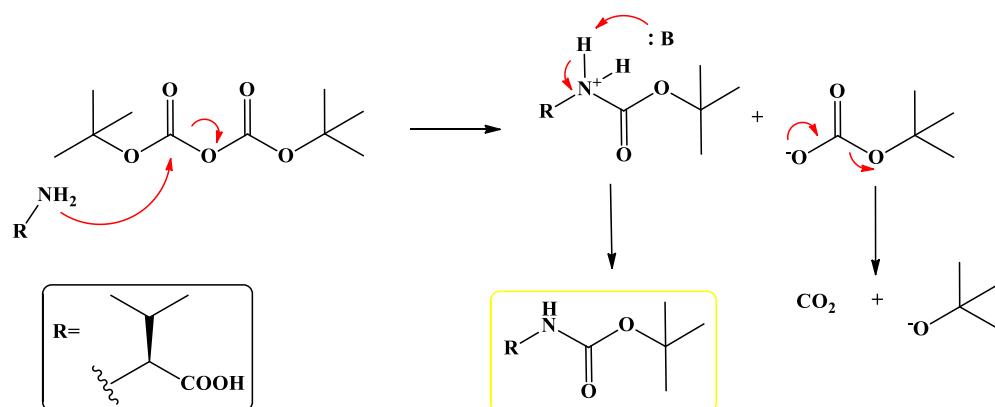
## 5.2 Alkalna hidroliza etilnega estra (sinteza spojin **2** in **5**)

Za nadaljnje reakcije tvorbe peptidnih vezi smo potrebovali odščiteni karboksilni skupini, zato smo izvedli alkalno hidrolizo etilnih estrov, ki predstavlja za razliko od kislinske hidrolize irreverzibilno reakcijo, saj baza kislino pretvori v karboksilatni anion, ki je nezmožen prenosa acilne skupine nazaj na alkohol [94]. Mehanistično gledano pa hidroksilni anion baze napade elektrofilni ogljik estra, tvori se tetraedrični intermediat, ki nato razpade, odcepi se alkoksid, ki odcepi proton vodi, tvorita se alkohol in hidroksilni

anion, ki nastali karboksilni kislini odcepi proton, na koncu pa nastane sol karboksilata in baze. Kot reagent smo uporabili 1M NaOH v absolutnem etanolu (saj tudi pri reakciji nastaja etanol), reakcija je potekala pri sobni temperaturi. Uporabili smo prebitno količino NaOH (4 eq), da ves ester zreagira in ne moti izolacije, za sam potek reakcije pa prebitek ni nujno potreben, saj en mol hidroksida reagira z enim molom estra. Za uspešno izolacijo nastale karboksilne kisline je ključnega pomena nakisanje reakcijske zmesi (do pH 2), da nastalo karboksilatno sol pretvorimo v prosto kislini, ki nato izpade kot oborina ali pa jo ekstrahiramo. Pri sintezi spojine **2** smo dobili 82 % izkoristek po izpadu in sušenju oborine, pri spojni **5** pa 61 %, le da smo pri izolaciji morali nakisano vodno fazo še dodatno ekstrahirati z etilacetatom, kar bi lahko prispomoglo k nižjemu izkoristku.

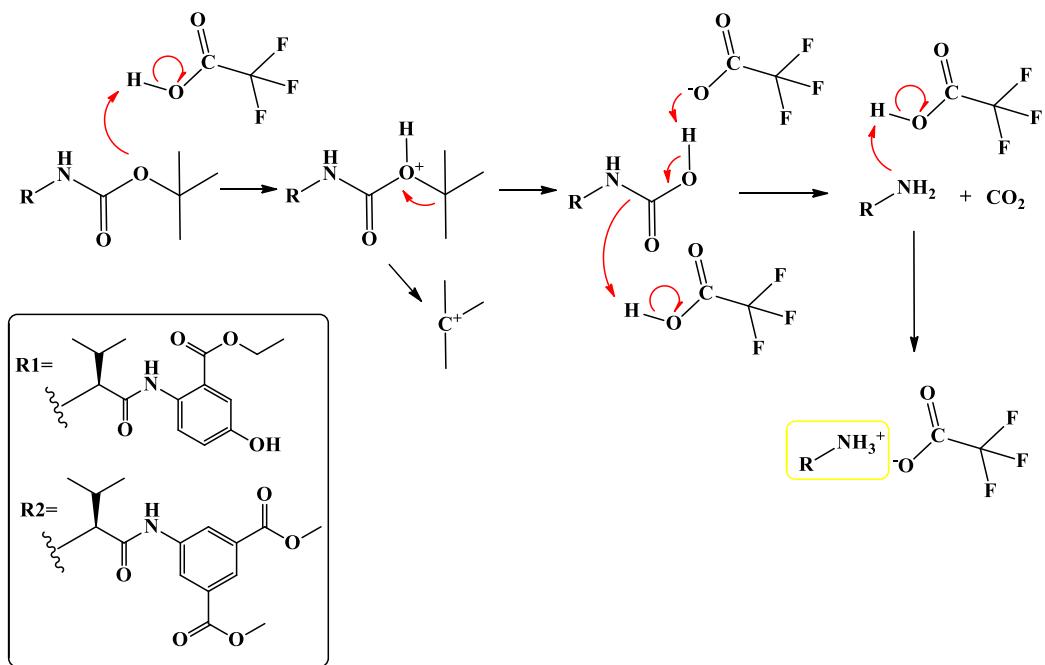
### 5.3 Uvedba in odstranitev *tert*-butil karbamatne zaščite

Zaradi prisotnosti dveh reaktivnih mest v spojini L-valin (amino skupina in karboksilna skupina) smo morali pred nadaljnji reakcijami zaščititi aminsko skupino, da smo lahko na C-konec selektivno pripenjali želene fragmente brez stranskih reakcij na N-koncu. To smo storili z uvedbo *tert*-butilkarbamatne zaščitne skupine (Boc) z uporabo di-*tert*-butil dikarbonata (Boc-anhidrida) v alkalnem mediju pri sobni temperaturi. Lastnosti te zaščite so: stabilnost v prisotnosti baz in nukleofilov, neobčutljivost na katalitsko hidrogeniranje ter relativno enostavna odščita z uporabo TFA. Kot je prikazano na sliki 14, pri tej reakciji nukleofilni dušik na aminu najprej napade elektrofilni karbonilni ogljik na Boc anhidridu, kar povzroči izstop *tert*-butilkarbonata, ki nadalje razpade na CO<sub>2</sub> in *tert*-butanol. Prisotna baza (v našem primeru 1M NaOH, kot baza lahko deluje tudi nastali stranski produkt *tert*-butoksid) pa odcepi proton s protoniranega amina, da nastane želeni produkt, Boc-zaščiteni amin.



Slika 14: Mehanizem uvajanja Boc zaščite, prizadeno po [97]

Pri izolaciji smo se najprej znebili nezreagiranega Boc anhidrida, in sicer z ekstrakcijo alkalne reakcijske zmesi z dietiletrom, nato pa smo morali vodno fazo počasi nakisati do pH 2, da smo pretvorili produkt s prosto karboksilno skupino (Boc-L-valin, spojina 7) iz ionizirane v neionizirano obliko, s čimer smo omogočili ekstrakcijo z etil acetatom, saj so bili ostali reagenti dobro topni v vodi. Reakcija je potekla brez posebnosti, izkoristek je bil 74%, izgube bi lahko pripisali nepazljivosti pri izolaciji, morda je zaradi rahlo premočnega nakisanja prišlo do razpada manjše količine produkta, saj je Boc zaščita v premočno kislem okolju nestabilna in lahko razpade.



Slika 15: Mehanizem odstranjevanja Boc zaščite, pritejeno po [98]

Pri sintezi končnih spojin **11** (**R2**, slika 15) in **12** (**R1**, slika 15) smo morali najprej odstraniti Boc zaščito, da smo lahko nato na N-koncu nadaljevali z reakcijo tvorbe amidne vezi s pripenjanjem karboksilne kisline. Kot reagent smo uporabili presežno količino TFA v DKM (1/5 v/v), saj se Boc selektivno odščiti pri pogojih acidolize. TFA smo v reakcijsko zmes dodajali po kapljicah pri 0 °C, saj je reakcija zelo eksotermna, nato pa počakali 3 ure za potek reakcije. Kot je prikazano na sliki 15, pride pri odščiti najprej do protonacije Boc-karbamata, čemur sledi odcep *terc*-butilnega kationa in nastanek nestabilne karbamatne kisline, po dekarboksilaciji nastane nato prost amin, ki v kislem tvori sol s TFA.

Za nadaljnje korake (sintezo amidne vezi) smo potrebovali prost amin, zato smo izvedli tritracijo z dietil etrom. TFA je v njem dobro topna, amin pa ne, posledično se je izoboril

v obliki »gumija«. V primeru spojine **11** smo eter po prvem dodatku najprej odpareli pod znižanim tlakom, po drugem pa smo ga le oddekantirali in nadaljevali s postopkom sklapljanja, opisanim pod točko 5.5. Pri izolaciji spojine **12** pa smo naleteli na manjši problem, saj je amin pri trituraciji delno prešel v organsko fazo zaradi topnosti v dietiletru. Pravilneje bi bilo, da bi ponovili dodatek etra in odparevanje, brez dekantiranja le-tega. Reakcijo smo zato morali ponoviti.

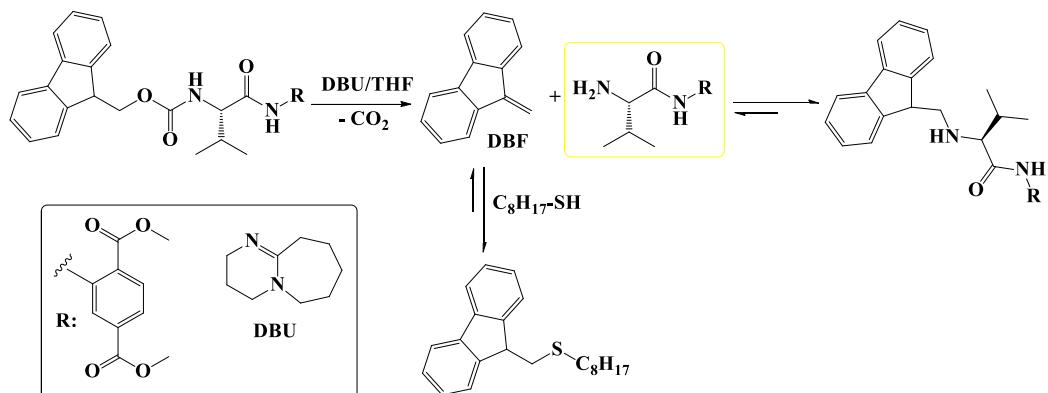
## 5.4 Zaščitna skupina Fmoc – uporaba, odstranitev (sinteza spojine **14**)

Pri sintezi spojine **14** smo se srečali s problemom vezave mimetika D-Glu na zaščiten Boc-L-valin. Uporabljen mimetik dimetil aminotereftalat (DMATF) smo najprej žeeli vezati s klasičnim postopkom sklapljanja preko aktivacije s karbodiimidom, nato pa smo poskusili še z uporabo triklorotiazina (TCT) kot aktivatorja (referenca [99]). Oba poskusa sintez, sicer opisana v točki 5.8, sta bila neuspešna, saj je bil DMATF preveč deaktiviran za uspešno reakcijo, nastala anhidrid (postopek A) in aktiviran ester s TCT (postopek B) pa premalo aktivirana za reakcijo z aminom. Močna deaktivacija DMATF je posledica mezomernega efekta prisotnih karboksilatov, ki v primeru *ortho*- ali *para*- pozicije glede na aminsko skupino povzročita dodatno zmanjšanje reaktivnosti že tako slabše reaktivne aromatske aminske skupine na račun delokalizacije prostega elektronskega para na dušiku.

Ostala nam je še možnost poskusa sinteze kislinskega klorida, ki velja za enega najbolj aktiviranih derivatov karboksilne kisline, a v tem primeru pri reakciji nismo smeli uporabiti Boc-L-valina, saj bi prišlo pri tvorbi kislinskega klorida do hkratne odščite Boc skupine. Iz tega razloga smo se odločili zamenjati zaščitno skupino, zato smo uporabili komercialno dostopen Fmoc-L-valin. Sintezni postopek se je izkazal za uspešnega, saj smo Fmoc-L-valin uspešno sklopili z DMATF, katerega smo nato morali za nadaljnje reakcije odščititi.

Fmoc predstavlja alternativo za Boc, omogoča ortogonalno zaščito funkcionalnih skupin, hkrati pa je po odščiti (uporaba manj ostrih pogojev kot pri Boc) z uporabo baze želen amin v neprotonirani obliki. Klasičen način odščite Fmoc zajema uporabo velikega prebitka sekundarnega amina, ponavadi piperidina v DMF, ki odcepi kisli proton v fluorenskem obroču, nato pa sledi premik elektronov in odstranitev zaščite, pri čemer nastaneta stranska produkta dibenzofulven (DBF) in ogljikov dioksid. Piperidin ima vlogo

tako baze za odcep Fmoc kot tudi »pasti« za sproščen DBF, kar je lahko prednost. A uporaba piperidina v DMF ni najprimernejša pri reakcijah v raztopinah zaradi nizke hlapnosti uporabljenih topil, reverzibilnosti vezave DBF s strani piperidina in polimerizacije DBF pri višjih koncentracijah. Iz teh razlogov je v našem primeru primernejša uporaba dveh reagentov z različnima funkcijama in sicer smo kot bazo uporabili ne-nukleofilno bazo DBU (1,8-diazabiciklo[5.4.0]undec-7-en, slika 16) v THF, kot dodatni nukleofil pa smo v reakcijsko zmes dodali še 1-oktantiol, ki je vezal nastali DBF in tako preprečil nastanek več stranskih produktov, med njimi adukta DBF in želenega amina. Zaradi reverzibilnosti nastanka omenjenega tioetra iz DBF in 1-oktantiola, smo uporabili 10 ekvivalentov 1-oktantiola [100]. Shema reakcije je predstavljena na sliki 16.



Slika 16: Mehanizem odščite Fmoc, skupaj s stranskimi produkti, prizjeno po [100]

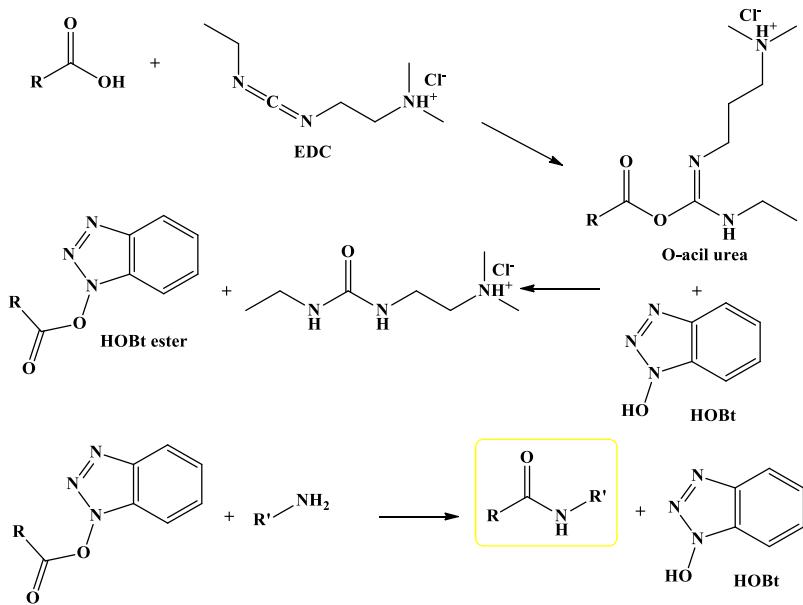
Pri izolaciji je po odparitvi topila nastal gosti gel, ki smo ga trituirali z dietiletrom in petroletrom, izpadel je netopen želen produkt, izkoristek je bil 47 %, kar je manj od pričakovanega (med 70 % in 100 % - podatek iz reference [100]), vendar je to najverjetneje posledica izgube produkta v matičnico, kar smo tudi opazili na TLC kromatogramu.

## 5.5 Tvorba peptidne vezi z uporabo EDC, HOBr, DMAP

### (sinteza spojin 1, 4, 6a, 6b, 6c, 9, 10, 15)

Večino peptidnih (amidnih) vezi smo sintetizirali po enakem postopku: uporabili smo EDC hidroklorid (1-etyl-3-(30-dimetilamino)karbodiimid hidroklorid, slika 17), HOBr (1-hidroksibenzotriazol, slika 17) in DMAP (dimetilaminopiridin); spojine, ki smo jih vezali, so namreč bile dovolj reaktivne za uspešen potek reakcije sklapljanja (t.i. »coupling« reakcije). EDC spada med karbodiimide, po reakciji s karboksilnimi kislinami pa kot

vmesni produkt nastane aktiviran O-acilsečinski derivat, ki lahko direktno reagira z amini do amidov, prednost EDC pred ostalimi karbodiimidi pa je prav topnost v vodi tako reagenta kot nastalega sečinskega derivata, kar omogoča lažjo ekstrakcijo produkta. Pogosto pa pri tem pride do racemizacije in prenosa acilne skupine, pri čemer kot stranski produkt nastane nereaktivna N-acilsečnina. Tej stranski reakciji se je mogoče izogniti z dodatkom nukleofila, ki reagira hitreje od kompetitivnega prenosa acilne skupine in tako vodi v nastanek intermediata, še vedno dovolj aktivnega, da se poveže z aminom. Takšna nukleofila sta prej omenjena DMAP in HOBr [96]. Tako HOBr kot tudi DMAP reagirata s karboksilno kislino in tvorita aktiviran intermediat (ester v primeru HOBr in protoniran amid v primeru DMAP), s katerim reagira amin za nastanek želenega amida in regeneracije HOBr in DMAP. Pri izvedenih reakcijah smo aminu vedno najprej dodali prebitek trietilamina, da smo pretvorili aminske skupine v prosto obliko, in DMF za boljšo topnost (1-2 mL). Nato smo dodali ekvivalentne množine preostalih reagentov in mešali pri sobni temperaturi. Vse spojine, dobljene po tem postopku, smo izolirali na enak način: najprej smo reakcijsko zmes zlili na vodo (odstranitev večine DMF, nezreagiranega EDC in stranskega produkta O-acilsečnine), nato ekstrahirali z etilacetatom (produkt je v njem open; v njem je delno open tudi DMF), organsko fazo pa smo nato večkrat spirali z 1M HCl (odstranitev prisotnih baz), vodo, NaHCO<sub>3</sub> (odstranitev prisotnih kislin) in nasičeno raztopino NaCl (odstranitev rezidualne vode) ter posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.



Slika 17: Mehanizem tvorbe peptidne vezi z uporabo EDC in HOBr, prizrejeno po [96]

V tabeli II so predstavljeni substrati, časi in izkoristki reakcij sklapljanj z uporabo EDC × HCl, HOBr in DMAP.

**Tabela II: Preglednica s substrati, časi in izkoristki reakcij sklapljanja z EDC × HCl, HOBr in DMAP**

# reakcije	Substrat 1 (-COOH)	Substrat 2 (-NH <sub>2</sub> )	Čas reakcije [h]	Izkoristek reakcije [%]
1			24	33
2			24	62
3			48	87
4			72	76
5			72	63
6			48	8
7			72	71
8			48	56
9			120	27

V primeru reakcije 1 smo sklapljali *trans*-ferulično kislino in etilni ester glicina × HCl, izkoristek je bil v nasprotju s pričakovanji zelo nizek, saj ni prisotnih steričnih oviranj niti slabše reaktivnosti substratov. Nekaj produkta smo pri ekstrakciji z etil acetatom sicer opazili v vodni fazi, zaradi delnega mešanja etil acetata in vode.

V primeru reakcij 3, 4 in 5 smo tvorili končne produkte (**6a**, **6b** in **6c**) iz sintetiziranega dez muramileptidnega fragmenta (spojine **5**) in mimetikov D-Glu z alifatsko aaminsko skupino, kar se odraža v relativno visokih izkoristkih v primerjavi z ostalimi v tabeli II. Alifatski amini so reaktivnejši od aromatskih, pri katerih je bazičnost (in nukleofilnost) zmanjšana zaradi delokalizacije prostega elektronskega para na aminskem dušiku po aromatskem obroču. Prav tako pomemben vidik je vpliv solvatacije aminov, ki lahko povzroči sterično oviranost, temu pa se lahko izognemo z uporabo aprotičnih polarnih topil (DMF, DMSO, acetonitril), kjer je energija solvatacije manjša in odvisna le od elektronskih vplivov substituentov [101]. Možen je tudi vpliv dolžine poteka reakcije, saj smo pri reakciji 3 dobili pri krajšem času večji izkoristek v primerjavi z reakcijo 3, uporabljeni substrata z aaminsko skupino sta bila stereoizomera. Pri reakciji 3 smo zaradi napačne uporabljeni molske mase izhodne karboksilne kisline dodali 1,6 ekvivalenta le-te namesto 1, kar je vplivalo na končni izkoristek, glede na rezultate celo pozitivno.

V primeru reakcije 6 smo sklapljali Boc-L-valin in dimetil 5-aminoizoftalat, reakcija je sicer potekla, a z zelo nizkim izkoristkom (8 %). Razlog za to je najverjetneje nizka reaktivnost aromatskega amina, a je ta zaradi manjšega vpliva mezomernega učinka obeh estrskih skupin kljub temu dovolj reaktiv za uspešno reakcijo. Izkoristek bi lahko poskusili izboljšati z uporabo metode s tvorbo simetričnega anhidrida (opisana v točki 5.6), ki se je v raziskavi [102] izkazala za uspešno, z 52 % izkoristkom, ali pa morda s skrajšanjem reakcijskega časa.

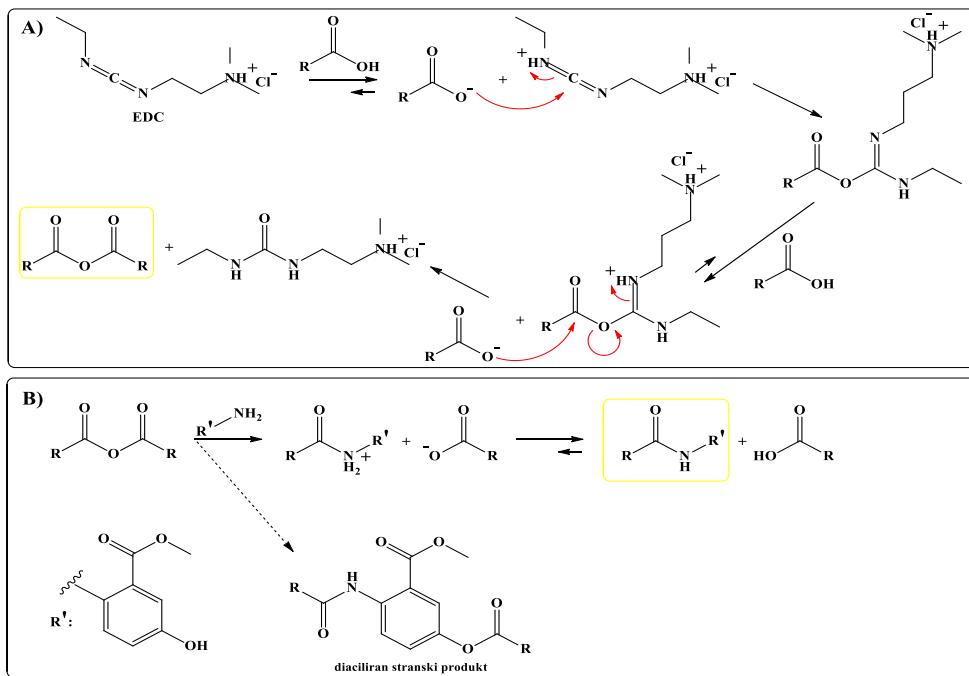
Pri reakcijah 7 in 8 smo peptidno vez sintetizirali z dvema zaporednima reakcijama (najprej odščita Boc zaščitne skupine, nato pa skapljanje), kar bi lahko privedlo do manjših izkoristkov. Tudi pri postopku izolacije po reakciji odščite je najverjetneje prišlo do izgub produkta pri dekantiranju dietiletra, kateremu bi se lahko izognili in ga samo odparevali. Izkoristek bi morda lahko povečali tako, da bi reakciji potekali v dveh ločenih bučkah. Najprej v eni bučki odščita Boc zaščitne skupine na aminu in izolacija produkta, v drugi pa aktivacija kislinskega derivata s sklopitvenim reagentom pri 0 °C, nato pa bi v drugo dodali izoliran amin iz prve in ostale reagente ter mešali pri sobni temperaturi. Pri

teh dveh reakcijah krajši čas reakcije ni pripomogel k višjemu izkoristku, topili sta bili pa v obeh primerih trietilamin in DMF. Možen je tudi vpliv sterične oviranosti, saj L-valinski fragment vsebuje izopropilno verigo v neposredni bližini aminske skupine, ki bi lahko potencialno motila potek reakcije.

Tudi pri reakcijah 2 in 9, kjer smo uporabili enak karboksilni kislinski derivat in drugačna estra z aminsko skupino, bi lahko prišlo do sterične oviranosti s strani L-valinskega dela spojin, je bil pa izkoristek reakcije 2 občutno višji od reakcije 9 (62 % : 27 %).

## 5.6 Sinteza peptidne vezi prek tvorbe simetričnega anhidrida z uporabo EDC (sinteza spojine 10)

Pri sintezi spojine **10** smo se zaradi nizke reaktivnosti uporabljenega mimetika D-Glu (aromatskega amina etil 2-amino-5-hidroksibenozoata) odločili za aktivacijo karboksilne kisline Boc-L-valina z uporabo  $\text{EDC} \times \text{HCl}$  do simetričnega anhidrida, ki je dovolj reaktivен za reakcijo s prej omenjenim aminom, ki je bil dovolj tudi nukleofilen za uspešno vezavo s tem postopkom. Mehanizem je predstavljen na sliki 18, gonilna sila reakcije pa je tvorba vodotopnega stranskega produkta, sečninskega derivata. Za izvedbo tega postopka smo se odločili na podlagi pozitivnih rezultatov raziskave, pri kateri so sklapljali podobno nereaktivnen substituiran aromatski amin z Boc-L-valinom [102].



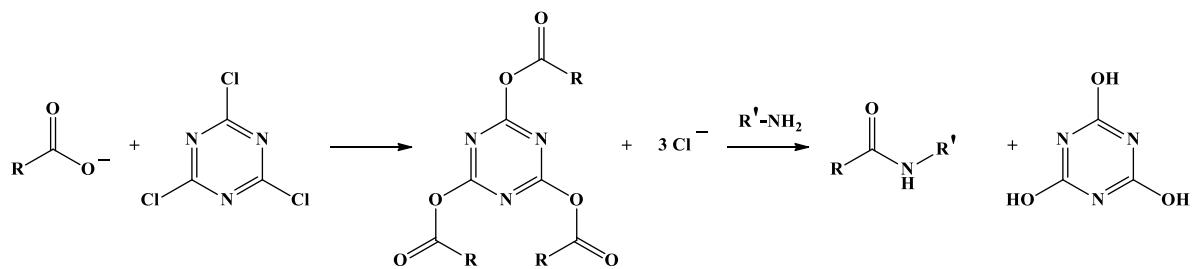
Slika 18: Mehanizem tvorbe simetričnega anhidrida s pomočjo  $\text{EDC} \times \text{HCl}$  (A); shema sinteze peptidne vezi iz pripravljenega anhidrida in amina (B), prirejeno po [96]

Pozitivna stran tega postopka je manjša poraba sklopitvenih reagentov, saj je za aktivacijo potrebno le 0,5 ekvivalenta EDC × HCl, ker iz dveh molekul kisline nastane ena molekula simetričnega anhidrida. Prav tako pa pri nadaljnji reakciji anhidrida in amina ni nujno potrebna uporaba dodatne baze, saj je prisoten karboksilatni anion, ki nastaja *in situ*. Metoda ima pomanjkljivost v tem, da se za sklapljanje porabi le polovica uporabljenе kisline (v našem primeru Boc-L-valina). Pogosto pride pri tem postopku tudi do racemizacije in prenosa acilne skupine na karbodiimid ter tvorbe nereaktivne N-acetilsečninskega derivata. Tej stranski reakciji se izognemo z dodajanjem sklopitvenega reagenta pri 0 °C, šele po aktivaciji dodamo amin [96]. V našem primeru smo najprej Boc-L-valin aktivirali z EDC × HCl pri 0 °C (3 ure), nato dodali amin in 1 mL THF za boljšo topnost ter po 24 urah z uporabo tankoplastne kromatografije ugotovili, da je bilo v reakcijski zmesi še vedno prisotnega veliko amina, zato smo reakcijo prestavili na oljno kopel (40 – 50 °C). Izkoristek je bil nizek, 35 %, poleg izgub pri izolaciji je možen razlog za slabši izkoristek lahko tudi nastanek diaciliranega stranskega produkta, saj je pri substratu prisotna tudi fenolna skupina, ki lahko prav tako (čeprav v dosti manjšem obsegu) reagira z anhidridom.

## 5.8 Neuspešni poskusi sklapljanja

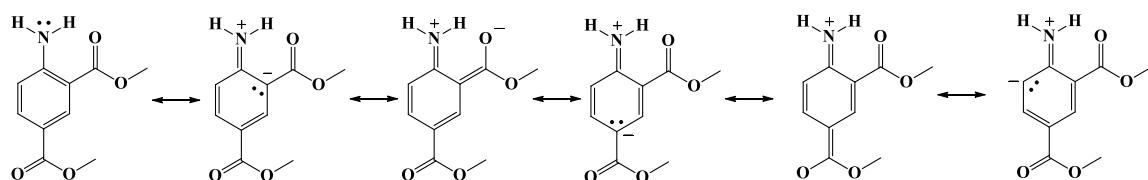
Prvi mimetik D-Glu, kjer nam sklapljanje ni uspešno poteklo, je bil dimetil aminotereftalat. Pričakovali smo, da bo substrat manj reaktivен, zato smo najprej poskusili s postopkom sinteze peptidne vezi prek nastanka simetričnega anhidrida z uporabo EDC × HCl, opisanim v točki 5.6, nato pa še z metodo, ki se je v literaturi [99] izkazala za uspešno pri sklapljanju substituiranih derivatov aromatskih karboksilnih kislin z različnimi amini – metodo z uporabo triklorotiazina (TCT) kot sklopitvenega reagenta. Shema je predstavljena na sliki 19, gre pa za tvorbo aktiviranih estrov, s katerimi nato reagira aminska skupina. Metoda s TCT je uporabna v primerih, ko je priprava kislinskega klorida onemogočena zaradi varnosti ali pa stabilnosti. V našem primeru je bil problem priprave kislinskega klorida stabilnost, saj smo imeli opravka z Boc-zaščitenim L-valinom, pri uporabi klorirnih reagentov pa se kot stranski produkt tvori HCl, ki lahko povzroči odščito Boc ali racemizacijo. Hkrati med pozitivnimi lastnostmi izstopa možnost uspešne tvorbe peptidne vezi tudi pri uporabi sterično oviranih substratov. Tudi lastnosti uporabljenе baze, s pomočjo katere se tvori karboksilatna sol, niso bile ključnega pomena, saj so poskusi pokazali, da tudi uporaba vodnih raztopin ni motila nastanka aktiviranega estrskega

intermediata. Najverjetnejši vzrok za neuspeh metode s TCT pri sklapljanju Boc-L-valina in dimetil aminotereftalata je preveč deaktiviran aminskega substrata, možen pa je tudi vpliv slabše topnosti le-tega.



Slika 19: Shema reakcije z uporabo TCT, prirejeno po [99]

Pri poskusih sklapljanja dimetil 4-aminoizoftalata nam ni uspelo uspešno izvesti nobene izmed zgoraj omenjenih reakcij sinteze peptidne vezi. Najverjetnejši razlog za to je preveč deaktiviran substrat, saj je aminska skupina vezana na aromatski obroč, prost elektronski par na dušiku pa je delokaliziran tako po celotnem obroču kot tudi po estrskih skupinah na *ortho*- in *para*- pozicijah (slika 20), kar znatno zmanjša reaktivnost aminske skupine. Prav tako pa ni prisotnega nič vpliva mezomernega učinka obeh estrskih skupin, ki bi pripomogel k višji reaktivnosti. Možen je tudi vpliv stericne oviranosti aminske skupine s strani bližnjega estra, ki bi lahko otežil potek reakcije, in topnosti uporabljenega substrata z aminsko skupino.

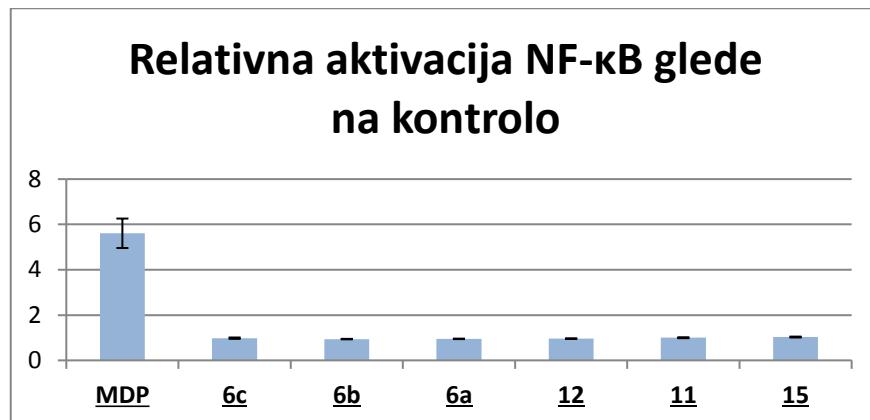


Slika 20: Struktura dimetil 4-aminoizoftalata in njegovih možnih resonančnih struktur

## 5.9 Biološko vrednotenje spojin

Rezultati bioloških testiranj na NOD2-specifičnih celicah HEK-Blue<sup>TM</sup> hNOD2, kjer smo ugotavljali NOD2 agonistično aktivnost sintetiziranih končnih spojin v primerjavi z netretiranimi celicami (negativna kontrola, relativna aktivnost je 1) in MDP (pozitivna kontrola), so bili pri vseh testiranih spojinah enaki – pokazali niso nikakršne agonistične aktivnosti na NOD2 receptorje. Rezultati so prikazani na grafu 1. Iz tega lahko sklepamo,

da uporabljeni estri bioizosterov D-glutaminske kislina niso ustrezna zamenjava končnega fragmenta.



Graf 1: Prikaz NOD2 agonistične aktivnosti končnih sintetiziranih spojin preko relativne aktivacije NF-κB celic HEK-Bluet<sup>TM</sup> hNOD2 v primerjavi s pozitivno kontrolo (MDP). Vse vrednosti so normalizirane na netretirane celice (negativna kontrola).

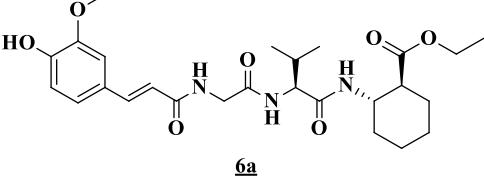
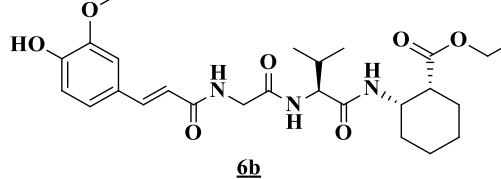
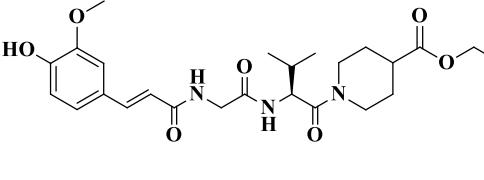
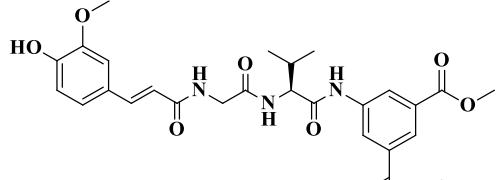
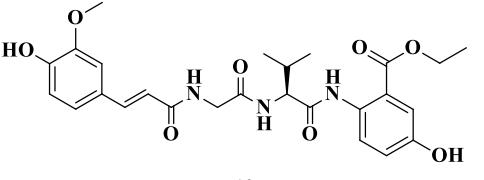
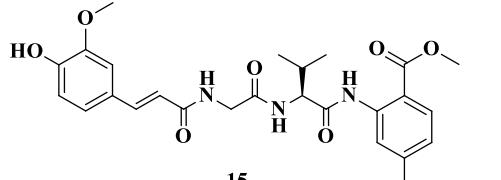
Glede na to, da dezmuramilpeptidi v celice po vsej verjetnosti vstopajo s pomočjo pasivne absorpcije, ki je odvisna od lipofilnih lastnosti spojin, smo z uvedbo uporabljenih alifatskih in aromatskih obročnih bioizosterov dosegli pri končnih spojinah povečanje lipofilnosti glede na spojino vodnico ( $c\text{LogP} = 1,8874$ ) in s tem višje vrednosti  $c\text{LogP}$  (podatki za sintetizirane spojine v tabeli III), ki predstavlja način kvantifikacije stopnje lipofilnosti oz. hidrofilnosti prek porazdelitve spojine v sistemu *n*-oktanola in vode (najbližji približek povprečnim lipofilno-hidrofilnim razmeram v telesu) [78]. V primeru spojine **6c** se je pojavilo manjše odstopanje, saj je bila  $c\text{LogP}$  vrednost manjša kot pri spojini vodnici.

Pri že prej omenjeni raziskavi [81], kjer so se mimetiki D-Glu izkazali za uspešne, se je kot najboljši rigidiziran mimetik pokazala 4-aminoizoftalna kislina, katere dimetilni ester pa je zanimivo edini fragment, ki ga v naši raziskavi nismo uspeli sklopiti z L-valinom. Morda je ključnega pomena pri vezavi spojin v aktivno mesto prav natančna prostorska razporeditev prisotnih COOH oz. COOR skupin, kar dosežemo z rigidizacijo in ravno konformacija 4-aminoizoftalata, s prisotnima karboksilnima skupinama na mestih *ortho*- in *para*- glede na aminsko skupino, bi lahko bila idealna.

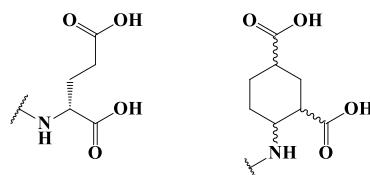
Dodaten razlog za pomembnost ustrezne prostorske ureditve je pokazala tudi večja aktivnost pri določenih enantiomernih spojinah, kjer je preferenčna le ena konfiguracija, ki bolje posnema  $\alpha$ -karboksilat, prav tako pa so pri določenih konformacijah omogočene

tvorbe dodatnih vodikovih vezi ali pa interakcij na osnovi naboja pripomogle k povečani aktivnosti.

**Tabela III:** Sintetizirani končni dezmuramilpeptidi in njihove cLogP vrednosti

 <p><b>6a</b></p> <p>cLogP = 3,2428</p>	 <p><b>6b</b></p> <p>cLogP = 3,2428</p>
 <p><b>6c</b></p> <p>cLogP = 1,4740</p>	 <p><b>11</b></p> <p>cLogP = 3,1686</p>
 <p><b>12</b></p> <p>cLogP = 3,1096</p>	 <p><b>15</b></p> <p>cLogP = 3,1686</p>

Izkazalo se je tudi, da se substrati s samo eno prisotno karboksilno skupino niso pokazali kot dobri mimetiki D-Glu [81], kar bi lahko pojasnilo neaktivnost pri spojinah **6a**, **6b**, **6c** in **12** (tabela III), pri katerih bi lahko poskusili še z uvedbo dodatne estrske skupine. Za natančnejše ugotavljanje bi potrebovali kristalno strukturo NOD2 z vezanim ligandom, saj je do sedaj predlagano le potencialno mesto vezave na LRR domeni NOD2 [62], prav tako bi morali identificirati prisotne interakcije liganda z aminokislinskimi ostanki in samo



**Slika 21:** D-glutaminski fragment (levo) in cikloheksilni mimetik D-Glu s karboksilnima kislinama na mestih 1 in 3 (desno)

orientacijo tega liganda v vezavnem mestu. Zanimiva je bila tudi ugotovitev, da karboksilni skupini na mestih 1 in 3 v rigidnem cikloheksilnem mimetiku D-Glu zavzemajo pri vezavi na MurD isti položaj kot karboksilni skupini na nespremenjeni D-Glu pri predhodno opisanih inhibitorjih ter nativnem produktu tega encima (slika 21) [81], kar bi

lahko omogočalo povečano stopnjo fleksibilnosti D-Glu fragmenta v primerjavi s popolnoma rigidiziranim aromatskim obročem, to pa bi lahko pripomoglo k lažji vezavi. Ker je MurD strukturno popolnoma drugačen protein kot NOD2, pri sami vezavi v vezavno mesto ne moremo vleči direktnih vzporednic, a vseeno lahko obstaja kakšna povezava med vezavnima mestoma obeh proteinov zaradi vpletjenosti enakega fragmenta, D-Glu.

Morda bi lahko poskusili vgraditi še cikloheksilne analoge uporabljenih aromatskih bioizosterov D-Glu, v sledečih raziskavah pa bi se bilo smiselno usmeriti v nadaljnjo optimizacijo sladkornega dela molekule MDP za dosego večje aktivnosti in boljših farmakokinetičnih lastnosti, najbolj pa bi k boljšemu načrtovanju najbolj pomagala rešena kristalna struktura NOD2 z vezanim ligandom.

## 6 Sklepi

- Z večjim razumevanjem mehanizmov povezave prijene in pridobljene imunosti je nova generacija imunomodulatorjev kot adjuvansov v cepivih naslednji korak v doseganju večje specifičnosti želenih imunskega odziva, prizrejenih posameznim vrstam patogenih organizmov
- Sintetizirali smo 6 novih derivatov naše spojine vodnice dietil ((E)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil-D-glutamata, ki se je v eni izmed predhodnih raziskav izkazala kot nizko nanomolarni agonist NOD2.
- Pri sinteznih postopkih smo se srečali s problemom tvorbe amidnih vezi med slabo reaktivno aminsko skupino estrov aromatskih mimetikov D-Glu in uporabljenimi karboksilnimi kislinami, zato smo poskusili različne metode (uporaba sklopitvenih reagentov, metoda z anhidridi, metoda s kislinskimi kloridi), ki so se izkazale za dovolj učinkovite pri sintetiziranju spojin **11**, **12** in **18**, ni pa nam uspelo sintetizirati derivata z dimetil 4-aminoizoftalatom.
- Končni fragment molekule (D-glutaminsko kislino) smo tako zamenjali z njenimi znanimi rigidnimi bioizosteri ter preverili, kako ta zamenjava vpliva na NOD2 agonistično aktivnost sintetiziranih spojin. Biološka testiranja niso pokazala nikakrsne NOD2 agonistične aktivnosti teh spojin, zato lahko sklepamo, da je prisotnost nespremenjene D-glutaminske kisline oz. njenega estra na končnem mestu dezmuramilpeptidov nujno potrebna za vezavo na receptor NOD2, morali pa bi preveriti še možnosti z uporabo dimetil 4-aminoizoftalatnega mimetika, saj bi ta lahko potencialno zavzemal idealno konformacijo v vezavnem mestu. Rigidizacija D-Glu se tako ni izkazala kot ustrezan korak pri optimizaciji spojine vodnice, poskusili bi lahko tudi z vgraditvijo malenkost bolj fleksibilnih cikloheksilnih mimetikov D-Glu.
- V nadalnjih raziskavah derivatov MDP bi se bilo tako smiselno usmeriti v nadaljnjo optimizacijo sladkornega dela molekule dietil ((E)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil-D-glutamata za doseg večje aktivnosti in boljših farmakokinetičnih lastnosti, prav tako pa bi bilo smotrno ugotoviti kristalno strukturo vezavnega mesta na NOD2 z vezanim ligandom.

## 7 Literatura

- [1] P. J. Delves, S. J. Martin, D. R. Burton, in I. M. Roitt, *Roitt's essential immunology*, 12. izdaja, 2011.
- [2] P. C. Calder, „Feeding the immune system“, *Proc. Nutr. Soc.*, let. 72, št. 3, str. 299–309, 2013.
- [3] D. Male, J. Brostoff, D. B. Roth, in I. Roitt, *Immunology*, Seventh, 2006.
- [4] E. H. Ooi, A. J. Psaltis, I. J. Witterick, in P.-J. Wormald, „Innate Immunity“, *Otolaryngol. Clin. North Am.*, 2010.
- [5] S. E. Turvey in D. H. Broide, „Innate immunity“, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2010.
- [6] H. Kumar, T. Kawai, in S. Akira, „Pathogen recognition in the innate immune response“, *Biochem. J.*, let. 420, str. 1–16, 2009.
- [7] N. Kamada *idr.*, „Regulated Virulence Controls the Ability of a Pathogen to Compete with the Gut Microbiota“, *Science* (80-. ), let. 336, št. 6086, str. 1325–1329, 2012.
- [8] P. J. Sansonetti, „War and peace at mucosal surfaces“, *Nat. Rev. Immunol.*, let. 4, št. 12, str. 953–964, 2004.
- [9] M. Riera Romo, D. Pérez-Martínez, in C. Castillo Ferrer, „Innate immunity in vertebrates: An overview“, *Immunology*, let. 148, št. 2, str. 125–139, 2016.
- [10] B. A. Blok, R. J. W. Arts, R. van Crevel, C. S. Benn, in M. G. Netea, „Trained innate immunity as underlying mechanism for the long-term, nonspecific effects of vaccines“, *J. Leukoc. Biol.*, let. 98, št. 3, str. 347–356, 2015.
- [11] R. M. Steinman, „Dendritic cells: Understanding immunogenicity“, *Eur. J. Immunol.*, let. 37, št. SUPPL. 1, str. 53–60, 2007.
- [12] P. J. Sansonetti, „The innate signaling of dangers and the dangers of innate signaling“, *Nat. Immunol.*, 2006.
- [13] M. E. Bianchi, „DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger“, *J. Leukoc. Biol.*, let. 81, št. 1, str. 1–5, 2006.
- [14] A. Iwasaki in R. Medzhitov, „Control of adaptive immunity by the innate immune system“, *Nat. Immunol.*, let. 16, št. 4, str. 343–353, 2015.
- [15] F. A. Bonilla in H. C. Oettgen, „Adaptive immunity“, *J. Allergy Clin. Immunol.*, let. 125, št. 2 SUPPL. 2, str. S33–S40, 2010.
- [16] T. Boehm in J. B. Swann, „Origin and Evolution of Adaptive Immunity“, *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, let. 2, št. 1, str. 259–283, 2014.
- [17] P. Guo *idr.*, „Dual nature of the adaptive immune system in lampreys.“, *Nature*, let. 459, št. 7248, str. 796–801, 2009.
- [18] K. Dorshkind in E. Montecino-Rodriguez, „Fetal B-cell lymphopoiesis and the

emergence of B-1-cell potential“, *Nat. Rev. Immunol.*, let. 7, št. 3, str. 213–219, 2007.

- [19] M. Saxena in G. Yeretssian, „NOD-like receptors: Master regulators of inflammation and cancer“, *Frontiers in Immunology*. 2014.
- [20] V. Motta, F. Soares, T. Sun, in D. J. Philpott, „NOD-Like Receptors: Versatile Cytosolic Sentinels“, *Physiol. Rev.*, let. 95, št. 1, str. 149–178, 2015.
- [21] L. Franchi *idr.*, „Intracellular NOD-like receptors in innate immunity, infection and disease“, *Cellular Microbiology*. 2008.
- [22] M. H. Shaw, T. Reimer, Y. G. Kim, in G. Nuñez, „NOD-like receptors (NLRs): bona fide intracellular microbial sensors“, *Current Opinion in Immunology*, let. 20, št. 4, str. 377–382, 2008.
- [23] M. Yoneyama *idr.*, „The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses“, *Nat. Immunol.*, let. 5, št. 7, str. 730–737, 2004.
- [24] K. Eisenächer, C. Steinberg, W. Reindl, in A. Krug, „The role of viral nucleic acid recognition in dendritic cells for innate and adaptive antiviral immunity“, *Immunobiology*, let. 212, št. 9–10, str. 701–714, 2008.
- [25] T. Venkataraman *idr.*, „Loss of DExD/H Box RNA Helicase LGP2 Manifests Disparate Antiviral Responses“, *J. Immunol.*, let. 178, št. 10, str. 6444–6455, 2007.
- [26] M. G. Netea, C. Wijmenga, in L. A. J. O’Neill, „Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility“, *Nat. Immunol.*, let. 13, št. 6, str. 535–542, 2012.
- [27] S. Akira in K. Takeda, „Toll-like receptor signalling“, *Nat. Rev. Immunol.*, let. 4, št. 7, str. 499–511, 2004.
- [28] T. Kawai in S. Akira, „The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors“, *Nat. Immunol.*, let. 11, št. 5, str. 373–384, 2010.
- [29] S. I. Saitoh *idr.*, „Lipid A antagonist, lipid IVa, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4)-MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization“, *Int. Immunol.*, let. 16, št. 7, str. 961–969, 2004.
- [30] T. Ito, „Interferon-alpha and Interleukin-12 Are Induced Differentially by Toll-like Receptor 7 Ligands in Human Blood Dendritic Cell Subsets“, *J. Exp. Med.*, let. 195, št. 11, str. 1507–1512, 2002.
- [31] V. Toshchakov *idr.*, „TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages.“, *Nat. Immunol.*, let. 3, št. 4, str. 392–8, 2002.
- [32] K. Hoshino, T. Kaisho, T. Iwabe, O. Takeuchi, in S. Akira, „Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation.“, *Int. Immunol.*, let. 14, št. 10, str. 1225–31, 2002.

- [33] S. E. Doyle *idr.*, „IRF3 Mediates a TLR3/TLR4-Specific Antiviral Gene Program“, *Immunity*, let. 17, št. 3, str. 251–263, 2002.
- [34] C. Maisonneuve, S. Bertholet, D. J. Philpott, in E. De Gregorio, „Unleashing the potential of NOD- and Toll-like agonists as vaccine adjuvants“, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, let. 111, št. 34, str. 12294–12299, 2014.
- [35] M. Proell, S. J. Riedl, J. H. Fritz, A. M. Rojas, in R. Schwarzenbacher, „The Nod-Like Receptor (NLR) family: A tale of similarities and differences“, *PLoS One*, let. 3, št. 4, 2008.
- [36] T. D. Kanneganti, M. Lamkanfi, in G. Núñez, „Intracellular NOD-like Receptors in Host Defense and Disease“, *Immunity*, let. 27, št. 4. str. 549–559, 2007.
- [37] E. V. Koonin in L. Aravind, „The NACHT family - A new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation“, *Trends in Biochemical Sciences*, let. 25, št. 5. str. 223–224, 2000.
- [38] G. Chen, M. H. Shaw, Y.-G. Kim, in G. Nuñez, „NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease“, *Annu. Rev. Pathol.*, let. 4, str. 365–398, 2009.
- [39] Z. Ye in J. P. Y. Ting, „NLR, the nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing gene family“, *Current Opinion in Immunology*, let. 20, št. 1. str. 3–9, 2008.
- [40] C. Dostert, E. Meylan, in J. Tschoopp, „Intracellular pattern-recognition receptors“, *Advanced Drug Delivery Reviews*, let. 60, št. 7. str. 830–840, 2008.
- [41] M. H. Shaw, T. Reimer, Y. G. Kim, in G. Nuñez, „NOD-like receptors (NLRs): bona fide intracellular microbial sensors“, *Current Opinion in Immunology*. 2008.
- [42] J. P.-Y. Ting, S. B. Willingham, in D. T. Bergstrahl, „NLRs at the intersection of cell death and immunity“, *Nat. Rev. Immunol.*, let. 8, št. 5, str. 372–379, 2008.
- [43] M. S. Hayden in S. Ghosh, „NF-kappaB in immunobiology.“, *Cell Res.*, let. 21, št. 2, str. 223–244, 2011.
- [44] B. K. Davis, H. Wen, in J. P. Ting, „The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases“, *Annu Rev Immunol*, let. 29, str. 707–735, 2011.
- [45] T. A. Kufer in P. J. Sansonetti, „NLR functions beyond pathogen recognition“, *Nat. Immunol.*, let. 12, št. 2, str. 121–128, 2011.
- [46] K. Labbé in M. Saleh, „Pyroptosis: a Caspase-1-dependent Programmed Cell Death and a Barrier to Infection“, *The Inflammasomes*. str. 17–37, 2011.
- [47] T. Hisamatsu, M. Suzuki, H. C. Reinecker, W. J. Nadeau, B. a McCormick, in D. K. Podolsky, „CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells“, *Gastroenterology*, let. 124, št. 4, str. 993–1000, 2003.
- [48] D. Ramanan, M. S. Tang, R. Bowcutt, P. Loke, in K. Cadwell, „Bacterial sensor Nod2 prevents inflammation of the small intestine by restricting the expansion of

the commensal *bacteroides vulgatus*“, *Immunity*, let. 41, št. 2, str. 311–324, 2014.

- [49] G. Nigro, R. Rossi, P. H. Commere, P. Jay, in P. J. Sansonetti, „The cytosolic bacterial peptidoglycan sensor Nod2 affords stem cell protection and links microbes to gut epithelial regeneration“, *Cell Host Microbe*, let. 15, št. 6, str. 792–798, 2014.
- [50] Y. Ogura *idr.*, „Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn’s ileitis.“, *Gut*, let. 52, št. 11, str. 1591–7, 2003.
- [51] S. Okumura *idr.*, „Hyperexpression of NOD2 in intestinal mast cells of Crohn’s disease patients: Preferential expression of inflammatory cell-recruiting molecules via NOD2 in mast cells“, *Clin. Immunol.*, let. 130, št. 2, str. 175–185, 2009.
- [52] R. Cooney *idr.*, „NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation“, *Nat. Med.*, let. 16, št. 1, str. 90–97, 2010.
- [53] M. Hedl, J. Li, J. H. Cho, in C. Abraham, „Chronic stimulation of Nod2 mediates tolerance to bacterial products“, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, let. 104, št. 49, str. 19440–19445, 2007.
- [54] T. Petterson, J. Jendholm, A. Mansson, A. Bjartell, K. Riesbeck, in L.-O. Cardell, „Effects of NOD-like receptors in human B lymphocytes and crosstalk between NOD1/NOD2 and Toll-like receptors“, *J. Leukoc. Biol.*, let. 89, št. 2, str. 177–187, 2011.
- [55] M. H. Shaw *idr.*, „T cell–intrinsic role of Nod2 in promoting type 1 immunity to *Toxoplasma gondii*“, *Nat. Immunol.*, let. 10, št. 12, str. 1267–1274, 2009.
- [56] Z. Al Nabhan, G. Dietrich, J. P. Hugot, in F. Barreau, „Nod2: The intestinal gate keeper“, *PLoS Pathog.*, let. 13, št. 3, str. 1–19, 2017.
- [57] S. E. Girardin *idr.*, „Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection“, *J. Biol. Chem.*, let. 278, št. 11, str. 8869–8872, 2003.
- [58] B. Thay, A. Damm, T. A. Kufer, S. N. Wai, in J. Oscarsson, „Aggregatibacter actinomycetemcomitans outer membrane vesicles are internalized in human host cells and trigger NOD1- and NOD2-dependent NF-??B activation“, *Infect. Immun.*, let. 82, št. 10, str. 4034–4046, 2014.
- [59] H. Chu *idr.*, „Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease“, *Science (80-. ).*, let. 352, št. 6289, str. 1116–1120, 2016.
- [60] S. R. Vavricka *idr.*, „hPepT1 transports muramyl dipeptide, activating NF-??B and stimulating IL-8 secretion in human colonic Caco2/bbe cells“, *Gastroenterology*, let. 127, št. 5, str. 1401–1409, 2004.
- [61] R. Caruso, N. Warner, N. Inohara, in G. Núñez, „NOD1 and NOD2: Signaling, host defense, and inflammatory disease“, *Immunity*, let. 41, št. 6. 2014.
- [62] S. Maekawa, U. Ohto, T. Shibata, K. Miyake, in T. Shimizu, „Crystal structure of NOD2 and its implications in human disease“, *Nat. Commun.*, let. 7, str. 11813,

2016.

- [63] J. Mo, J. P. Boyle, C. B. Howard, T. P. Monie, B. K. Davis, in J. A. Duncan, „Pathogen sensing by nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 (NOD2) is mediated by direct binding to muramyl dipeptide and ATP“, *J. Biol. Chem.*, let. 287, št. 27, str. 23057–23067, 2012.
- [64] A. Mayor, F. Martinon, T. De Smedt, V. Petrilli, in J. Tschoopp, „A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses“, *Nat Immunol*, let. 8, št. 5, str. 497–503, 2007.
- [65] I. Tattoli, L. H. Travassos, L. A. Carneiro, J. G. Magalhaes, in S. E. Girardin, „The nodosome: Nod1 and Nod2 control bacterial infections and inflammation“, *Seminars in Immunopathology*, let. 29, št. 3. str. 289–301, 2007.
- [66] K. S. Kobayashi *idr.*, „Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract“, *Science (80-. ).*, let. 307, št. 5710, str. 731–734, 2005.
- [67] U. Meinzer *idr.*, „Yersinia pseudotuberculosis effector YopJ subverts the Nod2/RICK/TAK1 pathway and activates caspase-1 to induce intestinal barrier dysfunction“, *Cell Host Microbe*, let. 11, št. 4, str. 337–351, 2012.
- [68] M. J. Travassos LH, Carneiro LAM, Ramjeet M, Hussey S, Kim Y-G, „Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry: Commentary“, *Nat. Immunol.*, let. 11, št. 1, str. 55–62, 2010.
- [69] A. Sabbah *idr.*, „Activation of innate immune antiviral responses by Nod2.“, *Nat. Immunol.*, let. 10, št. 10, str. 1073–80, 2009.
- [70] *Farmacevtski terminološki slovar*. 2011.
- [71] R. K. Gupta, E. H. Relyveld, E. B. Lindblad, B. Bizzini, S. Ben-Efraim, in C. K. Gupta, „Adjuvants - A balance between toxicity and adjuvanticity“, *Vaccine*, let. 11, št. 3. str. 293–306, 1993.
- [72] S. C. Eisenbarth, O. R. Colegio, W. O'Connor, F. S. Sutterwala, in R. A. Flavell, „Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants“, *Nature*, let. 453, št. 7198, str. 1122–1126, 2008.
- [73] C. A. Janeway, „Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology“, v *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1989, let. 54, št. 1, str. 1–13.
- [74] Z. Jakopin, „Murabutide revisited: a review of its pleiotropic biological effects“, *Curr Med Chem*, let. 20, št. 16, str. 2068–2079, 2013.
- [75] F. Ellouz, A. Adam, R. Ciorbaru, in E. Lederer, „Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, let. 59, št. 4, str. 1317–1325, 1974.
- [76] G. M. Bahr, E. Darcissac, D. Bevec, P. Dukor, in L. Chedid, „Immunopharmacological activities and clinical development of muramyl peptides with particular emphasis on murabutide“, *Int. J. Immunopharmacol.*, let. 17, št. 2,

str. 117–131, 1995.

- [77] N. Zhao, Y. Ma, S. Zhang, X. Fang, Z. Liang, in G. Liu, „New muramyl dipeptide (MDP) mimics without the carbohydrate moiety as potential adjuvant candidates for a therapeutic hepatitis B vaccine (HBV)“, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, let. 21, št. 14, str. 4292–4295, 2011.
- [78] D. A. Lemke, Thomas L. Williams, *Foye's Principles of Medicinal Chemistry Seventh Edition*, let. 53, št. 9. 2013.
- [79] N. A. Meanwell, „Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design“, *J. Med. Chem.*, let. 54, št. 8, str. 2529–2591, 2011.
- [80] H. X. Zhou in M. K. Gilson, „Theory of free energy and entropy in noncovalent binding“, *Chem. Rev.*, let. 109, št. 9, str. 4092–4107, 2009.
- [81] I. Sosič *idr.*, „Second-generation sulfonamide inhibitors of d-glutamic acid-adding enzyme: Activity optimisation with conformationally rigid analogues of d-glutamic acid“, *Eur. J. Med. Chem.*, let. 46, št. 7, str. 2880–2894, 2011.
- [82] Ž. Jakopin, M. Gobec, I. Mlinarič-Raščan, in M. Sollner Dolenc, „Immunomodulatory properties of novel nucleotide oligomerization domain 2 (Nod2) agonistic desmuramyl-dipeptides“, *J. Med. Chem.*, let. 55, št. 14, str. 6478–6488, 2012.
- [83] N. Inohara *idr.*, „Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2: Implications for Crohn's disease“, *J. Biol. Chem.*, let. 278, št. 8, str. 5509–5512, 2003.
- [84] P. Smrdel *idr.*, „Physicochemical and preclinical pharmacokinetic and toxicological evaluation of LK-423--a new phthalimido-desmuramyl-dipeptide derivative with immunomodulating activity“, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, let. 35, št. 1520–5762 (Electronic), str. 1293–1304, 2009.
- [85] Ž. Jakopin, E. Corsini, M. Gobec, I. Mlinarič-Raščan, in M. S. Dolenc, „Design, synthesis and biological evaluation of novel desmuramyl-dipeptide analogs“, *Eur. J. Med. Chem.*, let. 46, št. 9, str. 3762–3777, 2011.
- [86] M. Sollner, S. Pečar, in A. Štalc, „The influence of the lipophilicity of 7-oxoacyl-L-alanyl-D-isoglutamines on their immunorestoration activity in vivo“, *Eur. J. Med. Chem.*, let. 31, št. 11, str. 927–933, 1996.
- [87] M. Gobec, I. Mlinarič-Raščan, M. S. Dolenc, in Ž. Jakopin, „Structural requirements of acylated Gly-L-Ala-d-Glu analogs for activation of the innate immune receptor NOD2“, *Eur. J. Med. Chem.*, let. 116, str. 1–12, 2016.
- [88] K. Peric, „Načrtovanje in sinteza aciliranih analogov tripeptida Gly-L-Val-D-Glu kot agonistov receptorja NOD2“, 2016.
- [89] K. E. Otto *idr.*, „Temperature-dependent intensity anomalies in amino acid esters: weak hydrogen bonds in protected glycine, alanine and valine.“, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, let. 13, št. 31, str. 14119–30, 2011.

- [90] A. Thaqi, A. McCluskey, in J. L. Scott, „A mild Boc deprotection and the importance of a free carboxylate“, *Tetrahedron Lett.*, let. 49, št. 49, str. 6962–6964, 2008.
- [91] S. Kim, B. Shin, in E. Ma, „Synthesis and Caco-2 cell permeability of N-substituted anthranilamide esters as ADP inhibitor in platelets“, *Arch. Pharm. Res.*, let. 38, št. 6, str. 1157–1156, 2015.
- [92] B. D. Hosangadi in R. H. Dave, „An efficient general method for esterification of aromatic carboxylic acids“, *Tetrahedron Lett.*, let. 37, št. 35, str. 6375–6378, 1996.
- [93] L. Jette, L. Harvey, K. Eugeni, in N. Levens, „4-Hydroxyisoleucine: A plant-derived treatment for metabolic syndrome“, *Curr. Opin. Investig. Drugs*, let. 10, št. 4, str. 353–358, 2009.
- [94] M. Tišler, *Organska kemija*, 3. izd. DZS, 2013.
- [95] „Thionyl Chloride“. [Na spletu]. Dostopno: <https://www.masterorganicchemistry.com/2011/12/03/reagent-friday-thionyl-chloride-socl2/>. [Dostopano: 03-nov-2017].
- [96] C. A. G. N. Montalbetti in V. Falque, „Amide bond formation and peptide coupling“, *Tetrahedron*, let. 61, št. 46, str. 10827–10852, 2005.
- [97] „Boc Protection Mechanism (Boc<sub>2</sub>O + Base)“. [Na spletu]. Dostopno: [http://commonorganicchemistry.com/Rxn\\_Pages/Boc\\_Protection/Boc\\_Protection\\_Boc2O\\_Base\\_Mech.htm](http://commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_Boc2O_Base_Mech.htm). [Dostopano: 31-okt-2017].
- [98] „Boc Deprotection Mechanism - TFA“. [Na spletu]. Dostopno: [http://commonorganicchemistry.com/Rxn\\_Pages/Boc\\_Protection/Boc\\_Protection\\_TFA\\_Mech.htm](http://commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_TFA_Mech.htm). [Dostopano: 31-okt-2017].
- [99] H. L. Rayle in L. Fellmeth, „Development of a Process for Triazine-Promoted Amidation of Carboxylic Acids“, *Org. Process Res. Dev.*, let. 3, št. c, str. 172–176, 1999.
- [100] J. E. Sheppeck II, H. Kar, in H. Hong, „A convenient and scaleable procedure for removing the Fmoc group in solution“, *Tetrahedron Lett.*, let. 41, št. 28, str. 5329–5333, 2000.
- [101] „Amine Reactivity“. [Na spletu]. Dostopno: <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/amine1.htm>. [Dostopano: 08-nov-2017].
- [102] J. Voskuhl idr., „Nanodiamonds in sugar rings: an experimental and theoretical investigation of cyclodextrin–nanodiamond inclusion complexes“, *Org. Biomol. Chem.*, let. 10, št. 23, str. 4524, 2012.