

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BARBARA PRIKERŽNIK

**MAGISTRSKA NALOGA**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BARBARA PRIKERŽNIK

**UPORABA METABOLNO STABILNIH BIOIZOSTEROV ESTRA  
KARBOKSILNE KISLINE PRI NAČRTOVANJU IN SINTEZI  
AGONISTOV RECEPTORJA NOD2**

**THE USE OF METABOLICALLY STABLE ESTER BIOISOSTERES  
IN THE DESIGN AND SYNTHESIS OF NOD2 RECEPTOR  
AGONISTS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Diplomsko nalogo 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 Institutu Jožef Stefan v Ljubljani. Končne spojine so biološko ovrednotili na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo.

### **Zahvala**

Isrkeno se zahvaljujem svojemu mentorju izr. prof. dr. Žigi Jakopinu za vso pomoč, nasvete in potrpežljivost pri izdelavi magistrske naloge. Rada bi se zahvalila tudi družini in prijateljem, ki so mi v vseh letih študija stali ob strani in me spodbujali. Hvala.

### **Izjava**

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

Barbara Prikeržnik

Predsednik magistrske komisije: prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.

Članica magistrske komisije: doc. dr. Nataša Karas Kuželički, mag. farm.

# VSEBINA

VSEBINA.....	II
POVZETEK.....	VI
ABSTRACT.....	VII
KLJUČNE BESEDE .....	VIII
KEYWORDS .....	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV .....	VIII
1 UVOD.....	1
1.1 IMUNSKI SISTEM .....	1
1.2 RECEPTORJI ZA PREPOZNAVNO MOLEKULSKIH VZORCEV (PRR).....	2
1.2.1 NOD-u podobni receptorji (NLR).....	3
1.3 RECEPTORJI NOD.....	3
1.3.1 Bakterijska celična stena .....	4
1.3.2 Receptor NOD2, ligandi in signalna pot .....	5
1.3.3 Receptor NOD2 in druge funkcije.....	6
1.3.4 Receptor NOD2 in z njim povezane bolezni .....	7
1.3.5 Potencialne terapevtske aplikacije agonistov receptorja NOD2.....	7
1.4 MIMETIKI MURAMIL DIPEPTIDA .....	7
1.4.1 Dezmuramilpeptidi.....	8
1.5 BIOIZOSTERNE ZAMENJAVE .....	13
1.5.1 Bioizosterne zamenjave estrov .....	14
2 NAMEN DELA.....	17
3 MATERIALI IN METODE .....	19
3.1 MATERIALI .....	19
3.2 METODE .....	19
3.2.1 Kromatografske metode .....	19
3.2.2 Spektroskopske metode.....	20
3.2.3 Določanje tališč .....	20
3.2.4 Optična sučnost.....	20
3.2.5 Biološko testiranje končnih spojin .....	21
4 EKSPERIMENTALNO DELO.....	22
4.1 REAKCIJSKA SHEMA 1.....	22
4.1.1 Sinteza (S)-1-etoksi-3-metil-1-oksobutan-2-aminijevega klorida (1).....	22
4.1.2 Sinteza ( <i>terc</i> -butoksikarbonil)-glicina (2) .....	23

4.1.3	Sinteza etil ( <i>terc</i> -butoksikarbonil)-glicil-L-valinata (3) .....	24
4.1.4	Sinteza etil ( <i>E</i> )-(3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)-glicil-L-valinata (4) .....	24
4.1.5	Sinteza ( <i>E</i> )-(3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)-glicil-L-valina (5).....	25
4.2	REAKCIJSKA SHEMA 2.....	27
4.2.1	Sinteza ( <i>terc</i> -butoksikarbonil)-D-glutaminske kisline (6) .....	27
4.2.2	Sinteza <i>terc</i> -butil ( <i>R</i> )-(1,5-bis(butilamino)-1,5-dioksopentan-2-il)karbamata (7) .....	28
4.2.3	Sinteza <i>terc</i> -butil ( <i>R</i> )-(1,5-bis(metilamino)-1,5-dioksopentan-2-il)karbamata (8)...	29
4.2.4	Sinteza <i>terc</i> -butil ( <i>R</i> )-(1,5-bis(metoksiamino)-1,5-dioksopentan-2-il)karbamata (9).....	30
4.2.5	Sinteza <i>terc</i> -butil ( <i>R</i> )-(1,5-bis(etilamino)-1,5-dioksopentan-2-il)karbamata (10) ....	31
4.2.6	Sinteza <i>terc</i> -butil ( <i>R</i> )-(1,5-bis(dietilamino)-1,5-dioksopentan-2-il)karbamata (11) .	31
4.2.7	Poskus sinteze <i>terc</i> -butil ( <i>R</i> )-(1,5-diokso-1,5-di(pirolidin-1-il)pentan-2-il)karbamata (12).....	32
4.2.8	Sinteza <i>terc</i> -butil ( <i>R</i> )-(1,5-bis( <i>N</i> -metoksi- <i>N</i> -metilamino)-1,5-dioksopentan-2-il)karbamata (13).....	33
4.2.9	Sinteza di- <i>terc</i> -butil ( <i>terc</i> -butoksikarbonil)-D-glutamata (14).....	34
4.2.10	Sinteza <i>terc</i> -butil <i>N</i> <sup>2</sup> -( <i>terc</i> -butoksikarbonil)- <i>N</i> <sup>5</sup> -butil-D-glutaminata (15) .....	35
4.2.11	Sinteza <i>terc</i> -butil <i>N</i> <sup>2</sup> -( <i>terc</i> -butoksikarbonil)- <i>N</i> <sup>5</sup> -metoksi-D-glutaminata (16) .....	36
4.2.12	Sinteza <i>terc</i> -butil ( <i>R</i> )-2-(( <i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)-5-okso-5-(pirolidin-1-il)pentanoata (17).....	37
4.2.13	Sinteza <i>terc</i> -butil <i>N</i> <sup>2</sup> -( <i>terc</i> -butoksikarbonil)- <i>N</i> <sup>5</sup> -metoksi- <i>N</i> <sup>5</sup> -metil-D-glutaminata (18).....	38
4.2.14	Sinteza <i>terc</i> -butil <i>N</i> <sup>2</sup> -( <i>terc</i> -butoksikarbonil)- <i>N</i> <sup>5</sup> , <i>N</i> <sup>5</sup> -dietil-D-glutaminata (19) .....	38
4.2.15	Sinteza <i>terc</i> -butil <i>N</i> <sup>5</sup> -( <i>terc</i> -butoksi)- <i>N</i> <sup>2</sup> -( <i>terc</i> -butoksikarbonil)-D-glutaminata (20)..	39
4.2.16	Sinteza <i>terc</i> -butil ( <i>R</i> )-4-(( <i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)-5-(butilamino)-5-oksopentanoata (21) .....	40
4.2.17	Sinteza <i>terc</i> -butil ( <i>R</i> )-4-(( <i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)-5-(metoksiamino)-5-oksopentanoata (22) .....	41
4.2.18	Sinteza <i>terc</i> -butil ( <i>R</i> )-4-(( <i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)-5-okso-5-(pirolidin-1-il)pentanoata (23).....	42
4.2.19	Sinteza <i>terc</i> -butil ( <i>R</i> )-4-(( <i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)-5-(metoksi(metil)amino)-5-oksopentanoata (24) .....	42
4.2.20	Sinteza <i>terc</i> -butil ( <i>R</i> )-4-(( <i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)-5-(dietilamino)-5-oksopentanoata (25) .....	43
4.2.21	Sinteza <i>terc</i> -butil ( <i>R</i> )-5-( <i>terc</i> -butoksiamino)-4-(( <i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)-5-oksopentanoata (26) .....	44
4.3	REAKCIJSKA SHEMA 3.....	46

4.3.1	Sinteza dietil (( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil-D-glutamata (27).....	46
4.3.2	Sinteza (( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil-D-glutaminske kisline (28).....	47
4.4	REAKCIJSKA SHEMA 4.....	48
4.4.1	Sinteza ( <i>R</i> )- <i>N</i> <sup>1</sup> , <i>N</i> <sup>5</sup> -dibutil-2-(( <i>S</i> )-2-(2-(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)pentan-1,5-diamida (29).....	49
4.4.2	Poskus sinteze ( <i>R</i> )-2-(( <i>S</i> )-2-(2-(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil) akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)- <i>N</i> <sup>1</sup> , <i>N</i> <sup>5</sup> -dimetilpentan-1,5-diamida (30).....	50
4.4.3	Poskus sinteze ( <i>R</i> )-2-(( <i>S</i> )-2-(2-(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil) akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)- <i>N</i> <sup>1</sup> , <i>N</i> <sup>5</sup> -dimetoksipentan-1,5-diamida (31).....	52
4.4.4	Sinteza di- <i>terc</i> -butil (( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil-D-glutamata (32).....	53
4.4.5	Sinteza ( <i>R</i> )- <i>N</i> <sup>1</sup> , <i>N</i> <sup>5</sup> -dietil-2-(( <i>S</i> )-2-(2-(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)pentan-1,5-diamida (33).....	56
4.4.6	Sinteza ( <i>R</i> )- <i>N</i> <sup>1</sup> , <i>N</i> <sup>1</sup> , <i>N</i> <sup>5</sup> , <i>N</i> <sup>5</sup> -tetraetil-2-(( <i>S</i> )-2-(2-(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)pentan-1,5-diamida (34).....	57
4.4.7	Sinteza ( <i>R</i> )-2-(( <i>S</i> )-2-(2-(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido) acetamido)-3-metilbutanamido)- <i>N</i> <sup>1</sup> , <i>N</i> <sup>5</sup> -dimetoksi- <i>N</i> <sup>1</sup> , <i>N</i> <sup>5</sup> -dimetilpentan-1,5-diamida (35).....	58
4.4.8	Sinteza <i>terc</i> -butil <i>N</i> <sup>5</sup> -butil- <i>N</i> <sup>2</sup> -(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil-D-glutaminata (36).....	60
4.4.9	Sinteza <i>terc</i> -butil <i>N</i> <sup>2</sup> -(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil- <i>N</i> <sup>5</sup> -metoksi-D-glutaminata (37).....	61
4.4.10	Sinteza <i>terc</i> -butil ( <i>R</i> )-2-(( <i>S</i> )-2-(2-(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)-5-okso-5-(pirolidin-1-il)pentanoata (38).....	62
4.4.11	Sinteza <i>terc</i> -butil <i>N</i> <sup>2</sup> -(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil- <i>N</i> <sup>5</sup> -metoksi- <i>N</i> <sup>5</sup> -metil-D-glutaminata (39).....	64
4.4.12	Sinteza <i>terc</i> -butil <i>N</i> <sup>5</sup> , <i>N</i> <sup>5</sup> -dietil- <i>N</i> <sup>2</sup> -(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil-D-glutaminata (40).....	65
4.4.13	Sinteza <i>terc</i> -butil <i>N</i> <sup>5</sup> -( <i>terc</i> -butoksi)- <i>N</i> <sup>2</sup> -(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil-D-glutaminata (41).....	66
4.4.14	Sinteza <i>terc</i> -butil ( <i>R</i> )-5-(butilamino)-4-(( <i>S</i> )-2-(2-(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)-5-oksopentanoata (42).....	68
4.4.15	Sinteza <i>terc</i> -butil ( <i>R</i> )-4-(( <i>S</i> )-2-(2-(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)-5-(metoksiamino)-5-oksopentanoata (43).....	69
4.4.16	Sinteza <i>terc</i> -butil ( <i>R</i> )-4-(( <i>S</i> )-2-(2-(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)-5-okso-5-(pirolidin-1-il)pentanoata (44).....	70

4.4.17	Sinteza <i>terc</i> -butil ( <i>R</i> )-4-(( <i>S</i> )-2-(2-(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)-5-(metoksi(metil)amino)-5-oksopentanoata (45) .....	72
4.4.18	Sinteza <i>terc</i> -butil ( <i>R</i> )-5-(dietilamino)-4-(( <i>S</i> )-2-(2-(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)-5-oksopentanoata (46) .....	73
4.4.19	Sinteza <i>terc</i> -butil ( <i>R</i> )-5-( <i>terc</i> -butoksiamino)-4-(( <i>S</i> )-2-(2-(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)-5-oksopentanoata (47) .....	74
5	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	76
5.1	UVEDBA <i>TERC</i> -BUTILKARBAMATNE ZAŠČITE .....	76
5.2	ODSTRANITEV <i>TERC</i> -BUTILKARBAMATNE ZAŠČITE .....	76
5.3	TVORBA ESTRSKE VEZI.....	78
5.4	HIDROLIZA ESTRSKE VEZI.....	79
5.5	TVORBA AMIDNE VEZI.....	80
5.6	BIOLOŠKO TESTIRANJE .....	85
6	SKLEPI .....	88
7	LITERATURA.....	89

## POVZETEK

Imunski sistem je pomemben za človeški organizem, saj ga varuje pred patogeni, tumorskimi celicami in pred drugimi telesu tujimi snovmi. V sklopu naravnega imunskega sistema imamo prisotne receptorje, locirane na površini celic ali v citosolu, ki prepoznavajo molekulske vzorce značilne za tujke, med katere sodi tudi receptor z nukleotid vezočo oligomerizacijsko domeno 2 (receptor NOD2). Ta prepozna muramil dipeptid, ki je specifičen strukturni fragment peptidoglikanske plasti v grampozitivnih in gramnegativnih bakterijah. Ko receptor NOD2 prepozna in veže ligande, sproži signalno pot, ki vodi do nastanka citokinov, antimikrobnih peptidov, kisikovih/dušikovih zvrsti in drugih vnetnih faktorjev. S tem se sproži proces vnetja in obramba telesa proti zaznanemu tujku.

V magistrski nalogi smo načrtovali in sintetizirali nove analoge spojine vodnice, dietil ((*E*)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil-D-glutamata, ki se je že v predhodni raziskavi izkazala kot močan agonist receptorja NOD2 z vrednostjo  $EC_{50} = 46$  nM. Spojina vodnica se je v *in vivo* raziskavah žal izkazala kot metabolno dokaj nestabilna. Kot metabolno labilne elemente v strukturi spojine vodnice smo identificirali etilne estre, zato smo v procesu načrtovanja nove serije spojin te etilne estre zamenjali z metabolno stabilnejšimi bioizosterami (amidi, hidroksamati, *terc*-butilni ester) in tako sintetizirali 17 novih dezmuramilpeptidov. Njihovo agonistično delovanje so ovrednotili na NOD2 specifičnih celicah HEK-Blue™ hNOD2 in ugotovili, da so imele vse spojine slabšo aktivnost kot spojina vodnica in MDP. Iz tega smo sklepali, da je naša spojina vodnica dejansko predzdravilo, karboksilna kislina, ki nastane pri hidrolizi estra, aktivna učinkovina, ki se veže na NOD2, estrski skupini pa izboljšata prehajanje membran. Šibko agonistično aktivnost so izkazale spojine **32**, **37**, **38** in **39**. Ker so imele vse na  $\alpha$ -mestu D-glutaminske kisline *terc*-butilni ester, ki lahko hidrolizira, bi lahko iz tega sklepali, da je prosta  $\alpha$ -karboksilna skupina bolj pomembna za vezavo na NOD2 kot pa prosta  $\gamma$ -karboksilna skupina. Ker so bile spojine slabi agonisti NOD2, bi lahko v prihodnje razmislili še o drugih možnosti za optimizacijo spojine vodnice.



## ABSTRACT

The immune system is important for the human organism as it protects it against pathogens, tumour cells and other foreign bodies. As part of natural immune system there are receptors located on the cell surface or in the cytosol that recognize molecular patterns characteristic of foreign patterns, including nucleotide-binding oligomerization domain receptor 2 (NOD2). The latter recognizes muramyl dipeptides, which are specific structural fragments of peptidoglycan layer in Gram-positive and Gram-negative bacteria. On recognition and binding of its cognate ligand NOD2 triggers a signaling pathway that leads to the production of cytokines, antimicrobial peptides and oxygen/nitrogen species. This sets off the inflammatory process and in turn the body's defense against detected microbes.

In the scope of our Master's thesis we designed and synthesized new analogues of our lead compound, diethyl ((E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acryloyl)glycyl-L-valyl-D-glutamate, identified in a previous study as a strong NOD2 agonist ( $EC_{50} = 46\text{nM}$ ). The lead compound unfortunately proved to be quite metabolically unstable in *in vivo* studies. We presumed the presence of ethyl ester functionalities as the underlying reason for metabolic instability in the structure of lead compound, therefore we designed a new series of compounds and replaced these esters with their metabolically more stable bioisosteres (amides, hydroxamates, *tert*-butyl esters), which afforded 17 new desmuramylpeptides. Their agonistic activity was evaluated on NOD2 specific HEK-Blue™-hNOD2 cells and it was found that all tested compounds exhibited a lower activity than that of our lead compound and MDP. We concluded that our lead compound is a prodrug and that the carboxylic acid formed by ester hydrolysis is actually the active species that binds to NOD2, while the ester groups improve the membrane permeability. Compounds **32**, **37**, **38** and **39** incorporating  $\alpha$ -*tert*-butyl ester moiety of D-glutamic acid in their structures have shown weak agonist activity. Given the fact such esters can easily undergo hydrolysis *in vitro*, this suggests that the free  $\alpha$ -carboxyl group is more important for binding to NOD2 than the free  $\gamma$ -carboxyl group. Nevertheless, the compounds synthesized were poor NOD2 agonists, therefore other possibilities for the optimisation of the lead compound will be considered in future design.

## KLJUČNE BESEDE

Imunski sistem, receptor NOD2, dezmuramilpeptidi, agonisti NOD2, bioizosterne zamenjave

## KEYWORDS

Immune system, NOD2 receptor, desmuramylpeptides, NOD2 agonists, bioisosteric replacements

## SEZNAM OKRAJŠAV

<b>ADP</b>	adenozin difosfat; <i>angl. adenosine diphosphate</i>
<b>ATP</b>	adenozin trifosfat; <i>angl. adenosine triphosphate</i>
<b>BIR</b>	domena bakulovirusnega zaviralca; <i>angl. baculovirus inhibitor repeat domain</i>
<b>Boc</b>	<i>tert</i> -butiloksikarbonil; <i>angl. tert-butoxycarbonyl</i>
<b>Boc<sub>2</sub>O</b>	di- <i>tert</i> -butil dikarbonat; <i>angl. di-tert-butyl dicarbonate</i>
<b>BOP</b>	(benzotriazol-1-iloksi)tris(dimetilamino)fosfonijev heksafluorofosfat
<b>CARD</b>	domena kaspazne aktivacije; <i>angl. caspase activation and recruitment domain</i>
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	devteriran kloroform
<b>CDK2</b>	ciklin odvisna kinaza 2; <i>angl. cyclin-dependent kinase 2</i>
<b>d</b>	dublet
<b>dd</b>	dublet dubleta
<b>δ</b>	kemijski premik
<b>DAMP</b>	molekulski vzorci povezani z nevarnostjo; <i>angl. danger-associated molecular pattern</i>
<b>DCC</b>	<i>N,N'</i> -dicikloheksilkarbodiimid
<b>DIC</b>	diizopropilkarbodiimid
<b>DKM</b>	diklorometan
<b>DMAP</b>	4-dimetilaminopiridin
<b>DMF</b>	dimetilformamid

<b>DMSO-d<sub>6</sub></b>	devteriran dimetilsulfoksid
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kislina; <i>angl. deoxyribonucleic acid</i>
<b>DUOX2</b>	dvojna oksidaza 2; <i>angl. dual oxidase 2</i>
<b>EDC×HCl</b>	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid
<b>ekv.</b>	ekvivalent
<b>ESI</b>	ionizacija z razprševanjem v električnem polju; <i>angl. electrospray ionization</i>
<b>GlcNAc</b>	N-acetilglukozamin
<b>GMDP</b>	glukozaminil muramil dipeptid
<b>HOAt</b>	1-hidroksi-7-azabenzotriazol
<b>HOBt</b>	1-hidroksibenzotriazol
<b>HPLC</b>	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti; <i>angl. high performance liquid chromatography</i>
<b>HR-MS</b>	masna spektrometrija visoke ločljivosti; <i>angl. high resolution mass spectrometry</i>
<b>HSP</b>	protein toplotnega šoka; <i>ang. heat shock protein</i>
<b>iE-DAP</b>	γ-D-Glu- <i>mezo</i> -diaminopimelinska kislina
<b>IL</b>	interlevkin
<b>IR</b>	infrardeča spektroskopija; <i>angl. infrared spectroscopy</i>
<b>IRF</b>	interferon regulirajoči faktor; <i>angl. interferon regulatory factor</i>
<b>J</b>	sklopitvena konstanta
<b>LPS</b>	lipopolisaharid
<b>LRR</b>	domena, bogata z levcinom; <i>angl. leucine-rich repeat</i>
<b>m</b>	multiplet
<b>MAPK</b>	z mitogenom aktivirana proteinska kinaza; <i>angl. mitogen activated protein kinase</i>
<b>MB</b>	murabutid
<b>MDP</b>	muramil dipeptid
<b>MeOD</b>	devteriran metanol
<b>mezo-DAP</b>	<i>mezo</i> -diaminopimelinska kislina; <i>angl. meso-diaminopimelic acid</i>
<b>MHC</b>	poglavitni kompleks tkivne skladnosti; <i>angl. major histocompatibility complex</i>
<b>Mr</b>	realtivna molekulska masa

<b>MS</b>	masna spektrometrija; <i>angl. mass spectrometry</i>
<b>MurNAc</b>	N-acetilmuraminska kislina
<b>NACHT</b>	domena, prisotna v NAIP, CIITA, HET-E in TEP1
<b>Celice NK</b>	naravne celice ubijalke; <i>angl. natural killer cells</i>
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	jedrni faktor $\kappa$ B; <i>angl. nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>
<b>NLR</b>	NOD-u podoben receptor; <i>angl. NOD-like receptor</i>
<b>NMR</b>	jedrski magnetna resonanca; <i>angl. nuclear magnetic resonance</i>
<b>NOD</b>	nukleotid-vezoča oligomerizacijska domena; <i>angl. nucleotide-binding oligomerization domain</i>
<b>PAMP</b>	molekulski vzorci, povezani z mikrobi; <i>angl. pathogen-associated molecular patterns</i>
<b>PBMC</b>	mononuklearne celice periferne krvi; <i>angl. peripheral blood mononuclear cells</i>
<b>PRR</b>	receptorji za prepoznavo molekulskih vzorcev; <i>angl. pattern recognition receptors</i>
<b>PyBOP</b>	(benzotriazol-1-iloksi)tripirolidinofosfonijev heksafluorofosfat
<b>PYD</b>	pirinska domena; <i>angl. pyrin domain</i>
<b>Rf</b>	retencijski faktor
<b>RIG-I</b>	z retinojsko kislino inducibilen gen I; <i>angl. retinoic acid-inducible gene I</i>
<b>RIPK2</b>	z receptorjem interagirajoča serin/treonin protein kinaza 2; <i>angl. receptor-interacting serine/threonine protein kinase 2</i>
<b>RLR</b>	receptor podoben RIG-I; <i>angl. RIG-I-like receptors</i>
<b>s</b>	singlet
<b>SEAP</b>	izločena zarodna alkalna fosfataza; <i>angl. secreted embryonic alkaline phosphatase</i>
<b>t</b>	triplet
<b>T</b>	temperatura
<b>TBTU</b>	O-(benzotriazol-1-il)- N,N,N',N'-tetrametiluronijev tetrafluoroborat
<b>tr</b>	retencijski čas
<b>Tc</b>	citotoksična celica T; <i>angl. cytotoxic T cell</i>
<b>TFA</b>	trifluoroocetna kislina
<b>T<sub>H</sub></b>	celica T pomagalka; <i>angl. T helper cell</i>

<b>THF</b>	tetrahidrofurán
<b>TLC</b>	tankoplastna kromatografija; <i>angl. thin layer chromatography</i>
<b>TLR</b>	Toll-u podobén receptor; <i>angl. Toll-like receptor</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	tumor nekrotizirajoči faktor $\alpha$ ; <i>angl. tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
<b>TriDAP</b>	tripeptid L-Ala-D-Glu- <i>mezo</i> -diaminopimelinska kislina

# 1 UVOD

## 1.1 IMUNSKI SISTEM

Imunski sistem ima dve plati zgodbe. Po eni strani nas varuje pred patogeni, tumorskimi celicami in pred drugimi telesu tujimi snovmi. Pri tem je njegova glavna naloga preprečiti nastanek in izkoreniniti že nastale okužbe/tumorje. Po drugi strani pa prekomerno, sepcifično aktiviran imunski sistem deluje tudi škodljivo, saj povzroča nastanek številnih bolezni, od avtoimunskih, pri katerih lastne celice ali tkiva prepozna kot tujke, do mnogih drugih (1).

Imunski odziv delimo na prirojeno (naravno ali nespecifično) imunost in pridobljeno (adaptivno ali specifično) imunost. Prirojena imunost je nespecifična, odzove se takoj po stiku s tujkom in sicer vsakič po enakem vzorcu, poleg tega pa nima imunskega spomina. Pri naravni imunosti v prvi vrsti sodelujejo mehanske in fizikalno-kemijske bariere (npr. koža, sluznične pregrade, želodčna kislina, spiranje sečil). Če jih mikroorganizem uspe zaobiti, se sreča z nevtrofilci in makrofagi, ki pričnejo s fagocitozo. Naravne celice ubijalke (celice NK) prepoznavajo z virusi okužene in tumorske celice in jih uničijo. Pomembno vlogo ima tudi komplement, ki sodeluje pri naravni in pridobljeni imunosti. Gre za skupino beljakovin, ki po aktivaciji pomagajo pri fagocitozi in pri odstranjevanju mikroorganizmov iz telesa, saj na mesto vnetja pritegnejo levkocite, ki sproščajo citokine in druge vnetne mediatorje. Citokini so proteinske ali glikoproteinske molekule, pomembne za signalizacijo in komunikacijo med celicami. Sprožijo tudi proces vnetja, kar omogoči večjo prepustnost endotelijskih barier, da lahko plazemske beljakovine vstopajo na mesta vnetja in tja pritegnejo še več levkocitov, ki pospešeno fagocitirajo mikrobo in odpravljajo škodo v celicah (2, 3, 4).

Pridobljena imunost se razvije počasneje in je specifična, kar pomeni, da ločuje med tujimi celicami glede na njihove antigene. Antigeni so različne molekule, ki jih prepoznamo preko specifičnega imunskega odziva. Ko se imunski sistem sreča z mikroorganizmom, si to zapomni in naslednjič poveča učinkovitost obrambe (imunski spomin). Glede na komponente in mehanizme, ki sodelujejo pri odzivu na mikrobo, delimo pridobljeno imunost na humoralno in celično posredovano imunost (2, 3, 4).

Pri humoralni imunosti sodelujejo limfociti B, ki ob stiku s specifičnimi antigeni mikroba proizvajajo protitelesa. Le-ta se nato vežejo na antigene tujkov in pomagajo pri njihovi izločitvi iz telesa. Pri tem gre sicer za obrambo zunaj celic, limfociti B pa so sposobni zaznati veliko različnih tipov molekul (proteini, ogljikovi hidrati, nukleinske kisline, lipidi) (2, 3, 4).

Po drugi strani pa pri obrambi proti znotrajceličnim patogenom in tumorskim celicam v sklopu pridobljene imunosti sodelujejo limfociti T, kar predstavlja celično imunost. Delimo jih na citotoksične limfocite T<sub>c</sub> (celice ubijalke) in celice T<sub>H</sub> pomagalka. Okužene celice izrazijo na svoji površini antigen, ki je vezan na molekule poglobitnega kompleksa tkivne skladnosti I (MHC I). Ko citotoksični limfocit T<sub>c</sub> prepozna antigen na MHC I, začne s postopkom uničenja okužene celice. Medtem pa celica T<sub>H</sub> pomagalka prepozna antigene vezane na kompleksih MHC II na površini makrofagov, kjer so jih slednji predstavili po fagocitozi in procesiranju mikroorganizmov. Po tem začne celica pomagalka izločati številne citokine, ki v delovanju pomagajo limfocitom B, citotoksičnim limfocitom T<sub>c</sub>, makrofagom in vsem ostalim celicam, ki sodelujejo pri vnetju (2, 3, 4).

## 1.2 RECEPTORJI ZA PREPOZNAVO MOLEKULSKIH VZORCEV (PRR)

V prirojenem imunskem sistemu poznamo štiri večje skupine receptorjev za prepoznavo molekulskih vzorcev (PRR). Toll-u podobni receptorji (TLR) in receptorji lektina tipa C so pretežno locirani zunaj celice in vezani na membrane. NOD-u podobni receptorji (NLR) in RIG-u podobni receptorji (RLR) pa se nahajajo znotraj celice (4, 5). Vsi prepoznavajo molekulske vzorce, prisotne pri patogenih, ki jih imenujemo molekulske vzorci, povezani z mikrobi (PAMP). Hkrati pa zmorejo prepoznati tudi endogene produkte tkivnih poškodb imenovane molekulske vzorci, povezani z nevarnostjo (DAMP) (4, 5, 6).

**Preglednica I:** Reprezentativni primeri molekulskih vzorcev, povezanih z mikrobi (PAMP), in molekulskih vzorcev, povezanih z nevarnostjo (DAMP) (prirejeno po (6)).

	Reprezentativni primeri molekulskih vzorcev
<b>PAMP</b>	Lipopolisaharid, nukleinska kislina, lipoprotein, lipoteihoična kislina, flagelin
<b>DAMP</b>	Mitohondrijska DNA, stresni proteini (HSP), IL-1a, IL-33

Ko PRR prepoznajo vzorce PAMP ali DAMP, sprožijo signalno pot, ki vodi k aktivaciji jedrnega faktorja  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), z mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK) in z

interferoni reguliranih faktorjev (IRF). To povzroči transkripcijo vnetnih dejavnikov kot so citokini, antimikrobni peptidi in reaktivne kisikove/dušikove zvrsti. Sproži se vnetje in s tem obramba telesa proti zaznanemu tujku. Regulacija celotne signalne poti je nadzorovana na več stopnjah, saj si ne želimo premajhnega ali prevelikega imunskega odgovora (5, 7).

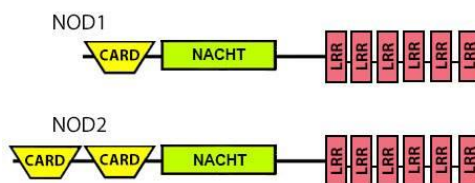
### 1.2.1 NOD-u podobni receptorji (NLR)

Skupina NOD-u podobnih receptorjev prepoznava PAMP in DAMP, ki se nahajajo v citoplazmi. Sestavljeni so iz treh domen (slika 1): (i) N-terminalna efektorska domena je odgovorna za interakcijo protein-protein; (ii) centralna nukleotid vezoča domena (NACHT) spodbuja oligomerizacijo in aktivacijo receptorja; (iii) C-terminalna, z levcinom bogata domena (LRR) pa je odgovorna za vezavo ligandov (5). NLR lahko razdelimo v pet večjih podskupin, ki se razlikujejo po N-terminalni domeni:

- NLRA: vsebuje kislo transaktivacijsko domeno,
- NLRB: vsebuje ponavljajočo domeno bakulovirusnega inhibitorja (BIR),
- NLRC: vsebuje domeno kaspazne aktivacije (CARD),
- NLRP: vsebuje pirinsko domeno (PYD),
- NLRX: vsebuje še neznano domeno (8, 9).

## 1.3 RECEPTORJI NOD

Receptorja NOD1 in NOD2 spadata v skupino NLRC, razlikujeta pa se v številu CARD domen na N-terminalni efektorski domeni. Receptor NOD1 ima eno domeno CARD, receptor NOD2 pa dve (slika 1) (5, 10). Oba zaznavata specifične fragmente bakterijskega peptidoglikana in sprožita signalno pot, ki vodi do imunskega odziva. Receptor NOD1 kot najmanjši ligand zazna in veže D-Glu-*mezo*-diaminopimelinsko kislino (iE-DAP), ki jo najdemo večinoma v gramnegativnih bakterijah. Receptor NOD2 pa kot najmanjši ligand prepozna muramil dipeptid (MDP), ki ga najdemo tako v gramnegativnih kot tudi v grampozitivnih bakterijah (8, 10).



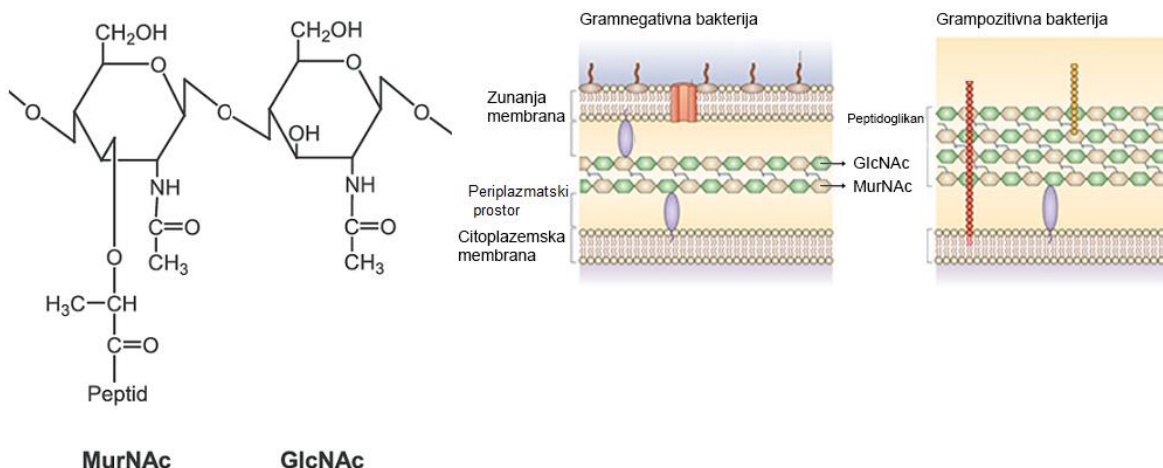
**Slika 1:** Shematski prikaz strukture receptorjev NOD1 in NOD2 (CARD = domena kaspazne aktivacije, NACHT = centralna nukleotid vezoča domena, LRR = z levcinom bogata domena).



### 1.3.1 Bakterijska celična stena

V gramnegativnih bakterijah se med citoplazmo in zunanjo membrano nahaja tanka plast peptidoglikana, medtem ko je v grampozitivnih bakterijah ta plast debelejša in obdaja citoplazemsko membrano (slika 2). Peptidoglikan daje bakterijski celici obliko in je ključnega pomena za ohranjanje integritete bakterijske stene. Prav zaradi tega je peptidoglikan pogosta tarča zdravilnih učinkovin (11).

Peptidoglikan je sestavljen iz verig glikozaminoglikana, ki so prečno povezane v mrežo s kratkimi peptidi. Glikozaminoglikansko verigo izmenično sestavljata N-acetilglukozamin (GlcNAc) in N-acetilmuraminska kislina (MurNAc), povezana z 1,4- $\beta$  glikozidno vezjo (slika 2). Na MurNAc so vezani peptidi, sestavljeni iz treh do petih aminokislin. Na prvem mestu je po navadi L-alanin, na drugem D-izoglutamin ali D-glutaminska kislina, na četrtem in petem pa D-alanin. Tretje mesto dopušča največ sprememb, saj se na njem nahajajo bodisi L-lizin, L-ornitin ali *mezo*-DAP. Peptidi so med seboj tudi prečno povezani s peptidnimi vezmi, kar zagotavlja rigidnost peptidoglikanskega ovoja (12).

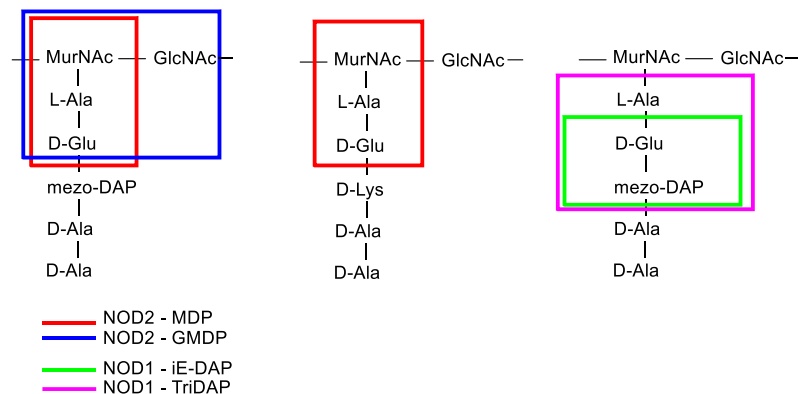


**Slika 2:** Strukturi MurNAc in GlcNAc ter struktura peptidoglikana v gramnegativni in grampozitivni bakteriji (povzeto po (13)).

Pri razpadu bakterijske celične stene zaradi bakterijskih encimov ali encimov gostitelja pride do nastanka monomernih fragmentov peptidoglikana, tako imenovanih muropeptidov. Iz monomerov po nadaljnji razgradnji nastane tudi eden glavnih razpadnih produktov muramil dipeptid (MDP). Slednji sicer lahko nastaja tudi pri biosintezi bakterijske celične stene (12).

### 1.3.2 Receptor NOD2, ligandi in signalna pot

Najmanjša strukturna enota peptidoglikana, ki se veže na receptor NOD2 in ga aktivira, je muramil dipeptid MurNAc-L-Ala-D-izoGln (14). Prepoznava pa tudi druge muramilpeptide: MurNAc-L-Ala-D-Glu in glukozaminil-MDP (GMDP, GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu/D-izoGln), ki so prisotni v strukturi peptidoglikana tako v grampozitivnih kot v gramnegativnih bakterijah. Prav tako lahko zazna tripeptidne muropeptide z L-lizinom ali L-ornitinom na tretjem mestu in *mezo*-DAP tip muropeptidov (slika 3), ki pa morajo biti prisotni v večjih koncentracijah (12).

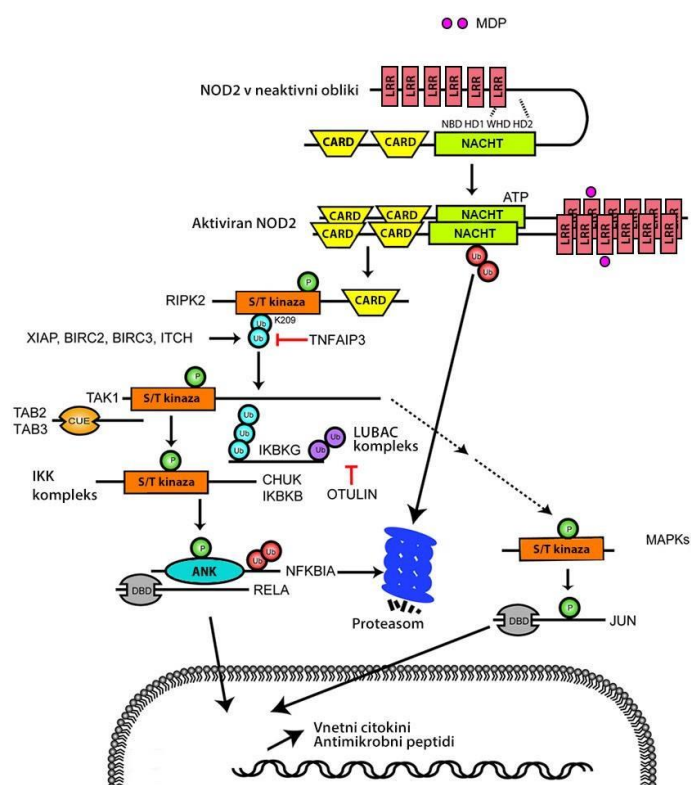


**Slika 3:** Shematski prikaz strukturnih elementov v enoti peptidoglikana, ki jih prepoznata receptorja NOD1 in NOD2 (prirejeno po (12)).

Muramil dipeptid preide v celico preko epitelijske membrane s pomočjo SLC15A1 (hPepT1) transporterjev. V celico pa prehaja tudi preko od klatrina odvisne endocitoze, kjer se transportira preko endosomske membrane z oligopeptidnimi transporterji SLC15A3, SLC15A4 in SLC46A2 pri rahlo kislih pogojih. Prehod MDP v citoplazmo omogočijo tudi bakterijski endotoksini, ki v membranah tvorijo pore (12).

Receptor NOD2 je sestavljen iz treh domen NACHT, LRR in CARD, od katerih ima prav vsaka svojo specifično vlogo. Domena NACHT veže ATP in ADP, kar je ključnega pomena za aktivacijo receptorja. Receptor NOD2 se sicer večinoma nahaja v neaktivni obliki, kjer je avtoinhibiran z domeno LRR, ki je zvita čez domeno NACHT, kar onemogoča nadaljnji prenos signala. Po vstopu v celico se MDP domnevno veže na domeno LRR, posledično pride do ADP-ATP izmenjave, kar sproži konformacijske spremembe in omogoči oligomerizacijo receptorja. Nato se preko CARD-CARD interakcij sproži aktivacija serin-treonin protein kinaze 2 (RIPK2), čemur sledi nadaljnja signalizacija, ki vodi v aktivacijo MAPK, NF- $\kappa$ B in IRF (slika 4) (5, 10, 12, 15, 16). Regulacija celotne poti je različna na posameznih stopnjah, odvisna pa je tudi od tipa

celice, v kateri se nahaja NOD2. Pri regulaciji sodelujejo številni različni proteini, citoskelet, predvsem pa je pomembna avtofosforilacija in ubikvitinacija RIPK2 (5, 10, 12).



**Slika 4:** Signalna pot receptorja NOD2 (MDP = muramil dipeptid, CARD = domena kaspazne aktivacije, NACHT = centralna nukleotid vezoča domena, LRR = z levcinom bogata domena, ATP = adozin trifosfat, RIPK2 = serin-treonin protein kinaza 2, S/T kinaza = serin-treonin kinaza, MAPK = z mitogenom aktivirana protein kinaza, NFκB = jedrni faktor κB, Ub = ubikvitinacija, P = fosforilacija, TAK1 = kinaza 1, ki jo aktivira transformirajoči rastni dejavnik β, TAB = protein, ki veže TAK1, IKK = kinaza IκB, IκB = inhibitor κB (prirejeno po (10)).

### 1.3.3 Receptor NOD2 in druge funkcije

Poleg prepoznavne fragmentov peptidoglikana in sodelovanja pri vnetnem dogajanju ima receptor NOD2 tudi druge funkcije.

- Spodbuja avtofagijo in tako uničuje mikrobo v citoplazmi (12).
- Preko aktivacije oksidaze DUOX2 proizvaja reaktivne kisikove zvrsti (12).
- Preko NO sintaze proizvaja dušikove reaktivne zvrsti (5).
- Skupaj s TLR inducira tudi specifičen tip imunskega odziva (5).
- Ne ščiti organizma samo pred bakterijskimi patogeni, ampak tudi pred paraziti in virusi (17).
- Uravnava okolje v celici in se odziva na stres povezan z endoplazemskim retikulumom in motnjo v aktinskem citoskeletu (17).

- Omogoča komunikacijo in uravnavanje aktivnosti med imunskim sistemom in mikrobioto (18).

### **1.3.4 Receptor NOD2 in z njim povezane bolezni**

Spremebe nukleotidnega zaporedja genov, ki kodirajo receptor NOD2 lahko povzročijo neustrezno regulacijo signalnih poti, kar vodi k pretirani ali k prešibki aktivaciji imunskega odziva (5). To lahko povzroči avtoimunske bolezni, kronična vnetja, neustrezen odziv proti mikrobnim infekcijam ali povečano tveganje za razvoj rakavih bolezni. Z receptorjem NOD2 so povezane številne bolezni: Crohnova bolezen, sindrom Blau, sarkoidoza, atopične bolezni, astma, artritis, multipla skleroza (5, 15, 19).

### **1.3.5 Potencialne terapevtske aplikacije agonistov receptorja NOD2**

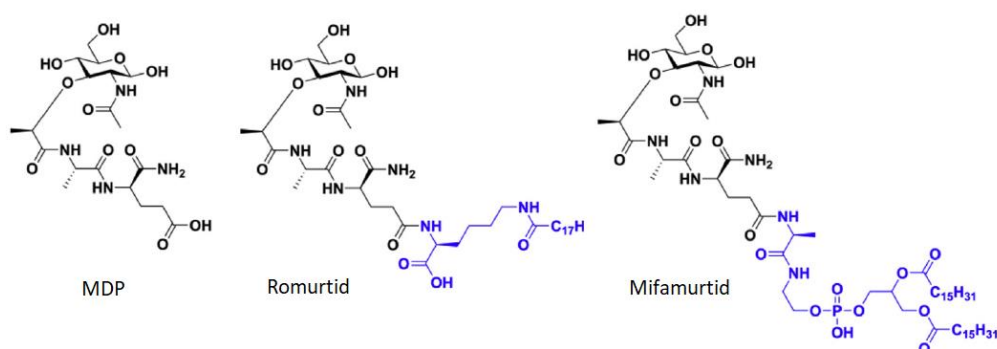
Agonisti receptorja NOD2 poleg delovanja na prirojeni imunski sistem vplivajo tudi na odziv pridobljenega imunskega sistema, kjer lahko delujejo kot adjuvansi. Sama cepiva namreč niso dovolj imunogena, zato jim ponavadi izboljšamo delovanje z dodatkom adjuvansov, ki povzročijo močnejši imunski odziv na antigen, ki ga cepivo vsebuje. Agonisti receptorja NOD2 lahko dosežejo še močnejše adjuvantno delovanje, če jih kombiniramo z drugimi ligandi receptorjev PRR, predvsem z ligandi receptorja TLR. Nekateri lipofilni derivati MDP so izkazali večjo adjuvantno aktivnost kot sam MDP, kar kaže na to, da lahko s strukturnimi modifikacijami še izboljšamo njihove adjuvantne lastnosti. Agonisti receptorja NOD2 delujejo sinergistično tudi z antibiotiki, kar nam omogoča boj proti rezistentnim bakterijam, zmanjšanje odmerka antibiotika in posledično zmanjšanje njegove toksičnosti. Sami po sebi pa imajo tudi posredno protimikrobno delovanje in sposobnost spodbujanja naravne odpornosti pred okužbami in tumorji. V prihodnje bi torej lahko agoniste receptorja NOD2 uporabljali kot:

- adjuvanse v cepivih,
- protimikrobne učinkovine,
- protitumorne učinkovine (12, 20).

## **1.4 MIMETIKI MURAMIL DIPEPTIDA**

MDP bi lahko bil koristen imunomodulator, ampak je preveč pirogen in artritogen, hitro se izloča in nima velike biološke uporabnosti pri peroralni aplikaciji. Iz teh razlogov so sintetizirali že številne analoge MDP, saj so z različnimi strukturnimi modifikacijami želeli

izboljšati njegove farmakološke lastnosti in zmanjšati njegovo toksičnost. Najuspešnejši hidrofilni derivati, ki so jih sintetizirali, so: murabutid (MB), temurtid, nor-MDP in GMDP. Romurtid in mifamurtid pa predstavljata najuspešnejša lipofilna derivata (14, 21), saj se že uporabljata v terapiji. Romurtid (Nopia®) je bil klinično odobren na Japonskem za zdravljenje levkopenije, ki nastane pri kemoterapiji. Mifamurtid (Mepact®) je bil odobren v Evropski uniji za zdravljenje nemetastatskega osteosarkoma (slika 5). Med hidrofilni derivati pa je bil v Rusiji klinično odobren GMDP (Likopid®) za zdravljenje infekcijskih bolezni, kot so kronične okužbe dihalnih poti in okužbe pri operacijah (12).

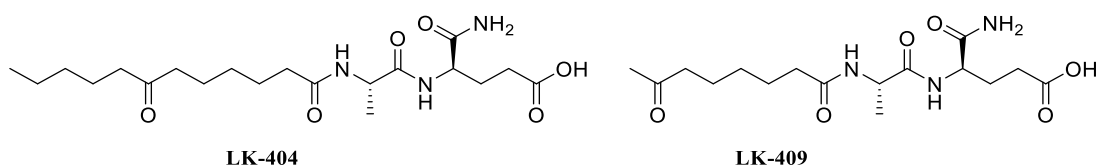


**Slika 5:** Struktura MDP in nekateri najuspešnejši mimetiki MDP (prirejeno po (22)).

### 1.4.1 Dezmuramilpeptidi

Načrtovanje novih derivatov je bilo v preteklosti zahtevno, saj ni bilo znanih dovolj podatkov o strukturi vezavnega mesta in je zato lahko potekalo zgolj na osnovi preučevanja odnosa med strukturo in delovanjem MDP. Pred kratkim pa so objavili kristalno strukturo zajčjega receptorja NOD2, kar bo v nadaljnje omogočalo tudi strukturno-podprto načrtovanje (20). V večih študijah (14, 21, 22, 23) se je izkazalo, da sladkorna enota MurNAc ni potrebna za aktivacijo NOD2. Spojine brez te sladkorne enote sicer imenujemo dezmuramilpeptidi (14, 21, 22, 23). Z modifikacijo različnih mest na dezmuramilpeptidih so raziskovalci poskušali razumeti strukturne zahteve za aktivacijo receptorja NOD2.

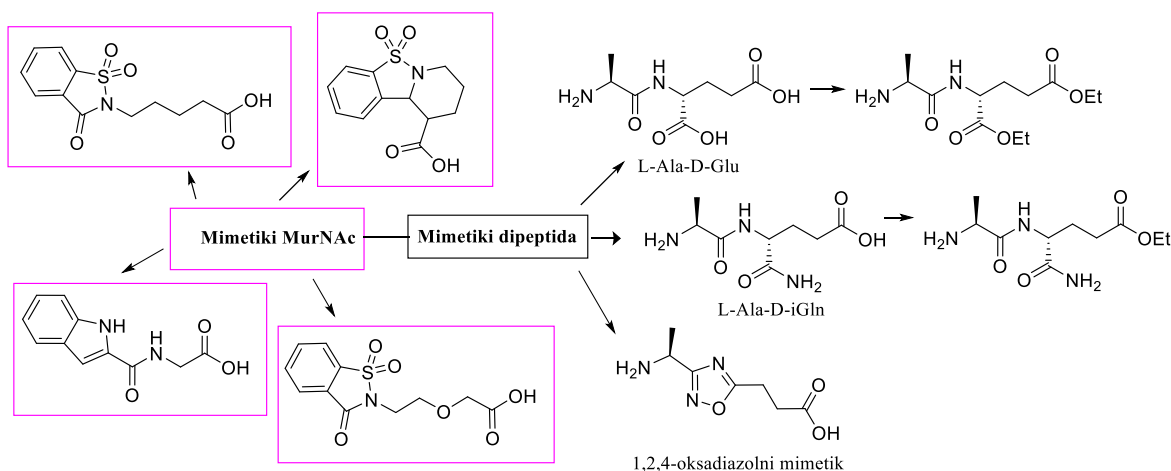
MDP lahko v celico prehaja aktivno preko peptidnega transporterja hPepT1, medtem ko dezmuramilpeptidi niso substrati tega transporterja. V celico domnevno preidejo preko pasivnega transporta, za katerega je ključnega pomena večja lipofilnost spojin (14). Sollner in sodelavci so kot nadomestek sladkornega dela na dipeptid vezali 7-oksoacilne skupine, ki so imele različno dolge alkilne verige in zaradi tega tudi različno stopnjo lipofilnosti (slika 6) (24).



**Slika 6:** Dezmuramilpeptida s 7-oksoacilnim fragmentom (prirejeno po (24)).

Spojina **LK-404** se je izkazala kot najbolj aktivna, bolj lipofilne spojine pa so imele zmanjšano biološko aktivnost. Čeprav je imela spojina **LK-409** imunomodulatorne lastnosti, se je izkazalo, da je apirogena, torej MurNAc del pripomore k pirogenosti (24). Pri sintezi spojin so ohranili ustrezno pozicijo in oddaljenost karbnilne skupine v MurNAc delu, kar je verjetno pomembno za vezavo na receptor (14, 24). Pri tej raziskavi sicer niso ovrednotili sposobnosti samih spojin za aktivacijo receptorja NOD2, temveč so izmerili le posredne imunomodulatorne učinke, zato nimamo na voljo vrednosti  $EC_{50}$  s katerimi bi omenjene spojine lahko umestili v širšo sliko.

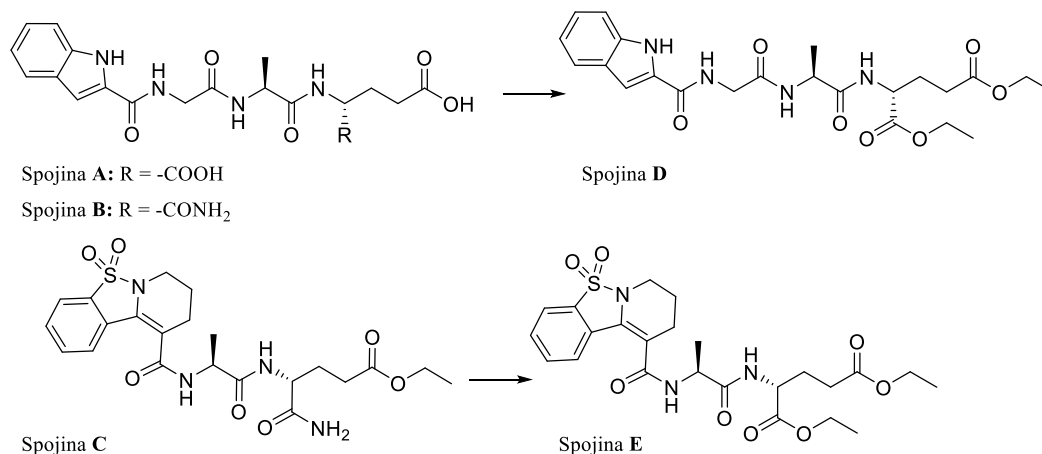
Jakopin in sodelavci so MurNAc del nadomestili z različnimi aromatskimi fragmenti in uvajali še modifikacije v drugih delih osnovne molekule (slika 7).



**Slika 7:** Nekateri mimetiki MurNAc in dipeptida, ki so jih uporabili pri sintezi novih dezmuramilpeptidov (prirejeno po (14, 21)).

Sladkorni del muramil dipeptida so zamenjali z indolnim in saharinskim obročem. Tovrstne mimetike pa so uspeli tudi rigidizirati v pirido-/pirolo-kondenziran(1,2)benzotiazolni obročni sistem. Mimetike MurNAc so sklopili z L-Ala-D-iGln, ki je dipeptid, ključen za prepoznavo NOD2. Uporabili so tudi strukturno soroden dipeptid L-Ala-D-Glu ter 1,2,4-oksadiazolne mimetike tega dipeptida. Saharinski in

indolni obročni sistem sta bila z omenjenimi dipeptidi povezana preko različno dolgih distančnikov. Z njimi so prav tako želeli obdržati točno določeno pozicijo karbonylne skupine. Na reprezentativnem primeru so naredili tudi zamenjavo L-Ala z D-Ala in D-izoGln z L-izoGln, kar je zmanjšalo zmožnost stimulacije izločanja citokinov iz imunskih celic, zato so sklepali, da je prisotna stereoselektivna prepoznavna (14). Tudi pri tej raziskavi niso ovrednotili neposrednih sposobnosti samih spojin za aktivacijo receptorja NOD2, temveč so izmerili le posredne imunomodulatorne učinke.



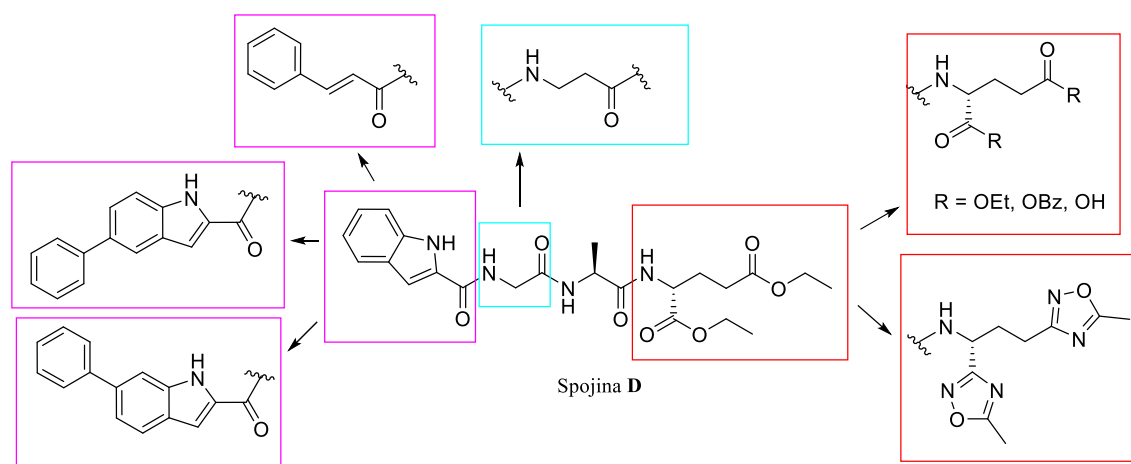
**Slika 8:** Sintetizirani dezmuramilpeptidi, ki vsebujejo indolni ali saharinski fragment in izkazujejo dobre imunomodulatorne lastnosti (prirejeno po (14, 21)).

V testiranju so uporabili z lipopolisaharidom (LPS) inducirane THP-1 celice in merili njihovo zmožnost indukcije izločanja TNF- $\alpha$ . Spojine same sicer niso proizvajale TNF- $\alpha$ , sta pa spojini **A** in **B** (slika 8) povečali z LPS-inducirano izločanje TNF- $\alpha$ . Ta učinek so nato preverili še na LPS-stimuliranih človeških mononuklearnih celicah periferne krvi (PBMC), kjer so merili vpliv na izločanje citokinov. Spojini **A** in **B** sta zmanjšali nastajanje vnetnih citokinov (imunopresija), spojina **C** (slika 8) pa je, ravno nasprotno, povečala njihovo izločanje (imunostimulacija). Ker nobena spojina ni imela boljšega delovanja kot MB ali MDP, so sklepali, da spojine bodisi niso bile dovolj permeabilne, da bi prehajale celično steno ali pa je odsotnost MurNAc vplivala na vezavno afiniteto do receptorja NOD2 (14).

Mimetike sladkornega dela, ki so se izkazali za najuspešnejše, so uporabili v naslednji raziskavi. Tokrat so jih sklopili z dipeptidoma L-Ala-D-iGln in L-Ala-D-Glu, ki sta imela karboksilni skupini maskirani v obliki etilnih estrov, s čimer so povečali lipofilnost in permeabilnost spojin. Težava karboksilnih kislin je namreč ta, da so pri fiziološkem pH-ju negativno nabite in zato težje pasivno prehajajo preko membrane v celico (21).

Na celični liniji HEK-Blue NOD2 so nato testirali njihovo NOD2 agonistično aktivnost. Kot veliko bolj aktivne so se izkazale spojine z dipeptidom L-Ala-D-Glu, kot spojine z L-Ala-D-iGln, po vsej verjetnosti zaradi večje lipofilnosti. Spojini **D** in **E** (slika 8) sta izkazali NOD2 agonistično delovanje, primerljivo z MB, spojina **D** pa se je izkazala kot aktivna tudi v funkcijskem testu, saj je povečala izločanje TNF- $\alpha$  iz PBMC (21).

Ker je bila spojina **D** najučinkovitejša, so jo kot spojino vodnico uporabili v nadaljnji raziskavi. Namesto sladkorne enote so uporabili različne mimetike indolnega obroča, sam indolni obroč pa so tudi različno funkcionalizirali (slika 9) (22).



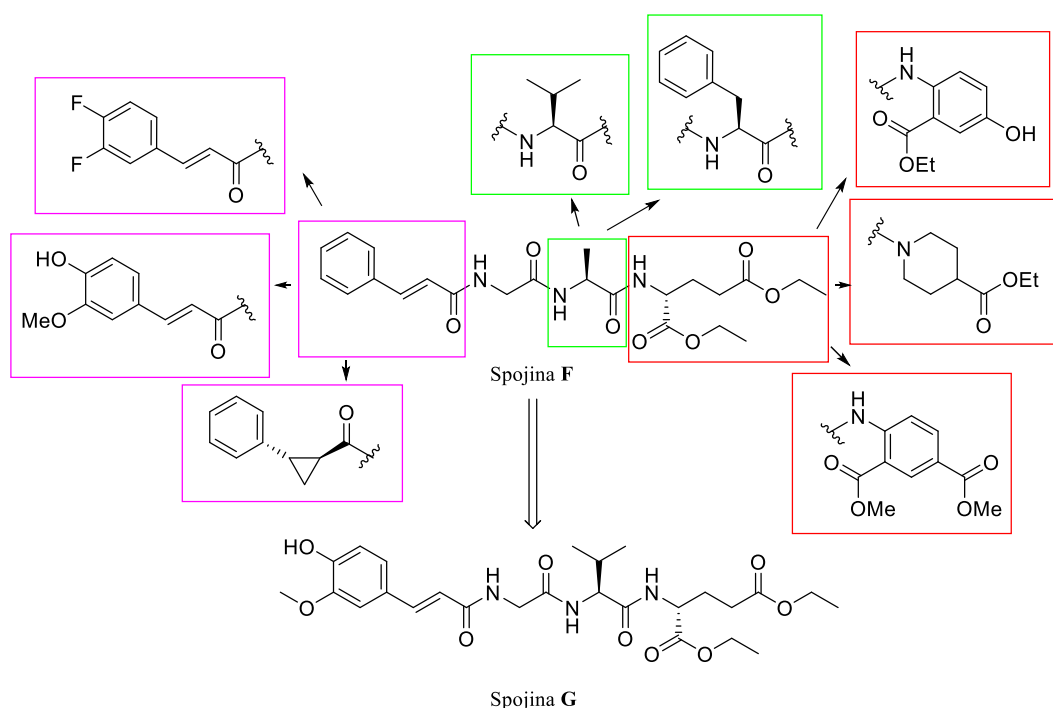
**Slika 9:** Nekatere modifikacije spojine **D**, ki so jih uvajali z namenom optimizacije spojine (prirejeno po (22)).

Spojine so testirali na celični liniji HEK-Blue NOD2, pri čemer so kot referenčno spojino uporabili MDP, ki je imela 11,5-krat večjo sposobnost aktivacije NOD2 kot netretirane celice. Glede na spojino vodnico (5,20-krat večja sposobnost aktivacije NOD2) je imela zelo dobro NOD2 agonistično aktivnost tudi spojina, ki je vsebovala cinamoilni fragment (7,73-krat večja sposobnost aktivacije NOD2). Veliko aktivnost je izkazala tudi spojina s 5-fenilsubstituiranim indolnim fragmentom (10,4-krat večja sposobnost aktivacije NOD2), največjo agonistično aktivnost med vsemi analogi pa je izkazal derivat, v katerem je bil sladkorni del nadomeščen s 6-fenilindolnim fragmentom (11,2-krat večja sposobnost aktivacije NOD2). Iz tega so sklepali, da je orientacija lipofilnih fenil substituentov pomembna pri aktivaciji NOD2. Izmerjene  $EC_{50}$  vrednosti so pokazale, da lahko MDP ( $EC_{50} = 0,046\mu\text{M}$ ) aktivira receptor NOD2 pri veliko nižjih koncentracijah kot spojina s 6-fenilindolnim substituentom ( $EC_{50} = 2,88\mu\text{M}$ ). Iz tega so sklepali, da je sposobnost spojine s 6-fenilindolnim substituentom, da aktivira NOD2, verjetno posledica njenega lažjega prehoda v celico. V dipeptidnem delu so tudi spreminjali dolžino glicinskega distančnika



in ugotovili, da je dolžina pomemben dejavnik, saj pride pri njegovem podaljšanju do zmanjšane aktivnosti. Testirali so še hipotezo, da estri kot predzdravila izboljšajo pasivni transport preko celične stene. Etilna estra na D-Glu delu so zamenjali s prostimi karboksilnimi kislinami, kar je zmanjšalo agonistično aktivnost spojine. Spojine, ki so vsebovale neklasične 1,2,4-oksadiazolne bioizosterne mimetike estrov, pa so bile popolnoma neaktivne. Zelo dobro pa so se namesto etilnih izkazali benzilni estri, saj so veliko bolj lipofilni (22).

Kot najučinkovitejša agonista NOD2 sta se izkazali spojini s cinamoilnim fragmentom (spojina **F**) in spojina s 6-fenilindolnim mimetikom MurNac, zato so ju uporabili v procesu nadaljnje optimizacije (slika 10) (20).



**Slika 10** Nekaterne modifikacije spojine **F**, ki so jih uvajali z namenom optimizacije spojine in do sedaj najuspešnejši sintetiziran dezmuramilpeptid (spojina **G**) (prirejeno po (20)).

Prva modifikacija je bila zamenjava aminokisljine L-Ala z bolj lipofilnimi aminokisljinskimi analogi. Druga skupina modifikacij pa je vključevala optimizacijo mimetika sladkornega dela. Pri tem so se večinoma osredotočili le na cinamoilni fragment, saj je bilo zaželeno, da so analogi sintezno dostopni. Kot mimetik cinamoilnega fragmenta so uporabili *trans*-feruloilni fragment (4-hidroksi-3-metoksicinamoil), ali pa so v cinamoilno strukturo kot bioizosterne zamenjavo za dvojno vez vključili ciklopropan. Modificirali so tudi D-Glu del, ki so ga zamenjali s strukturno rigidnejšimi mimetiki (slika

10). Spojini s 6-fenilindolnim fragmentom sta bili slabša aktivatorja NOD2 kot vsi sintetizirani derivati cinamoila. Zamenjava aminokisljine D-Glu z njenimi rigidiziranimi mimetiki je izničila agonistično aktivnost na NOD2, kar kaže na pomembnost D-Glu dela za vezavo na receptor. Primerjava vrednosti  $EC_{50}$  pri spojinah, ki so kot mimetik sladkorne enote vsebovale *trans*-feruloilni fragment, del L-Ala pa zamenjan z lipofilnimi amino kisljinami, je pokazala, da je bila najučinkovitejša spojina z L-Val ( $EC_{50} = 46$  nM), manj učinkoviti pa sta bili spojini z L-Phe ( $EC_{50} = 121$  nM) in z L-Ala ( $EC_{50} = 2,79$   $\mu$ M). Metilna skupina stranske verige aminokisljine L-Ala namreč nima možnosti tvoriti močnih hidrofobnih vezi z receptorjem, medtem ko benzilna veriga to možnost ima, ampak je verjetno prevelika, kar jo ovira pri vezavi na receptor. Zamenjava cinamoilnega fragmenta spojine ( $EC_{50} = 388$  nM) z bioizosterom, ki je vseboval ciklopropan ( $EC_{50} = 472$  nM) ni vplival na agonistično aktivnost (20).

Ker je bila spojina **G** (slika 10) najobetavnejša, so preverili njeno sposobnost prehajanja celične membrane in odpornost proti hidrolizi s celičnimi encimi. Ugotovili so, da je 40 % spojine **G** vstopilo v celico, vendar je 65 % spojine, ki je prešlo v notranjost celice, hidroliziralo. Te ugotovitve potrjujejo domnevo, da bi lahko bil hidroliziran derivat spojine **G** aktivna učinkovina. Na podlagi kristalne strukture receptorja NOD2 so izdelali model orientacije MDP, spojine **G** in njenega hidroliziranega analoga v vezavnem mestu na receptorju (domena LRR). Ugotovili so, da ima hidroliziran analog spojine **G** podobno orientacijo kot MDP, spojina **G** pa je v vseh pozicijah nestabilna, kar le še dodatno potrjuje pravilnost domneve, da je spojina **G** le predzdravilo. Spojina **G** je tudi znatno povečala izločanje citokinov IL-6, IL-10 in TNF- $\alpha$  ter izkazala dobre lastnosti kot potencialen adjuvans (20). Ker se ja izkazala kot najboljši do sedaj sintetiziran agonist NOD2 iz strukturnega razreda dezmuramilpeptidov smo jo tudi mi uporabili za nadaljnje načrtovanje novih dezmuramilpeptidov.

## 1.5 BIOIZOSTERNE ZAMENJAVE

Bioizosterne zamenjave pogosto uporabljajo pri racionalnem načrtovanju novih učinkovin. Princip bioizosterije temelji na zamenjavi funkcionalnih skupin ali posameznih atomov z drugimi skupinami ali atomi, ki ohranijo biološko aktivnost spojine in imajo podobne lastnosti. Z zamenjavami si želimo izboljšati fizikalno-kemijske, farmakodinamične in farmakokinetične lastnosti spojine (25, 26). Začetki principa bioizosterije segajo v začetek prejšnjega stoletja, ko je Langmuir raziskoval molekule in atome, ki so imeli enako število

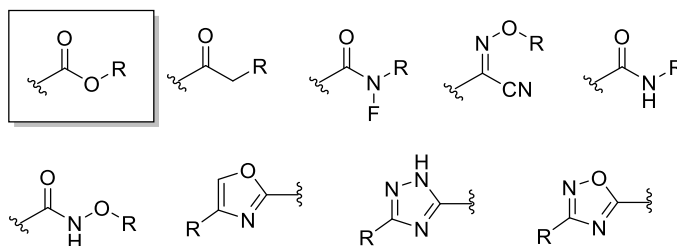
in/ali razporeditev elektronov in tako ustvaril princip izosterije. Grimm je nato uvedel zakon hidridnih zamenjav, ki pravi, da dodatek vodika z parom elektronov k atomu ustvari psevdoatom, ki ima enake fizikalne lastnosti kot atom v sosednji desni skupini v periodnem sistemu (27, 28). Bioizostere delimo v dve skupini. V klasični skupini so funkcionalne skupine ali atomi izoelektronski, v neklasični skupini pa skupine ponavadi nimajo enakega števila atomov, prostorske razporeditve ali enakega števila valenčnih elektronov. Pred kratkim pa so izvedli študije, ki so pokazale, da imajo bioizostere v neklasični skupini podobno povprečno elektronsko gostoto (25).

Pri načrtovanju novih spojin moramo za predvidevanje farmakokinetičnih in farmakodinamičnih lastnosti novih bioizosterov upoštevati:

- ✓ velikost, volumen, razporeditev elektronov, stopnjo hibridizacije, polarizabilnost;
- ✓ stopnjo lipofilnosti in topnosti (pKa, logP);
- ✓ kemijsko reaktivnost funkcionalnih skupin, predvsem za predviden potek biotransformacije in nastanka novih metabolitov;
- ✓ zmožnost tvorbe vodikove vezi (28).

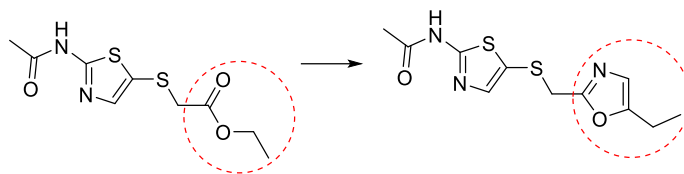
### 1.5.1 Bioizosterne zamenjave estrov

Estri so velikokrat uporabljeni kot predzdravilo, saj lahko z njimi povečamo lipofilnost spojine ter pasiven prehod skozi celično membrano in maskiramo dodatno vodikovo vez karboksilne skupine (29). Ko pa enkrat vstopijo v telo, jih hitro hidrolizirajo esteraze, zato lahko trdimo, da je estrska vez zelo labilna. Med te encime, ki so razporejeni po celem telesu, spadajo karboksilesteraze, acetilholinesteraze, butirilholinesteraze, arilesteraze in druge (29, 30). Velik problem je predvsem predvideti metabolizem, stabilnost in s tem farmakološke učinke estrov (30), zato pri načrtovanju novih učinkovin uporabljamo bioizosterne zamenjave (slika 11), s katerimi si želimo odpraviti te pomanjkljivosti (28).



**Slika 11:** Primeri bioizosternih zamenjav estra (prirejeno po (28, 31, 32)).

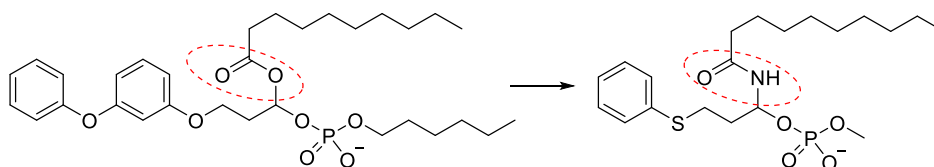
Najpogosteje najdemo v literaturi zamenjavo estra s heteroarili, nekласičnimi bioizosteri estra. Uporaba cikličnih fragmentov namesto acikličnih je pogost pristop, ki omogoča rigidizacijo strukture. Raziskovalci so na primer uspešno zamenjali etilni ester z oksazolom pri načrtovanju protitumorih učinkovin, zaviralcev CDK2 (slika 12) (31).



**Slika 12:** Primer uspešne zamenjave estra z oksazolom pri načrtovanju zaviralcev CDK2 (prirejeno po (31)).

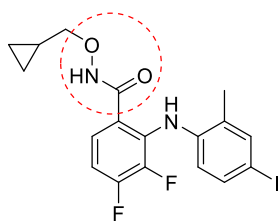
Pri raziskavah so se kot uspešni nadomestki izkazali tudi tiazoli, tiadiazoli in drugi heteroarili (31). Bromidge in sodelavci pa so uporabili ne-aromske zamenjave, in sicer so najprej metil ester zamenjali s ketoksim etrom, nato pa so uporabili klasično bioizosterno zamenjavo ( $\text{CH}_3$  so zamenjali za  $\text{CN}$ ) in tako dobili optimizirano spojino (28).

Kot klasično zamenjavo za ester lahko uporabimo amid, kar smo storili tudi mi. Amidi se v telesu hidrolizirajo veliko počasneje kot estri in zaradi tega predstavljajo stabilnejšo alternativo. Poleg tega imajo podobno velikost in prostorsko razporeditev, kar pripomore k vezavi na receptor (27). V literaturi najdemo primer, kjer je pri sintezi zaviralcev fosfolipaze 2 zamenjava estra z amidom omogočila 22-krat večjo biološko razpoložljivost (slika 13) (33).



**Slika 13:** Uspešen primer zamenjave estra z amidom pri načrtovanju zaviralcev fosfolipaze 2 (prirejeno po (33)).

Kot drugi pristop smo uporabili nekласične bioizostere estra, hidroksamate. Slaba stran hidroksamatov je v tem, da lahko v telesu prav tako hitro hidrolizirajo. Poleg tega se lahko hidroksamska kislina metabolizira preko sulfatiranja in glukuronidacije, kar vodi do nastanka toksičnih metabolnih produktov. Stabilnost lahko izboljšamo z uvajanjem večjega substituenta na hidroksamat. Hidroksamat so uporabili kot bioizosterno zamenjavo za karboksilno kislino pri načrtovanju zaviralcev MAP/ERK kinaze (slika 14) in pripravili analoge, ki izkazujejo ugodne profile aktivnosti in biokemične lastnosti (34).



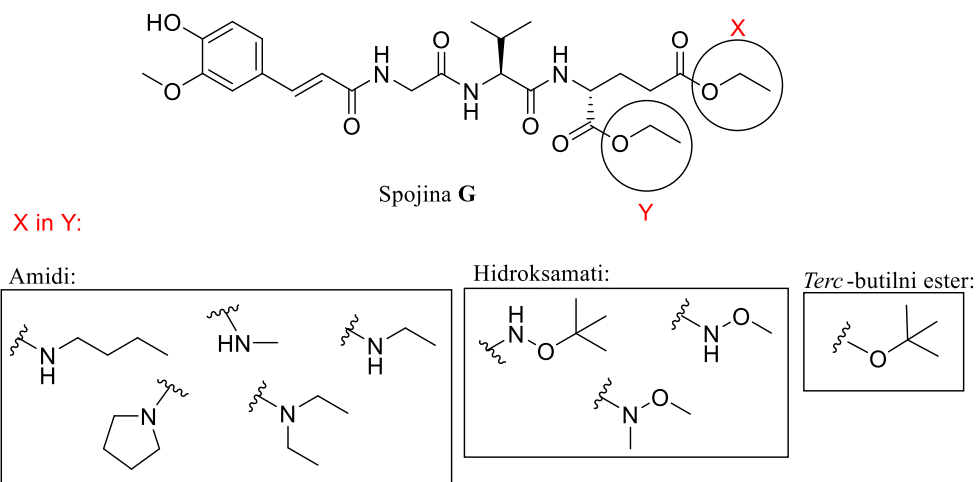
**Slika 14:** Uspešen primer zamenjave karboksilne kisline s hidroksamatom (prirejeno po (34)).

Za zmanjšanje labilnosti estrske vezi pa lahko uporabimo tudi pristop sterične ovire. Če kot alkoholno komponento uporabimo razvejan alkohol, ki zavzame večji volumen, na ta način esterazam otežimo pristop do same molekule. Mi smo kot sterično oviro uporabili *tert*-butilni ester, ki zaradi svoje velikosti deluje kot ščit pred esterazami in otežuje njegov razpad do karboksilne kisline.

## 2 NAMEN DELA

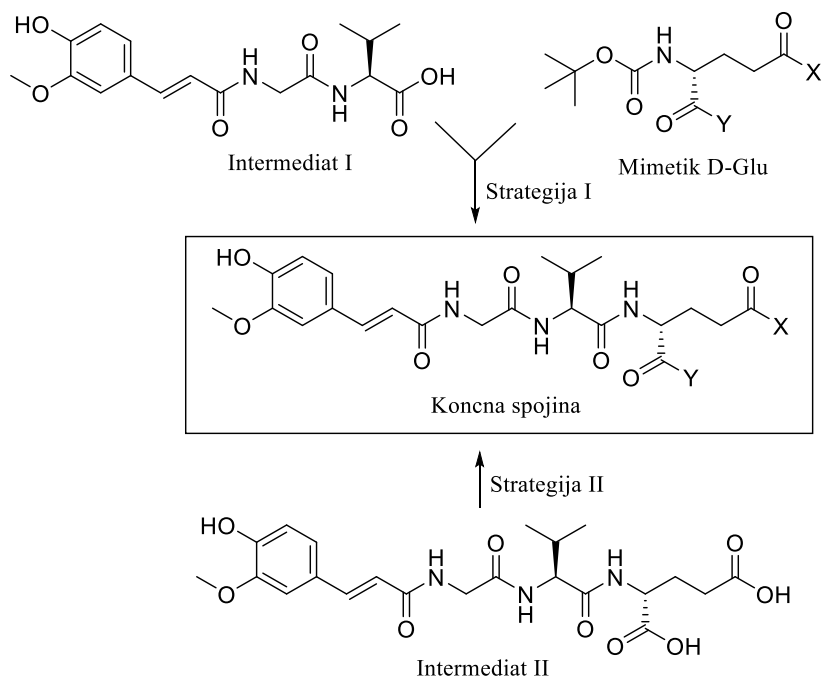
V sklopu magistrske naloge bomo načrtovali in sintetizirali nove analoge spojine vodnice dietil ((*E*)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil-D-glutamata (spojine **G**), ki deluje kot agonist receptorja NOD2 ( $EC_{50} = 46 \text{ nM}$ ). Pri tem bomo etilne estre zamenjali z ustreznimi metabolno stabilnejšimi bioizosternimi zamenjavami, medtem ko bomo preostali del spojine ohranili. Nove sintetizirane dezmuramilpeptide bomo fizikalno-kemijsko in spektroskopsko ovrednotiti ter dali testirati njihovo agonistično delovanje na NOD2 receptorje.

V strukturo spojine **G** bomo uvedli tri različne skupine bioizosternih zamenjav: amide, hidroksamate in *terc*-butilni ester. Zamenjavi na  $\alpha$ - ali  $\gamma$ - karboksilnem estru bosta bodisi enaki ( $X = Y$ ) ali različni ( $X \neq Y$ ) (slika 15).



**Slika 15:** Spojina vodnica in bioizosterne zamenjave etilnih estrov.

Uporabili bomo dve strategiji priprave končnih spojin (slika 16). Pri prvi bomo najprej pripravili ključni intermediat I (spojina **5**), nato pa bomo iz Boc-D-Glu pripravili številne mimetike D-Glu. Te bomo spojili z intermediatom I in dobili končne spojine. Pri drugi strategiji bomo najprej pripravili intermediat II (spojina **28**), ki je že tripeptid. Na njegovih karboksilnih kislinah pa bomo nato uvajali bioizosterne zamenjave.



**Slika 16:** Priprava končnih spojin s strategijo I in strategijo II.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 MATERIALI

#### 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 ( $\lambda = 254 \text{ nm}/366 \text{ nm}$ )

#### Poimenovanje in risanje spojin

Za poimenovanje in risanje spojin smo uporabili računalniški program ChemDraw Professional 16.0 proizvajalca Cambridge Soft.

### 3.2 METODE

#### 3.2.1 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 ( $\lambda = 254 \text{ nm}$  in/ali  $366 \text{ nm}$ ), 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 ( $4,6 \times 150$  mm, 5  $\mu$ m delci) ob uporabi predkolone in pri pretoku 1 mL/min. Kot eluent smo izbrali zmes acetonitrila in 0,1% raztopine trifluoroocetne kisline v vodi, pri čemer smo spreminjali gradient: med 1. in 30. minuto s 30 % na 80 % acetonitrila ter med 30. in 35. minuto z 80 % na 90 % acetonitrila.

### **3.2.2 Spektroskopske metode**

#### **Jedrska magnetna resonanca (NMR)**

<sup>1</sup>H NMR spektri so bili posneti pri 400 MHz na spektrometru Bruker Avance DPX400 na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani. <sup>13</sup>C NMR spektri so bili posneti pri 100 MHz na spektrometru Bruker Avance DPX400 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 so bili posneti z ESI tehniko na masnem spektrometru AutoSpec Q (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.

### **3.2.3 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.

### **3.2.4 Optična sučnost**

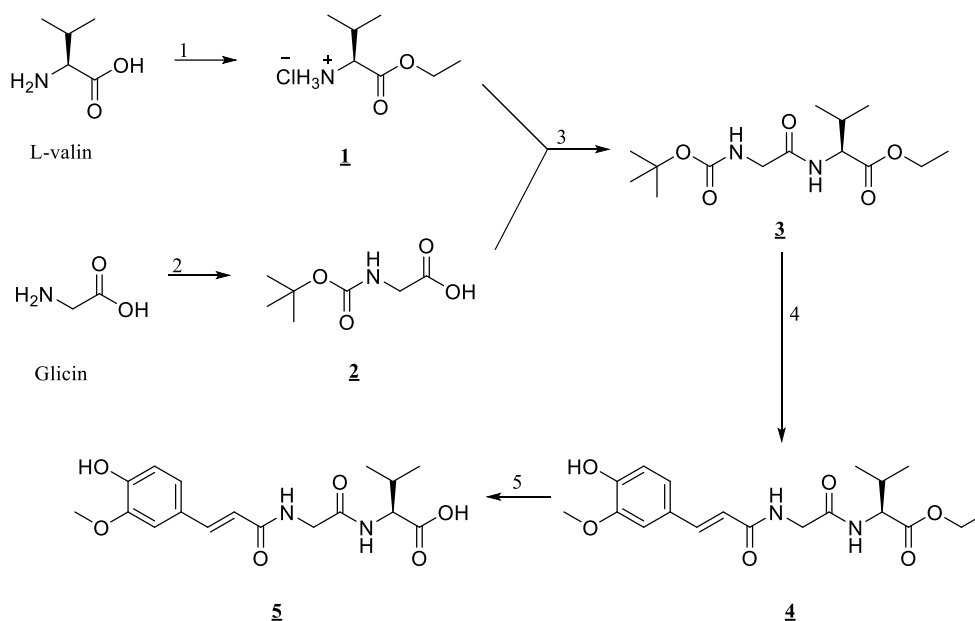
Optično sučnost spojin smo izmerili s polarimetrom Perkin-Elmer 241 MC pri valovni dolžini 589 nm v kiveti dolžine 1 dm na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani.

### **3.2.5 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 oziroma 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 EKSPERIMENTALNO DELO

### 4.1 REAKCIJSKA SHEMA 1



1:  $\text{SOCl}_2$ , EtOH, 80 °C

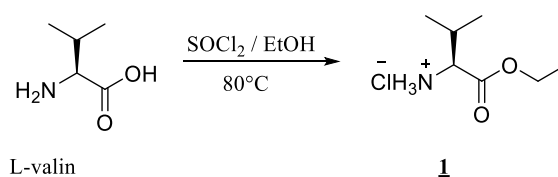
2: Boc-anhidrid, NaOH, dioksan, voda

3: DCC/HOBt, trietilamin, etilacetat

4: a) TFA/diklorometan (1:4) b) *trans*-ferulična kislina, trietilamin, EDC $\times$ HCl, HOBt, DMAP, DMF

5: 1M LiOH, THF

#### 4.1.1 Sinteza (*S*)-1-etoksi-3-metil-1-oksobutan-2-aminijevega klorida (1)



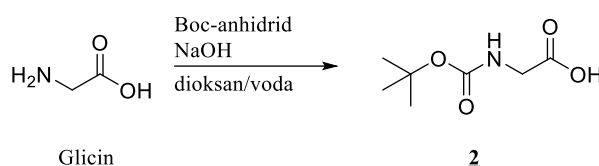
V bučko smo natehtali 6,000 g L-valina (51,22 mmol), ga raztopili v 40 mL absolutnega etanola in ohladili na ledeni kopeli na 0 °C. Počasi in ob mešanju smo po kapljicah dodali 4,084 mL tionil klorida (56,34 mmol, 1,1 ekv.). Nato smo ledeno kopel odstranili in bučko postavili na oljno kopel. Opremili smo jo z vodnim hladilnikom in reakcijsko zmes ob mešanju refluktirali pri 80 °C za 24 ur. Po končani reakciji smo topilo odpareli pod

znižanim tlakom. Suh preostanek smo prelili z dietil etrom in bučko čez noč pustili v hladilniku. Izpadli produkt smo odfiltrirali, posušili v sušilniku in dobili 9,064 g spojine 1.

Spojina <u>1</u>	(S)-1-etoksi-3-metil-1-oksobutan-2-aminijev klorid
Mr (izračunana)	181,66 g/mol
Elementna sestava	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> ClNO <sub>2</sub>
Izkoristek reakcije	97,41 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,60 (orositveni reagent: ninhidrin)
T <sub>tališča</sub>	102 - 104 °C
Izgled	bela amorfna snov

Referenca za spojino 1: (35)

#### 4.1.2 Sinteza (*tert*-butoksikarbonil)-glicina (2)

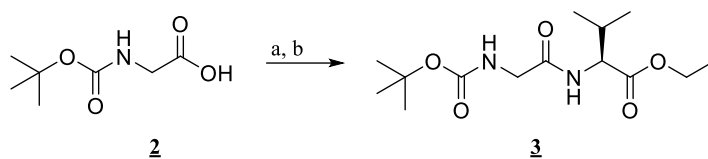


2,252 g (30,00 mmol) glicina smo raztopili v 45 mL 1M NaOH (45,00 mmol, 1,5 ekv.) in 10 mL destilirane vode ter raztopino ohladili na ledeni kopeli na 0 °C. V reakcijsko zmes smo nato po kapljicah dodajali raztopino Boc-anhidrida (8,519 g, 39,00 mmol, 1,3 ekv.) v dioksanu (30 mL). Odstranili smo ledeno kopel in reakcijsko zmes pustili mešati 24 ur pri sobni temperaturi. Nato smo dioksan odpareli pod znižanim tlakom, zaostalo vodno fazo pa ekstrahirali s 30 mL dietil etra. Organsko in vodno fazo smo ločili in vodno fazo nakisali do pH = 2-3 z 1M HCl. Kislo vodno fazo smo ekstrahirali z etilacetatom (3 × 50 mL). Dobljene etilacetatne organske faze smo združili, jih posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, prefiltrirali ter odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 3,547g spojine 2.

Spojina <u>2</u>	( <i>tert</i> -butoksikarbonil)-glicin
Mr (izračunana)	175,18
Elementna sestava	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>4</sub>
Izkoristek reakcije	67,50 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,82 (orositveni reagent: ninhidrin)
T <sub>tališča</sub>	87-88 °C
Izgled	bela amorfna snov

Referenca za spojino 2: (36)

### 4.1.3 Sinteza etil (*tert*-butoksikarbonil)-glicil-L-valinata (**3**)



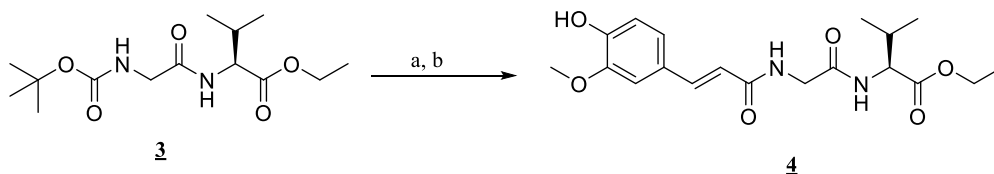
- a) DCC/HOBt, etilacetat  
b) spojina **1**, trietilamin

2,803 g spojine **2** (16,00 mmol) smo raztopili v 80 mL etilacetata in v raztopino dodali 2,162 g HOBt (16,00 mmol, 1,0 ekv.). Reakcijsko zmes smo na ledeni kopeli ohladili na 0 °C, ji dodali 3,628 g DCC (17,60 mmol, 1,1 ekv.) in jo pustili mešati 30 minut. Nato smo dodali še 2,906 g spojine **1** (16,00 mmol, 1,0 ekv.) in 6,681 mL trietilamina (48,00 mmol, 3,0 ekv.), odstranili ledeno kopel ter pustili mešati za 70 ur pri sobni temperaturi. Reakcijsko zmes smo nato prelili s 60 mL heksana in jo za 1 uro postavili v hladilnik. Nastalo oborino smo odfiltrirali in jo sprali z etilacetatom (2 × 10 mL). Združene organske faze smo nato spirali z 1M HCl (2 × 120 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (3 × 100 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 120 mL). Organsko fazo smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo prefiltrirali in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Dobili smo 3,204 g spojine **3**.

Spojina <b>3</b>	etil ( <i>tert</i> -butoksikarbonil)-glicil-L-valinat
Mr (izračunana)	302,37
Elementna sestava	C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Izkoristek reakcije	66,23 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,66 (orositveni reagent: ninhidrin)
Izgled	bela amorfna snov

Referenca za spojino **3**: (37)

### 4.1.4 Sinteza etil (*E*)-(3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)-glicil-L-valinata (**4**)

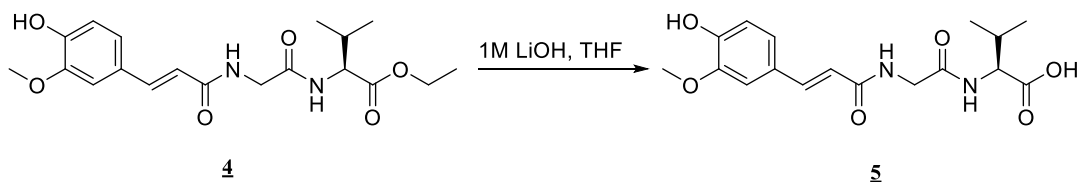


- a) TFA/diklorometan (1:4)  
b) *trans*-ferulična kislina, EDC×HCl, HOBt, trietilamin, DMAP, DMF

Spojino **3** (3,204 g, 10,60 mmol) smo raztopili v 20 mL DKM in jo na ledeni kopeli ohladili na 0 °C. Nato smo po kapljicah dodali 6 mL TFA, ledeno kopel odstranili in pustili mešati 24 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo topilo odpareli pod znižanim tlakom, suh preostanek dvakrat prelili z dietil etrom in eter odpareli pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo raztopili v 15 mL DMF in ga ohladili na ledeni kopeli. Potem smo dodali: 7,377 mL trietilamina (53,00 mmol, 5,0 ekv.), 2,085 g *trans*-ferulične kisline (10,60 mmol, 1,0 ekv.), 2,230 g EDC×HCl (11,66 mmol, 1,1 ekv), 1,575 g HOBt (11,66 mmol, 1,1 ekv.) in katalitično količino DMAP. Po dodatku vseh reagentov smo ledeno kopel odstranili in pustili mešati 72 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo reakcijski zmesi dodali 150 mL etilacetata, in jo spirali z 1M HCl (3 × 100 mL), destilirano vodo (2 × 100 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 100 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 100 mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo prefiltrirali in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Dobili smo 3,265 g spojine **4**.

Spojina <b>4</b>	etil ( <i>E</i> )-(3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)-glicil-L-valinat
Mr (izračunana)	378,43
Elementna sestava	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>
Izkoristek reakcije	81,40 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,34 (orositveni reagent: ninhidrin)
Optična sučnost	[α] <sub>D, 23</sub> = -10,0° (c = 0,16, MeOH)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ[ppm]= 0.87 – 0.90 (m, 6H, 2 × CH <sub>3</sub> -Val), 1.15 – 1.21 (m, 3H, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 2.03 – 2.11 (m, 1H, CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 3.80 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 3.89 – 4.19 (m, 5H, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , CH-α-Val, NHCH <sub>2</sub> ), 6.57 (d, 1H, J = 16.0 Hz, CH=CHCO), 6.79 (d, 1H, J = 8.0 Hz, 1 × H-Ar), 7.00 (dd, 1H, J = 8.0 Hz, J = 1.6 Hz, 1 × H-Ar), 7.14 (d, 1H, J = 2.0 Hz, 1 × H-Ar), 7.33 (d, 1H, J = 15.6 Hz, CH=CHCO), 8.13 (t, 1H, J = 5.8 Hz, NHCH <sub>2</sub> ), 8.20 (d, 1H, J = 8,0 Hz, NH), 9.45 (s, 1H, OH)
MS (ESI)	m/z: 377,2 (M-H) <sup>-</sup>
Izgled	rjavo viskozno olje

#### 4.1.5 Sinteza (*E*)-(3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)-glicil-L-valina (**5**)

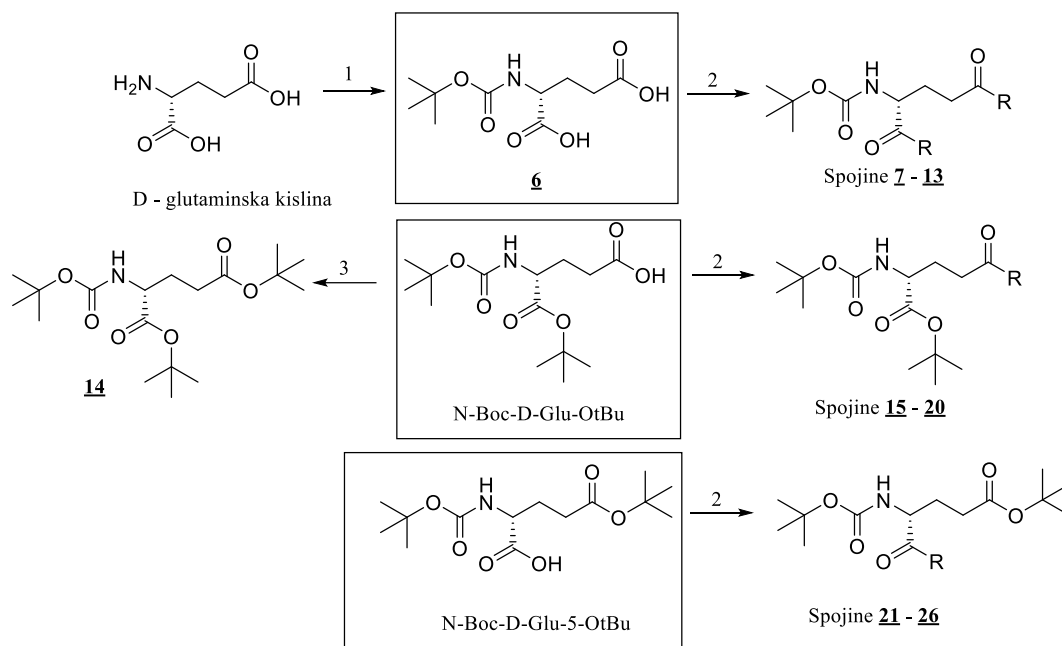


Spojino **4** (3,265 g, 8,63 mmol) smo raztopili v 40 mL THF, dodali 43,15 mL 1M LiOH (43,15 mmol, 5 ekv.) in reakcijsko zmes pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 20 urah

smo odpareli topilo pod znižanim tlakom, preostanek pa nakisali do pH = 2-3 s 3M HCl. Oborino smo odfiltrirali, kislo vodno fazo pa ekstrahirali s 3 × 80 mL etilacetata. Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo filtrirali in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Dobili smo 2,959 g spojine **5**.

Spojina <b>5</b>	( <i>E</i> )-(3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)-glicil-L-valin
Mr (izračunana)	350,37
Elementna sestava	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>
Izkoristek reakcije	97,85 %
Rf (DKM/MeOH 9:1) + 1 kapljica CH <sub>3</sub> COOH	0,36 (orositveni reagent: ninhidrin)
Optična sučnost	[α] <sub>D, 23</sub> = +0,4° (c = 0,45, MeOH)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ[ppm]= 0.92 (d, 3H, <i>J</i> = 6.8 Hz, CH <sub>3</sub> -Val), 0.96 (d, 3H, <i>J</i> = 6.8 Hz, CH <sub>3</sub> -Val), 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> ), 4.53 – 4.56 (m, 1H, CH-α), 5.84 (br s, 1H, OH), 6.32 (d, 1H, <i>J</i> = 15.6 Hz, CH=CHCO), 6.39 (t, 1H, <i>J</i> = 4.8 Hz, NH), 6.60 (d, 1H, <i>J</i> = 8.8 Hz, H-Ar), 7.01 (d, 1H, <i>J</i> = 1.6 Hz, H-Ar), 7.06 (dd, 1H, <i>J</i> = 8.8 Hz, <i>J</i> = 1.6 Hz, H-Ar), 7.58 (d, 1H, <i>J</i> = 15.6 Hz, CH=CHCO)
MS (ESI)	m/z: 351,2 (M+H) <sup>+</sup>
HR-MS	351,1557 (izračunana: 351,1556) za C <sub>17</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>
Izgled	rjava viskozna snov

## 4.2 REAKCIJSKA SHEMA 2

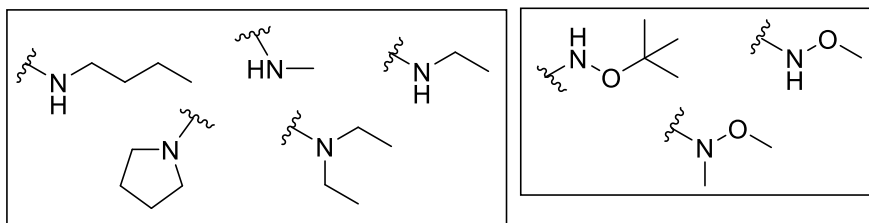


1: Boc-anhidrid, NaOH, dioksan, voda

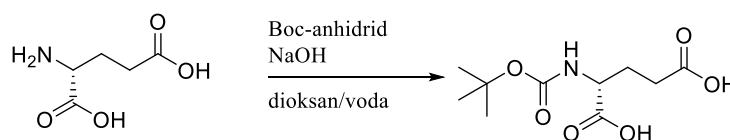
2: a) EDC×HCl, HOBT, DMF b) R-H, trietilamin, DMAP

3: *tert*-butil 2,2,2-trikloroacetamidat, BF<sub>3</sub> × Et<sub>2</sub>O, DKM, cikloheksan

R:



### 4.2.1 Sinteza (*tert*-butoksidkarbonil)-D-glutaminske kisline (**6**)



D - glutaminska kislina

**6**

5,885 g D-glutaminske kisline (40 mmol) smo natehtali v 250 mL bučko. Raztopili smo jo v 85 mL 1M NaOH (85 mmol, 2,0 ekv.) in 10 mL destilirane vode ter raztopino na ledeni kopeli ohladili na 0 °C. Nato smo po kapljicah dodali 11,349 g Boc-anhidrida (52 mmol,

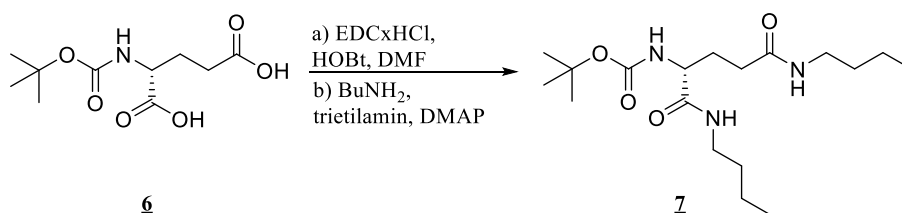


1,3 ekv.), predhodno raztopljenega v 30 mL dioksana. Ledeno kopel smo odstranili in reakcijsko zmes 22 ur pustili mešati pri sobni temperaturi. Sledila je izolacija produkta: dioksan smo odpareli pod znižanim tlakom, preostalo vodno fazo pa ekstrahirali s 30 mL dietil etra. Vodno fazo smo nato nakisali do pH=2-3 z 1M HCl in jo ekstrahirali s 3 × 50 mL etilacetata. Združene etilacetatne organske faze smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jih filtrirali in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Dobili smo 6,734 g spojine **6**.

Spojina <b>6</b>	<i>tert</i> -butoksikarbonil)-D-glutaminska kislina
Mr (izračunana)	247,25
Elementna sestava	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>6</sub>
Izkoristek reakcije	68,09 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,30 (orositveni reagent: ninhidrin)
Izgled	belkasta amorfna snov

Referenca za spojino **6**: (38)

#### 4.2.2 Sinteza *tert*-butil (*R*)-(1,5-bis(butilamino)-1,5-dioksopentan-2il)karbamata (**7**)

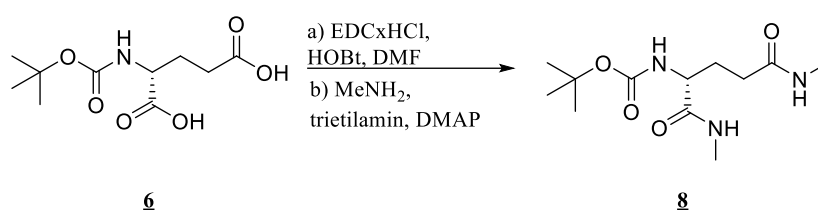


Spojino **6** (0,247 g, 1,0 mmol) smo raztopili v 5 mL DMF, raztopini dodali 0,478 g EDC×HCl (2,5 mmol, 2,5 ekv.) in 0,338 g HOBt (2,5 mmol, 2,5 ekv.) ter pustili mešati 30 minut pri sobni temperaturi. Nato smo dodali 295 μL butilamina (3,0 mmol, 3,0 ekv.), 557 μL trietilamina (4,0 mmol, 4,0 ekv.) in katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 24 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo zmesi dodali 70 mL etilacetata. Nastala je oborina, ki smo jo odfiltrirali, matičnico pa spirali z 1M HCl (3 × 20 mL), destilirano vodo (1 × 20 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 20 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 20 mL). Organsko fazo smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 0,356 g spojine **7**.

Spojina <b>7</b>	<i>tert</i> -butil ( <i>R</i> )-(1,5-bis(butilamino)-1,5-dioksopentan-2il)karbamata
Mr (izračunana)	357,50
Elementna sestava	C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
Izkoristek reakcije	99,44 %
Rf (DKM/MeOH 9:1 + kapljica CH <sub>3</sub> COOH)	0,64 (orositveni reagent: ninhidrin)
Optična sučnost	[α] <sub>D, 23</sub> = +8,9° (c = 0,47, MeOH)

1H-NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ[ppm]= 0.85 – 0.88 (m, 6H, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2 × CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.24 – 1.31 (m, 4H, 2 × CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.32 – 1.41 (m, 13H, Boc, 2 × CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.62 – 1.72 (m, 1H, CH <sub>2A</sub> -β-Glu), 1.76 – 1.85 (m, 1H, CH <sub>2B</sub> -β-Glu), 2.04 – 2.09 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -γ-Glu), 2.99 – 3.11 (m, 4H, 2 × CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 3.80 – 3.85 (m, 1H, CH-α-Glu), 6.79 (d, 1H, <i>J</i> = 8.0 Hz, Boc-NH), 7.72 – 7.77 (m, 2H, 2 × NH)
MS (ESI)	m/z: 358,3 (M+H) <sup>+</sup>
HR-MS	358,2699 (izračunana: 358,2706) za C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
Izgled	rumeno-oranžna amorfná snov

#### 4.2.3 Sinteza *tert*-butil (*R*)-(1,5-bis(metilamino)-1,5-dioksopentan-2-il)karbamata (**8**)

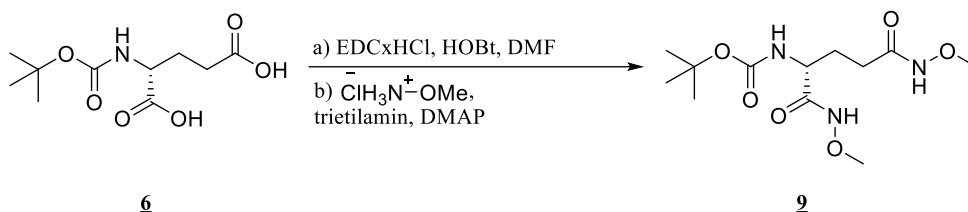


Spojino **6** (0,247 g, 1,0 mmol) smo raztopili v 5 mL DMF, raztopini dodali 0,478 g EDC×HCl (2,5 mmol, 2,5 ekv.) in 0,338 g HOBt (2,5 mmol, 2,5 ekv.) ter pustili mešati 30 minut pri sobni temperaturi. Nato smo dodali 374 μL metilamina (3,00 mmol, 3,0 ekv.), 557 μL trietilamina (4,0 mmol, 4,0 ekv.) in katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 24 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo zmesi dodali 70 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (4 × 20 mL), destilirano vodo (1 × 20 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 20 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 20 mL). Organsko fazo smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Po izolaciji smo dobili 0,042 g spojine **8**. Na TLC-ju smo zaznali, da se je veliko spojine izgubilo v kisli vodni fazi, zato smo reakcijo ponovili in modificirali izolacijo spojine. Organsko fazo smo tokrat spirali le z 1M HCl (1 × 20 mL), destilirano vodo (1 × 20 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 20 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 20 mL). Ko smo organsko fazo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom, smo dobili 0,101 g spojine **8**.

Spojina <b>8</b>	<i>tert</i> -butil ( <i>R</i> )-(1,5-bis(metilamino)-1,5-dioksopentan-2-il)karbamata
Mr (izračunana)	273,33
Elementna sestava	C <sub>12</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
Izkoristek reakcije	1. ponovitev: 15,38 %, 2. ponovitev: 37,00 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,40 (orositveni reagent: ninhidrin)
1H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ[ppm]= 1.41 (s, 9H, Boc), 1.75 – 1.84 (m, 1H, CH <sub>2A</sub> -β-Glu), 1.93 – 2.06 (m, 1H, CH <sub>2B</sub> -β-Glu), 2.20 (t, 2H, <i>J</i> = 7.2 Hz, CH <sub>2</sub> -

	$\gamma$ -Glu), 2.66 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{NH}$ ), 2.69 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{NH}$ ), 3.92 – 3.96 (m, 1H, $\text{CH-}\alpha$ -Glu)
MS (ESI)	m/z: 296,2 (M+Na) <sup>+</sup>
HR-MS	274,1768 (izračunano: 274,1767) za $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_4$
Izgled	rumeno-oranžna amorfna snov

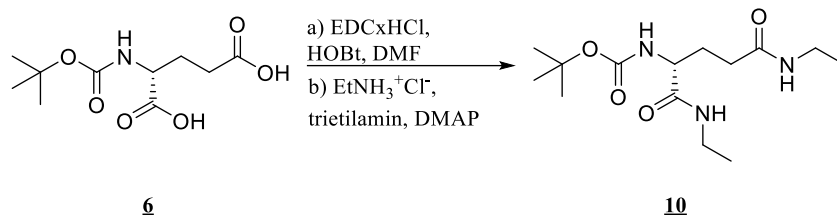
#### 4.2.4 Sinteza *tert*-butil (*R*)-(1,5-bis(metoksiamino)-1,5-dioksopentan-2-il)karbamata (**9**)



Spojino **6** (0,247 g, 1,0 mmol) smo raztopili v 5 mL DMF, raztopini dodali 0,478 g EDC×HCl (2,5 mmol, 2,5 ekv.) in 0,338 g HOBT (2,5 mmol, 2,5 ekv.) ter pustili mešati 30 minut pri sobni temperaturi. Nato smo dodali 0,251 g metoksiaminijevega klorida (3,0 mmol, 3,0 ekv.), 557  $\mu\text{L}$  trietilamina (4,0 mmol, 4,0 ekv.) in katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 24 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo zmesi dodali 70 ml etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (1 × 20 mL), destilirano vodo (1 × 20 mL), nasičeno raztopino  $\text{NaHCO}_3$  (2 × 20 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 20 mL). Organsko fazo smo posušili z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , jo filtrirali in odpareli topilo pod nižanim tlakom. Dobili smo 0,084 g spojine **9**.

Spojina <b>9</b>	<i>tert</i> -butil ( <i>R</i> )-(1,5-bis(metoksiamino)-1,5-dioksopentan-2-il)karbamata
Mr (izračunana)	305,33
Elementna sestava	$\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_6$
Izkoristek reakcije	27,54 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,40 (orositveni reagent: ninhidrin)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, MeOD)	$\delta$ [ppm]= 1.37 (s, 9H, Boc), 1.78 – 1.86 (m, 1H, $\text{CH}_{2\text{A}}\text{-}\beta$ -Glu), 1.95 – 2.15 (m, 3H, $\text{CH}_{2\text{B}}\text{-}\beta$ -Glu, $\text{CH}_2\text{-}\gamma$ -Glu), 3.59 (s, 3H, $\text{OCH}_3$ ), 3.61 (s, 3H, $\text{OCH}_3$ ), 4.00 – 4.09 (m, 1H, $\text{CH-}\alpha$ -Glu)
MS (ESI)	m/z: 328,2 (M+Na) <sup>+</sup>
HR-MS	328,1491 (izračunano: 328,1485) za $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_6\text{Na}$
Izgled	rumeno viskozno olje

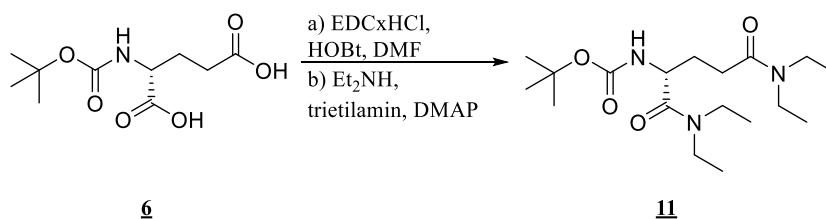
#### 4.2.5 Sinteza *tert*-butil (*R*)-(1,5-bis(etilamino)-1,5-dioksopentan-2-il)karbamata (**10**)



Spojino **6** (0,432 g, 1,75 mmol) smo raztopili v 5 mL DMF, raztopini dodali 0,837 g EDC×HCl (4,375 mmol, 2,5 ekv.) in 0,591 g HOBT (4,375 mmol, 2,5 ekv.) ter pustili mešati 30 minut pri sobni temperaturi. Nato smo dodali 0,428 g etilamonijevega klorida (5,25 mmol, 3,0 ekv.), 975  $\mu\text{L}$  trietilamina (7,00 mmol, 4,0 ekv.) in katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 24 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo zmesi dodali 70 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3 × 20 mL), destilirano vodo (1 × 20 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 20 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 20 mL). Organsko fazo smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 0,108 g spojine **10**.

Spojina <b>10</b>	<i>tert</i> -butil ( <i>R</i> )-(1,5-bis(etilamino)-1,5-dioksopentan-2-il)karbamata
Mr (izračunana)	301,39
Elementna sestava	C <sub>14</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
Izkoristek reakcije	20,49 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,60 (orositveni reagent: ninhidrin)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	$\delta$ [ppm]= 0.96 – 1.01 (m, 6H, 2 × CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.38 (s, 9H, Boc), 1.61 – 1.72 (m, 1H, CH <sub>2A</sub> -β-Glu), 1.75 – 1.84 (m, 1H, CH <sub>2B</sub> -β-Glu), 2.02 – 2.07 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -γ-Glu), 3.00 – 3.11 (m, 4H, 2 × CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 3.78 – 3.84 (m, 1H, CH-α-Glu), 6.77 (d, 1H, <i>J</i> = 8.0 Hz, Boc-NH), 7.77 – 7.79 (m, 2H, 2 × NH)
Izgled	bela amorfna snov

#### 4.2.6 Sinteza *tert*-butil (*R*)-(1,5-bis(dietilamino)-1,5-dioksopentan-2-il)karbamata (**11**)

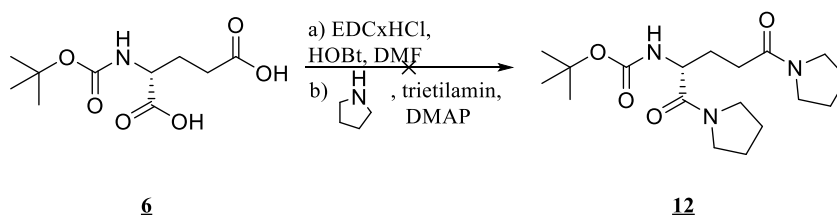


Spojino **6** (0,124 g, 0,50 mmol) smo raztopili v 1 mL DMF, raztopini dodali 0,234 g EDC×HCl (1,25 mmol, 2,5 ekv.) in 0,169 g (HOBT 1,25 mmol, 2,5 ekv.) ter pustili mešati

30 minut pri sobni temperaturi. Nato smo dodali 155  $\mu\text{L}$  dietilamina (1,50 mmol, 3,0 ekv.), 287  $\mu\text{L}$  trietilamina (2,00 mmol, 4,0 ekv.) in katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 72 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo zmesi dodali 40 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl ( $3 \times 15$  mL), destilirano vodo ( $1 \times 15$  mL), nasičeno raztopino  $\text{NaHCO}_3$  ( $2 \times 15$  mL) in nasičeno raztopino NaCl ( $1 \times 15$  mL). Organsko fazo smo posušili z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , jo filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 0,126 g spojine **11**.

Spojina <b>11</b>	<i>tert</i> -butil ( <i>R</i> )-(1,5-bis(dietilamino)-1,5-diokso-1,5-pentan-2-il)karbammat
Mr (izračunana)	357,50
Elementna sestava	$\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_4$
Izkoristek reakcije	70,39 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,80 (orositveni reagent: ninhidrin)
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ )	$\delta$ [ppm]= 0.98 – 1.15 (m, 12H, $4 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.35 (s, 9H, Boc), 1.56 – 1.65 (m, 1H, $\text{CH}_{2\text{A}}\text{-}\beta\text{-Glu}$ ), 1.73 – 1.84 (m, 1H, $\text{CH}_{2\text{B}}\text{-}\beta\text{-Glu}$ ), 2.19 – 2.26 (m, 1H, $\text{CH}_{2\text{A}}\text{-}\gamma\text{-Glu}$ ), 2.32 – 2.42 (m, 1H, $\text{CH}_{2\text{B}}\text{-}\gamma\text{-Glu}$ ), 3.01 – 3.10 in 3.19 – 3.33 in 3.53 – 3.61 (3m, 8H, $4 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 4.26 – 4.32 (m, 1H, $\text{CH}\text{-}\alpha\text{-Glu}$ ), 6.85 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, Boc-NH)
MS (ESI)	$m/z$ : 358,3 ( $\text{M}+\text{H}$ ) <sup>+</sup>
HR-MS	358,2696 (izračunana: 358,2706) za $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_4$
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ )	$\delta$ [ppm]= 12.85, 13.03, 14.03, 14.27, 27.29, 27.82, 28.13, 40.75, 41.20, 49.55, 77.90, 155.37, 170.40, 171.16
Izgled	svetlo rumeno viskozno olje

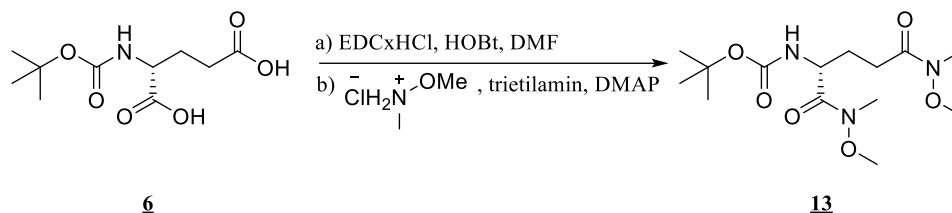
#### 4.2.7 Poskus sinteze *tert*-butil (*R*)-(1,5-diokso-1,5-di(pirolidin-1-il)pentan-2-il)karbamata (**12**)



Spojino **6** (0,124 g, 0,50 mmol) smo raztopili v 1 mL DMF, raztopini dodali 0,239 g EDC $\times$ HCl (1,25 mmol, 2,5 ekv.) in 0,169 g HOBT (1,25 mmol, 2,5 ekv.) ter pustili mešati 30 minut pri sobni temperaturi. Nato smo dodali 123  $\mu\text{L}$  pirolidina (1,50 mmol, 3,0 ekv.), 287  $\mu\text{L}$  trietilamina (2,00 mmol, 4,0 ekv.) in katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 72 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo zmesi dodali 40 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl ( $3 \times 15$  mL), destilirano vodo ( $1 \times 15$  mL), nasičeno raztopino  $\text{NaHCO}_3$  ( $2 \times 15$  mL) in nasičeno raztopino NaCl ( $1 \times 15$  mL).

Organsko fazo smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Reakcijo smo ponovili dvakrat, a produkt ni nastal v nobenem primeru.

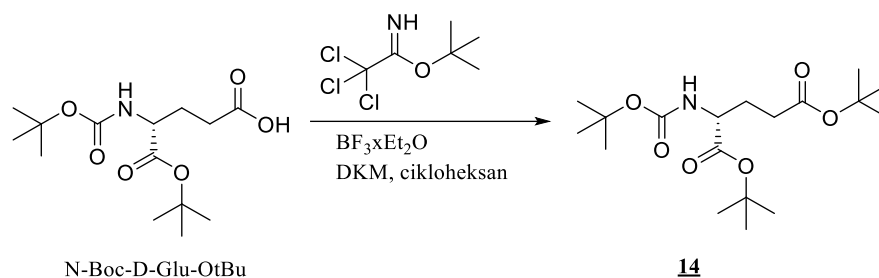
#### 4.2.8 Sinteza *tert*-butil (*R*)-(1,5-bis(*N*-metoksi-*N*-metilamino)-1,5-dioksopentan-2-il)karbamata (**13**)



Spojino **6** (0,124 g, 0,50 mmol) smo raztopili v 1 mL DMF, raztopini dodali 0,239 g EDC×HCl (1,25 mmol, 2,5 ekv.) in 0,169 g HOBt (1,25 mmol, 2,5 ekv.) ter pustili mešati 30 minut pri sobni temperaturi. Nato smo dodali 0,146 g *N*-metoksimetilaminijevega klorida (1,50 mmol, 3,0 ekv.), 278 μL trietilamina (2,00 mmol, 4,0 ekv.) in katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 22 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo zmesi dodali 40 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3 × 15 mL), destilirano vodo (1 × 15 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 15 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 15 mL). Organsko fazo smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 0,109 g spojine **13**.

Spojina <b>13</b>	<i>tert</i> -butil ( <i>R</i> )-(1,5-bis( <i>N</i> -metoksi- <i>N</i> -metilamino)-1,5-dioksopentan-2-il)karbamata
Mr (izračunana)	333,39
Elementna sestava	C <sub>14</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>
Izkoristek reakcije	65,27 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,72 (orositveni reagent: ninhidrin)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ[ppm]= 1.37 (s, 9H, Boc), 1.61 – 1.70 (m, 1H, CH <sub>2A</sub> -β-Glu), 1.78 – 1.86 (m, 1H, CH <sub>2B</sub> -β-Glu), 2.41 – 2.44 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -γ-Glu), 3.07 (s, 3H, NCH <sub>3</sub> ), 3.10 (s, 3H, NCH <sub>3</sub> ), 3.63 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 3.71 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 4.38 – 4.45 (m, 1H, CH-α-Glu), 7.06 (d, 1H, J = 8.0 Hz, Boc-NH)
MS (ESI)	m/z: 356,2 (M+Na) <sup>+</sup>
HR-MS	356,1800 (izračunana: 356,1798) za C <sub>14</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> Na
<sup>13</sup> C NMR (100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ[ppm]= 25.50, 28.04, 32.77, 46.96, 49.87, 56.14, 78.53, 155.64
Izgled	brezbarvno viskozno olje

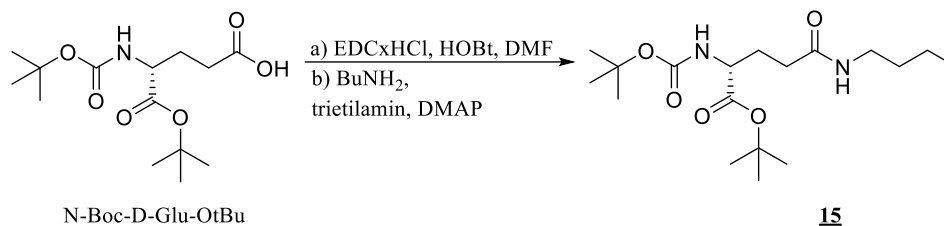
#### 4.2.9 Sinteza di-*tert*-butil (*tert*-butoksikarbonil)-D-glutamata (**14**)



V prvo bučko smo natehtali 0,303 g spojine 1-*tert*-butilnega estra N-Boc-D-glutaminske kisline (1,00 mmol) in jo raztopili v 5 mL DKM. V drugo bučko smo natehtali 0,437 g *tert*-butil 2,2,2-trikloroacetamidata (2,00 mmol, 2,00 ekv.), ga raztopili v 5 mL cikloheksana in ga prenesli v prvo bučko. Dodali smo še 41  $\mu\text{L}$  borovega trifluorida dietil eterata (0,33 mmol, 0,33 ekv.) in pustili mešati 22 ur na sobni temperaturi. Po končani reakciji smo v bučko dali žličko  $\text{NaHCO}_3$ , odfiltrirali oborino in jo spirali še z DKM. Matičnici smo odpareli topilo pod znižanim tlakom, suh preostanek raztopili v 20 mL etilacetata ter ga sprali z nasičeno raztopino  $\text{NaHCO}_3$  ( $2 \times 10$  mL). Organsko fazo smo posušili z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobljen produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo. Za mobilno fazo smo uporabili heksan:etilacetat v razmerju 4:1. Dobili smo 0,197 g spojine **14**.

Spojina <b>14</b>	di- <i>tert</i> -butil ( <i>tert</i> -butoksikarbonil)-D-glutamat
Mr (izračunana)	359,46
Elementna sestava	$\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{NO}_6$
Izkoristek reakcije	54,87 %
Rf (heksan/etilacetat 3:1)	0,57 (orositveni reagent: ninhidrin)
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ )	$\delta[\text{ppm}] = 1.34 - 1.39$ (m, 27H, Boc, $2 \times \text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), $1.64 - 1.74$ (m, 1H, $\text{CH}_{2\text{A}}-\beta\text{-Glu}$ ), $1.82 - 1.91$ (m, 1H, $\text{CH}_{2\text{B}}-\beta\text{-Glu}$ ), $2.19 - 2.29$ (m, 2H, $\text{CH}_2-\gamma\text{-Glu}$ ), $3.79 - 3.85$ (m, 1H, $\text{CH}-\alpha\text{-Glu}$ ), 7.12 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, Boc-NH)
MS (ESI)	$m/z: 382,2$ ( $\text{M}+\text{Na}^+$ )
HR-MS	382,2216 (izračunana: 382,2206) za $\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{NO}_6\text{Na}$
Izgled	belo-rumena amorfna snov

#### 4.2.10 Sinteza *terc*-butil $N^2$ -(*terc*-butoksikarbonil)- $N^5$ -butil-D-glutaminata (15)

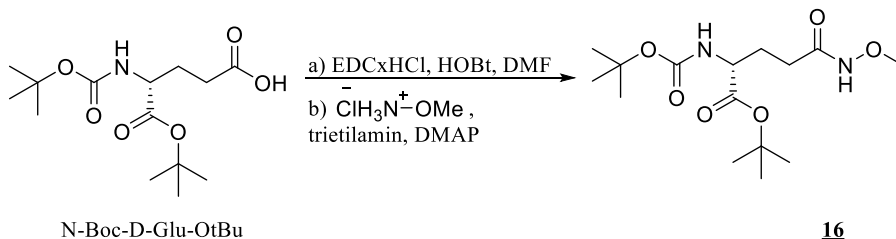


Spojino *N*-Boc-D-Glu-OtBu (0,100 g, 0,330 mmol) smo raztopili v 1 mL DMF, raztopini dodali 0,076 g EDC×HCl (0,396 mmol, 1,2 ekv.) in 0,054 g HOBT (0,396 mmol, 1,2 ekv.) ter pustili mešati 30 minut pri sobni temperaturi. Nato smo dodali 49  $\mu$ L butilamina (0,495 mmol, 1,5 ekv.), 92  $\mu$ L trietilamina (0,660 mmol, 2,0 ekv.) ter katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 22 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo zmesi dodali 30 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3  $\times$  10 mL), destilirano vodo (1  $\times$  10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2  $\times$  10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1  $\times$  10 mL). Organsko fazo smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 0,096 g spojine **15**.

Spojina <b>15</b>	<i>terc</i> -butil $N^2$ -( <i>terc</i> -butoksikarbonil)- $N^5$ -butil-D-glutaminat
Mr (izračunana)	358,48
Elementna sestava	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Izkoristek reakcije	81,36 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,88 (orositveni reagent: ninhidrin)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	$\delta$ [ppm]= 0.86 (t, 3H, $J = 7.6$ Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.23 – 1.28 (m, 2H, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.34 – 1.41 (m, 20H, Boc, OC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.64 – 1.74 (m, 1H, CH <sub>2A</sub> - $\beta$ -Glu), 1.82 – 1.91 (m, 1H, CH <sub>2B</sub> - $\beta$ -Glu), 2.11 (t, 2H, $J = 8.0$ Hz, CH <sub>2</sub> - $\gamma$ -Glu), 2.98 – 3.03 (m, 2H, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 3.72 – 3.78 (m, 1H, CH- $\alpha$ -Glu), 7.11 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, Boc-NH), 7.75 (t, 1H, $J = 5.6$ Hz, CONHCH <sub>2</sub> )
MS (ESI)	m/z: 359,3 (M+H) <sup>+</sup>
HR-MS	359,2554 (izračunana: 359,2546) za C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
<sup>13</sup> C NMR (100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	$\delta$ [ppm]= 13.65, 19.49, 26.55, 27.60, 28.14, 31.18, 31.61, 38.07, 53.94, 78.03, 80.25, 171.08, 171.65
Izgled	brezbarvno viskozno olje



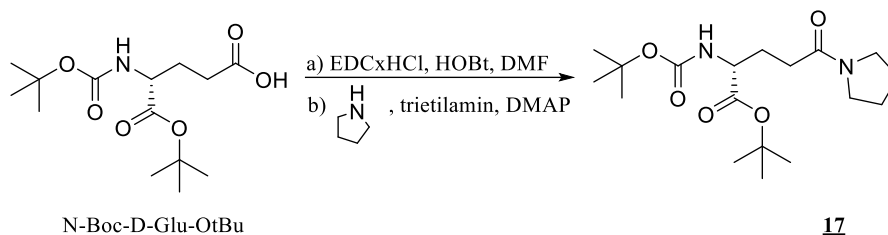
#### 4.2.11 Sinteza *tert*-butil $N^2$ -(*tert*-butoksikarbonil)- $N^5$ -metoksi-D-glutaminata (**16**)



Spojino *N*-Boc-D-Glu-OtBu (0,100 g, 0,330 mmol) smo raztopili v 1 mL DMF, raztopini dodali 0,076 g EDC×HCl (0,396 mmol, 1,2 ekv.) in 0,054 g HOBT (0,396 mmol, 1,2 ekv.) ter pustili mešati 30 minut pri sobni temperaturi. Nato smo dodali 0,041 g metoksiaminijevega klorida (0,495 mmol, 1,5 ekv.), 92 µL trietilamina (0,660 mmol, 2,0 ekv.) ter katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 22 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo zmesi dodali 30 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3 × 10 mL), destilirano vodo (1 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Organsko fazo smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 0,078 g spojine **16**.

Spojina <b>16</b>	<i>tert</i> -butil $N^2$ -( <i>tert</i> -butoksikarbonil)- $N^5$ -metoksi-D-glutaminat
Mr (izračunana)	332,40
Elementna sestava	C <sub>15</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>
Izkoristek reakcije	70,91 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,62 (orositveni reagent: ninhidrin)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ[ppm]= 1.34 – 1.41 (m, 18H, Boc, OC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.65 – 1.75 (m, 1H, CH <sub>2A</sub> -β-Glu), 1.84 – 1.92 (m, 1H, CH <sub>2B</sub> -β-Glu), 2.01 (t, 2H, J = 7.6 Hz, CH <sub>2</sub> -γ-Glu), 3.56 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 3.74 – 3.79 (m, 1H, CH-α-Glu), 7.13 (d, 1H, J = 8.0 Hz, Boc-NH), 10.97 (s, 1H, CONHO)
MS (ESI)	m/z: 355,2 (M+Na) <sup>+</sup>
HR-MS	355,1857 (izračunana: 355,1845) za C <sub>15</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> Na
<sup>13</sup> C NMR (100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ[ppm]= 26.12, 27.59, 28.4, 28.57, 53.72, 63.13, 78.09, 80.38, 155.50, 168.30, 168.32
Izgled	brezbarvno viskozno olje

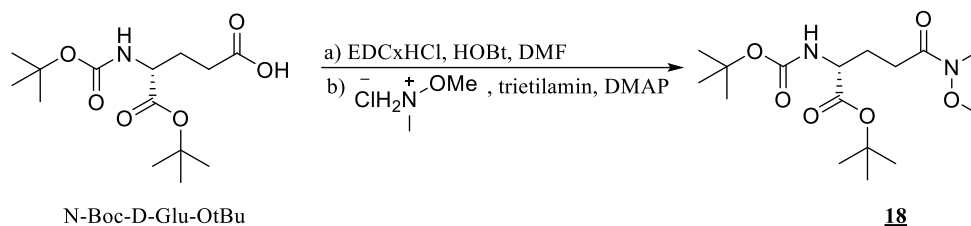
#### 4.2.12 Sinteza *tert*-butil (*R*)-2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-5-okso-5-(pirolidin-1-il)pentanoata (**17**)



Spojino *N*-Boc-*D*-Glu-OtBu (0,100 g, 0,330 mmol) smo raztopili v 1 mL DMF, raztopini dodali 0,076 g EDC×HCl (0,396 mmol, 1,2 ekv.) in 0,054 g HOBT (0,396 mmol, 1,2 ekv.) ter pustili mešati 30 minut pri sobni temperaturi. Nato smo dodali 41 μL pirolidina (0,495 mmol, 1,5 ekv.), 92 μL trietilamina (0,660 mmol, 2,0 ekv.) ter katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 22 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo zmesi dodali 30 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3 × 10 mL), destilirano vodo (1 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Organsko fazo smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 0,106 g spojine **17**.

Spojina <b>17</b>	<i>tert</i> -butil ( <i>R</i> )-2-(( <i>tert</i> -butoksikarbonil)amino)-5-okso-5-(pirolidin-1-il)pentanoat
Mr (izračunana)	356,46
Elementna sestava	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Izkoristek reakcije	89,83 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,88 (orositveni reagent: ninhidrin)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	δ[ppm]= 1.34 – 1.41 (m, 18H, Boc, OC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.73 – 1.78 (m, 3H, CH <sub>2A</sub> -β-Glu, pirolidin-CH <sub>2</sub> ), 1.82 – 1.93 (m, 3H, CH <sub>2B</sub> -β-Glu, pirolidin-CH <sub>2</sub> ), 2.25 – 2.32 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -γ-Glu), 3.26 (t, 2H, <i>J</i> = 6.8 Hz, pirolidin-N-CH <sub>2</sub> ), 3.34 (t, 2H, <i>J</i> = 6.8 Hz pirolidin-N-CH <sub>2</sub> ), 3.77 – 3.83 (m, 1H, CH-α-Glu), 7.16 (d, 1H, <i>J</i> = 7.6 Hz, Boc-NH)
MS (ESI)	<i>m/z</i> : 357,2 (M+H) <sup>+</sup>
HR-MS	357,2391 (izračunana: 357,2389) za C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
<sup>13</sup> C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	δ[ppm]= 23.90, 25.54, 25.88, 27.60, 28.14, 30.11, 45.26, 45.82, 53.91, 78.05, 80.24, 155.54, 169.59, 171.70
Izgled	belo-rumena amorfna snov

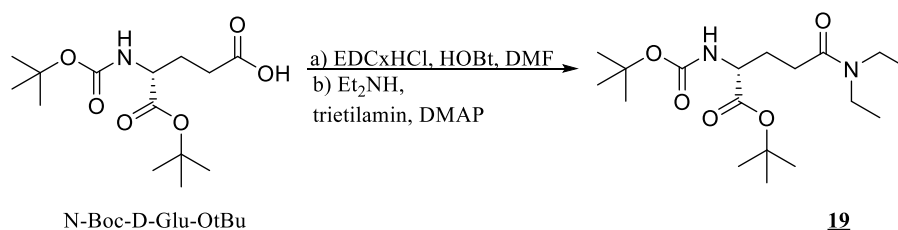
#### 4.2.13 Sinteza *tert*-butil $N^2$ -(*tert*-butoksikarbonil)- $N^5$ -metoksi- $N^5$ -metil-D-glutaminata (**18**)



Spojino *N*-Boc-D-Glu-OtBu (0,100 g, 0,330 mmol) smo raztopili v 1 mL DMF, raztopini dodali 0,076 g EDC×HCl (0,396 mmol, 1,2 ekv.) in 0,054 g HOBT (0,396 mmol, 1,2 ekv.) ter pustili mešati 30 minut pri sobni temperaturi. Nato smo dodali 0,048 g *N*-metoksi-*N*-metilaminijevega klorida (0,495 mmol, 1,5 ekv.), 92  $\mu$ L trietilamina (0,660 mmol, 2,0 ekv.) ter katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 22 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo zmesi dodali 30 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3  $\times$  10 mL), destilirano vodo (1  $\times$  10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2  $\times$  10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1  $\times$  10 mL). Organsko fazo smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 0,107 g spojine **18**.

Spojina <b>18</b>	<i>tert</i> -butil $N^2$ -( <i>tert</i> -butoksikarbonil)- $N^5$ -metoksi- $N^5$ -metil-D-glutaminat
Mr (izračunana)	346,42
Elementna sestava	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>
Izkoristek reakcije	93,86 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,86 (orositveni reagent: ninhidrin)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	$\delta$ [ppm]= 1.35 – 1.42 (m, 18H, Boc, OC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.67 – 1.78 (m, 1H, CH <sub>2A</sub> - $\beta$ -Glu), 1.84 – 1.93 (m, 1H, CH <sub>2B</sub> - $\beta$ -Glu), 2.43 – 2.47 (m, 2H, CH <sub>2</sub> - $\gamma$ -Glu), 3.07 (s, 3H, NCH <sub>3</sub> ), 3.63 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 3.78 – 3.84 (m, 1H, CH- $\alpha$ -Glu), 7.16 (d, 1H, $J$ = 7.6 Hz, Boc-NH)
MS (ESI)	$m/z$ : 347,2 (M+H) <sup>+</sup>
HR-MS	347,2190 (izračunana: 347,2182) za C <sub>16</sub> H <sub>31</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>
<sup>13</sup> C NMR (100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	$\delta$ [ppm]= 25.47, 27.58, 28.12, 51.36, 53.71, 60.88, 78.13, 80.34, 155.55, 171.63, 172.71
Izgled	svetlo rumeno viskozno olje

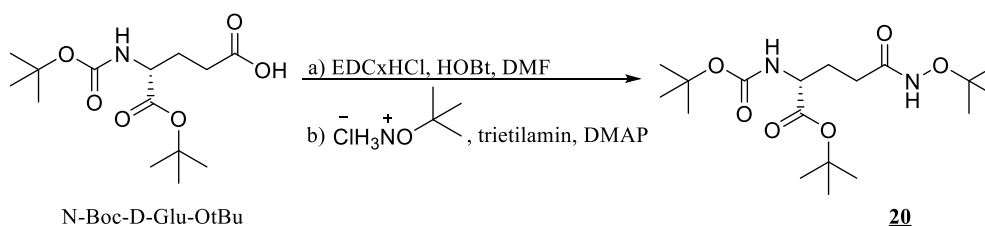
#### 4.2.14 Sinteza *tert*-butil $N^2$ -(*tert*-butoksikarbonil)- $N^5$ , $N^5$ -dietil-D-glutaminata (**19**)



Spojino *N*-Boc-D-Glu-OtBu (0,100 g, 0,330 mmol) smo raztopili v 1 mL DMF, raztopini dodali 0,076 g EDC×HCl (0,396 mmol, 1,2 ekv.) in 0,054 g HOBt (0,396 mmol, 1,2 ekv.) ter pustili mešati 30 minut pri sobni temperaturi. Nato smo dodali 51 µL dietilamina (0,495 mmol, 1,5 ekv.), 92 µL trietilamina (0,660 mmol, 2,0 ekv.) ter katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 22 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo zmesi dodali 30 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3 × 10 mL), destilirano vodo (1 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Organsko fazo smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 0,054 g spojine **19**.

Spojina <b>19</b>	<i>tert</i> -butil <i>N</i> <sup>2</sup> -( <i>tert</i> -butoksikarbonil)- <i>N</i> <sup>5</sup> , <i>N</i> <sup>5</sup> -dietil-D-glutaminat
Mr (izračunana)	358,48
Elementna sestava	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Izkoristek reakcije	45,76 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,80 (orositveni reagent: ninhidrin)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ[ppm]= 1.07 (t, 3H, <i>J</i> = 7.2 Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.22 (t, 3H, <i>J</i> = 7.2 Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.39 (s, 9H, Boc), 1.41 (s, 9H, OC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.62 – 1.71 (m, 1H, CH <sub>2A</sub> -β-Glu), 1.82 – 1.91 (m, 1H, CH <sub>2B</sub> -β-Glu), 2.23-2.35 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -γ-Glu), 3.16 – 3.23 (m, 1H, CH <sub>2a</sub> CH <sub>3</sub> ), 3.34 – 3.47 (m, 2H, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 3.51 – 3.60 (m, 1H, CH <sub>2b</sub> CH <sub>3</sub> ), 4.47 – 4.51 (m, 1H, CH-α-Glu)
MS (ESI)	m/z: 359,3 (M+H) <sup>+</sup>
HR-MS	359,2550 (izračunano: 359,2546) za C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Izgled	brezbarvno viskozno olje

#### 4.2.15 Sinteza *tert*-butil *N*<sup>5</sup>-(*tert*-butoksi)-*N*<sup>2</sup>-(*tert*-butoksikarbonil)-D-glutaminata (**20**)

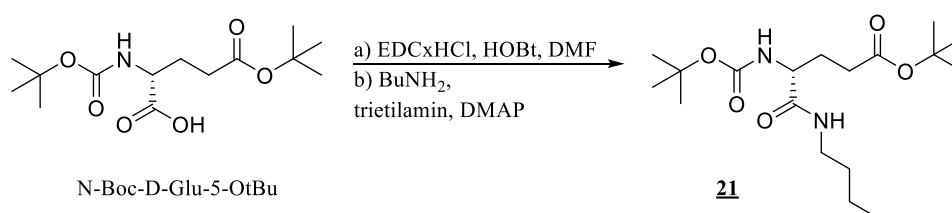


Spojino *N*-Boc-D-Glu-OtBu (0,100 g, 0,330 mmol) smo raztopili v 1 mL DMF, raztopini dodali 0,076 g EDC×HCl (0,396 mmol, 1,2 ekv.) in 0,054 g HOBt (0,396 mmol, 1,2 ekv.) ter pustili mešati 30 minut pri sobni temperaturi. Nato smo dodali 0,062 g *tert*-butoksiaminijevega klorida (0,495 mmol, 1,5 ekv.), 92 µL trietilamina (0,660 mmol, 2,0 ekv.) ter katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 22 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo zmesi dodali 30 mL etilacetata in organsko fazo

spirali z 1M HCl (3 × 10 mL), destilirano vodo (1 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Organsko fazo smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 0,080 g spojine **20**.

Spojina <b>20</b>	<i>tert</i> -butil <i>N</i> <sup>5</sup> -( <i>tert</i> -butoksi)- <i>N</i> <sup>2</sup> -( <i>tert</i> -butoksikarbonil)-D-glutaminat
Mr (izračunana)	374,48
Elementna sestava	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>
Izkoristek reakcije	64,52 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,82 (orositveni reagent: ninhidrin)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ[ppm]= 1.20 (s, 9H, NHOC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.40 (s, 9H, Boc), 1.41 (s, 9H, OC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.76 – 1.85 (m, 1H, CH <sub>2A</sub> -β-Glu), 1.87 – 1.96 (m, 1H, CH <sub>2B</sub> -β-Glu), 2.27 (t, 2H, <i>J</i> = 7.2 Hz, CH <sub>2</sub> -γ-Glu), 3.93 – 3.97 (m, 1H, CH-α-Glu)
MS (ESI)	<i>m/z</i> : 375,2 (M+H) <sup>+</sup>
HR-MS	375,2495 (izračunana: 375,2495) za C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>
Izgled	brezbarvna viskozna snov

#### 4.2.16 Sinteza *tert*-butil (*R*)-4-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-5-(butilamino)-5-oksopentanoata (**21**)

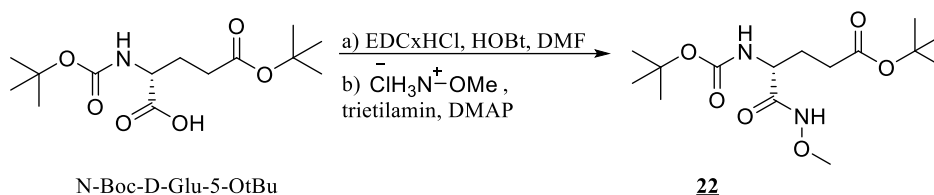


Spojino *N*-Boc-D-Glu-5-OtBu (0,100 g, 0,330 mmol) smo raztopili v 1 mL DMF, raztopini dodali 0,076 g EDC×HCl (0,396 mmol, 1,2 ekv.) in 0,054 g HOBT (0,396 mmol, 1,2 ekv.) ter pustili mešati 30 minut pri sobni temperaturi. Nato smo dodali 49 μL butilamina (0,495 mmol, 1,5 ekv.), 92 μL trietilamina (0,660 mmol, 2,0 ekv.) ter katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 22 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo zmesi dodali 30 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3 × 10 mL), destilirano vodo (1 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Organsko fazo smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 0,102 g spojine **21**.

Spojina <b>21</b>	<i>tert</i> -butil ( <i>R</i> )-4-(( <i>tert</i> -butoksikarbonil)amino)-5-(butilamino)-5-oksopentanoat
Mr (izračunana)	358,48
Elementna sestava	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Izkoristek reakcije	86,44 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,80 (orositveni reagent: ninhidrin)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	δ[ppm]= 0.86 (t, 3H, <i>J</i> = 7.6 Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.22 – 1.40 (m, 22H, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , Boc, OC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.62 – 1.71 (m, 1H,

	$\text{CH}_{2\text{A}}-\beta\text{-Glu}$ ), 1.77 – 1.86 (m, 1H, $\text{CH}_{2\text{B}}-\beta\text{-Glu}$ ), 2.19 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, $\text{CH}_2-\gamma\text{-Glu}$ ), 2.97 – 3.11 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.84 – 3.90 (m, 1H, $\text{CH}-\alpha\text{-Glu}$ ), 6.81 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, Boc-NH), 7.74 (t, 1H, $J = 5.6$ Hz, CONHCH <sub>2</sub> )
MS (ESI)	m/z: 381,2 (M+Na) <sup>+</sup> ali 359,3 (M+H) <sup>+</sup>
HR-MS	359,2545 (izračunana: 359,2546) za C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
<sup>13</sup> C NMR (100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	$\delta$ [ppm]= 13.47, 19.18, 26.96, 27.55, 27.92, 30.73, 31.21, 80.34, 155.44, 172.13
Izgled	svetlo rumena amorfna snov

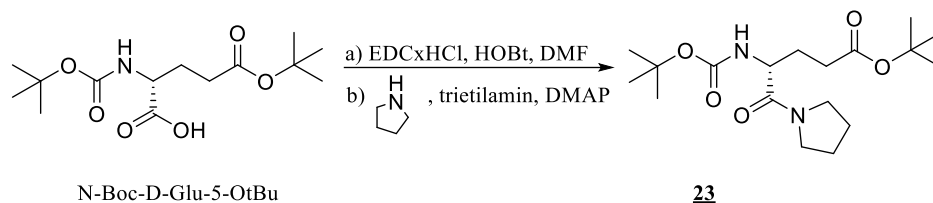
#### 4.2.17 Sinteza *tert*-butil (*R*)-4-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-5-(metoksiamino)-5-oksopentanoata (**22**)



Spojino *N*-Boc-D-Glu-5-OtBu (0,100 g, 0,330 mmol) smo raztopili v 1 mL DMF, raztopini dodali 0,076 g EDC×HCl (0,396 mmol, 1,2 ekv.) in 0,054 g HOBT (0,396 mmol, 1,2 ekv.) ter pustili mešati 30 minut pri sobni temperaturi. Nato smo dodali 0,041 g metoksiaminijevega klorida (0,495 mmol, 1,5 ekv.), 92  $\mu$ L trietilamina (0,660 mmol, 2,0 ekv.) ter katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 22 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo zmesi dodali 30 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3 × 10 mL), destilirano vodo (1 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Organsko fazo smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 0,105 g spojine **22**.

Spojina <b>22</b>	<i>tert</i> -butil ( <i>R</i> )-4-(( <i>tert</i> -butoksikarbonil)amino)-5-(metoksiamino)-5-oksopentanoat
Mr (izračunana)	332,40
Elementna sestava	C <sub>15</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>
Izkoristek reakcije	95,46 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,78 (orositveni reagent: ninhidrin)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	$\delta$ [ppm]= 1.38 (s, 18H, Boc, OC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.63 – 1.72 (m, 1H, $\text{CH}_{2\text{A}}-\beta\text{-Glu}$ ), 1.73 – 1.80 (m, 1H, $\text{CH}_{2\text{B}}-\beta\text{-Glu}$ ), 2.19 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, $\text{CH}_2-\gamma\text{-Glu}$ ), 3.55 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 3.73 – 3.78 (m, 1H, $\text{CH}-\alpha\text{-Glu}$ ), 6.98 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, Boc-NH), 11.19 (s, 1H, CONHO)
MS (ESI)	m/z: 355,2 (M+Na) <sup>+</sup>
HR-MS	355,1848 (izračunana: 355,1845) za C <sub>15</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> Na
<sup>13</sup> C NMR (100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	$\delta$ [ppm]= 14.05, 26.85, 27.69, 28.10, 31.07, 51.21, 63.08, 79.73, 159.17
Izgled	svetlo rumeno viskozno olje

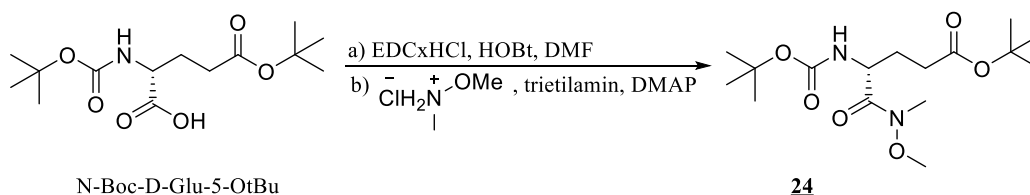
#### 4.2.18 Sinteza *tert*-butil (*R*)-4-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-5-okso-5-(pirolidin-1-il)pentanoata (**23**)



Spojino *N*-Boc-D-Glu-5-OtBu (0,100 g, 0,330 mmol) smo raztopili v 1 mL DMF, raztopini dodali 0,076 g EDC×HCl (0,396 mmol, 1,2 ekv.) in 0,054 g HOBt (0,396 mmol, 1,2 ekv.) ter pustili mešati 30 minut pri sobni temperaturi. Nato smo dodali 41 μL pirolidina (0,495 mmol, 1,5 ekv.), 92 μL trietilamina (0,660 mmol, 2,0 ekv.) ter katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 22 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo zmesi dodali 30 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3 × 10 mL), destilirano vodo (1 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Organsko fazo smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 0,114 g spojine **23**.

Spojina <b>23</b>	<i>tert</i> -butil ( <i>R</i> )-4-(( <i>tert</i> -butoksikarbonil)amino)-5-okso-5-(pirolidin-1-il)pentanoat
Mr (izračunana)	356,46
Elementna sestava	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Izkoristek reakcije	96,61 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,80 (orositveni reagent: ninhidrin)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ[ppm]= 1.37 – 1.40 (m, 18H, Boc, OC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.59 – 1.68 (m, 1H, CH <sub>2A</sub> -β-Glu), 1.75 – 1.80 (m, 3H, CH <sub>2B</sub> -β-Glu, 1 × pirolidin-CH <sub>2</sub> ), 1.86 – 1.92 (m, 2H, pirolidin-CH <sub>2</sub> ), 2.24 (t, 2H, J = 7.2 Hz, CH <sub>2</sub> -γ-Glu), 3.22 – 3.34 (m, 2H, pirolidin-N-CH <sub>2</sub> ), 3.44 – 3.53 (m, 2H, pirolidin-N-CH <sub>2</sub> ), 4.17 – 4.22 (m, 1H, CH-α-Glu), 6.94 (d, 1H, J = 8.4 Hz, Boc-NH)
MS (ESI)	m/z: 357,2 (M+H) <sup>+</sup>
HR-MS	357,2394 (izračunana: 357,2389) za C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
<sup>13</sup> C NMR (100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ[ppm]= 23.60, 25.60, 26.20, 27.68, 28.11, 30.81, 45.56, 45.68, 78.06, 79.77, 155.33, 169.91, 171.84
Izgled	svetlo rumeno viskozno olje

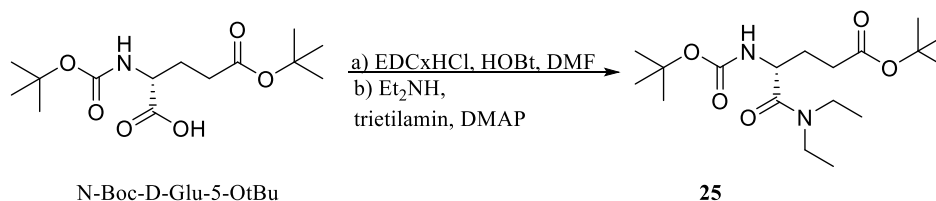
#### 4.2.19 Sinteza *tert*-butil (*R*)-4-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-5-(metoksi(metil)amino)-5-okso-5-pentanoata (**24**)



Spojino *N*-Boc-D-Glu-5-OtBu (0,100 g, 0,330 mmol) smo raztopili v 1 mL DMF, raztopini dodali 0,076 g EDC×HCl (0,396 mmol, 1,2 ekv.) in 0,054 g HOBt (0,396 mmol, 1,2 ekv.) ter pustili mešati 30 minut pri sobni temperaturi. Nato smo dodali 48 g *N*-metoksi-*N*-metilaminijevega klorida (0,495 mmol, 1,5 ekv.), 92 µL trietilamina (0,660 mmol, 2,0 ekv.) ter katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 22 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo zmesi dodali 30 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3 × 10 mL), destilirano vodo (1 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Organsko fazo smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 0,079 g spojine **24**.

Spojina <b>24</b>	<i>tert</i> -butil ( <i>R</i> )-4-(( <i>tert</i> -butoksikarbonil)amino)-5-(metoksi(metil)amino)-5-oksopentanoat
Mr (izračunana)	346,42
Elementna sestava	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>
Izkoristek reakcije	69,30 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,88 (orositveni reagent: ninhidrin)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ[ppm]= 1.37 (s, 9H, Boc), 1.39 (s, 9H, OC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.60 – 1.69 (m, 1H, CH <sub>2A</sub> -β-Glu), 1.74 – 1.83 (m, 1H, CH <sub>2B</sub> -β-Glu), 2.23 (t, 2H, <i>J</i> = 7.2 Hz, CH <sub>2</sub> -γ-Glu), 3.10 (s, 3H, NCH <sub>3</sub> ), 3.71 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 4.38 – 4.45 (m, 1H, CH-α-Glu), 7.04 (d, 1H, <i>J</i> = 8.0 Hz, Boc-NH)
MS (ESI)	m/z: 369,2 (M+Na) <sup>+</sup>
HR-MS	369,1996 (izračunana: 369,2002) za C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> Na
<sup>13</sup> C NMR (100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ[ppm]= 26.01, 27.68, 28.14, 31.03, 49.49, 78.02, 79.67, 155.40, 171.59
Izgled	brezbarvno viskozno olje

#### 4.2.20 Sinteza *tert*-butil (*R*)-4-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-5-(dietilamino)-5-oksopentanoata (**25**)



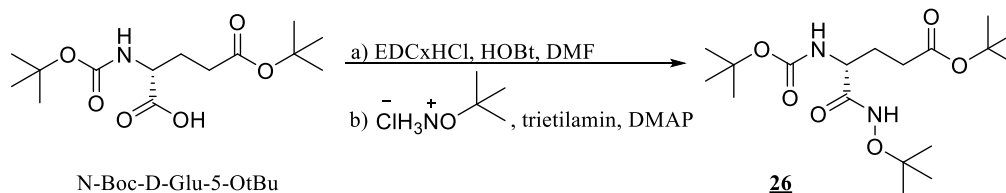
Spojino *N*-Boc-D-Glu-5-OtBu (0,100 g, 0,330 mmol) smo raztopili v 1 mL DMF, raztopini dodali 0,076 g EDC×HCl (0,396 mmol, 1,2 ekv.) in 0,054 g HOBt (0,396 mmol, 1,2 ekv.) ter pustili mešati 30 minut pri sobni temperaturi. Nato smo dodali 51 µL dietilamina (0,495 mmol, 1,5 ekv.), 92 µL trietilamina (0,660 mmol, 2,0 ekv.) ter katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 22 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo zmesi dodali 30 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3 × 10 mL), destilirano



vodo (1 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Organsko fazo smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 0,071 g spojine **25**.

Spojina <b>25</b>	<i>tert</i> -butil ( <i>R</i> )-4-(( <i>tert</i> -butoksikarbonil)amino)-5-(dietilamino)-5-oksopentanoat
Mr (izračunana)	358,48
Elementna sestava	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Izkoristek reakcije	60,17 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,88 (orositveni reagent: ninhidrin)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ[ppm]= 0.99 (t, 3H, <i>J</i> = 7.2 Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.13 (t, 3H, <i>J</i> = 7.2 Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.36 (s, 9H, Boc), 1.39 (s, 9H, OC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.57 – 1.66 (m, 1H, CH <sub>2A</sub> -β-Glu), 1.69 – 1.78 (m, 1H, CH <sub>2B</sub> -β-Glu), 2.23 (t, 2H, <i>J</i> = 6.8 Hz, CH <sub>2</sub> -γ-Glu), 3.07 – 3.14 (m, 2H, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 3.28 – 3.36 (m, 2H, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 4.28 – 4.34 (m, 1H, CH-α-Glu), 6.91 (d, 1H, <i>J</i> = 8.8 Hz, Boc-NH)
MS (ESI)	m/z: 359,3 (M+H) <sup>+</sup>
HR-MS	359,2250 (izračunana: 359,2546) za C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
<sup>13</sup> C NMR (100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ[ppm]= 12.82, 14.28, 26.97, 27.66, 28.10, 30.79, 40.87, 49.05, 78.04, 79.78, 155.31, 170.74, 171.90
Izgled	brezbarvno viskozno olje

#### 4.2.21 Sinteza *tert*-butil (*R*)-5-(*tert*-butoksiamino)-4-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-5-oksopentanoata (**26**)



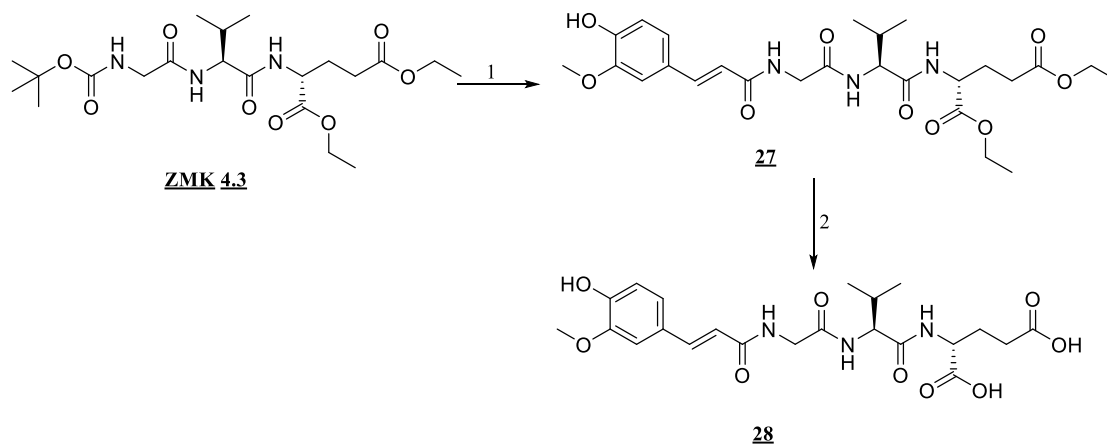
Spojino *N*-Boc-D-Glu-5-OtBu (0,100 g, 0,330 mmol) smo raztopili v 1 mL DMF, raztopini dodali 0,076 g EDC·HCl (0,396 mmol, 1,2 ekv.) in 0,054 g HOBt (0,396 mmol, 1,2 ekv.) ter pustili mešati 30 minut pri sobni temperaturi. Nato smo dodali 0,062 g *tert*-butoksiaminijevega klorida (0,495 mmol, 1,5 ekv.), 92 μL trietilamina (0,660 mmol, 2,0 ekv.) ter katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 22 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo zmesi dodali 30 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3 × 10 mL), destilirano vodo (1 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Organsko fazo smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 0,096 g spojine **26**.

Spojina <b>26</b>	<i>tert</i> -butil ( <i>R</i> )-5-( <i>tert</i> -butoksiamino)-4-(( <i>tert</i> -butoksikarbonil)amino)-5-oksopentanoat
Mr (izračunana)	374,48

Elementna sestava	$C_{18}H_{34}N_2O_6$
Izkoristek reakcije	77,42 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,80 (orositveni reagent: ninhidrin)
Optična sučnost	$[\alpha]_{D,23} = +17,2^\circ$ ( $c = 0,11$ , MeOH)
$^1H$ -NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )	$\delta$ [ppm]=1.14 (s, 9H, $NHOC(CH_3)_3$ ), 1.37 (s, 9H, Boc), 1.39 (s, 9H, $OC(CH_3)_3$ ), 1.66 – 1.81 (m, 2H, $CH_2$ - $\beta$ -Glu), 2.20 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, $CH_2$ - $\gamma$ -Glu), 3.78 – 3.84 (m, 1H, $CH$ - $\alpha$ -Glu), 6.91 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, Boc-NH), 10.46 (s, 1H, CONHO)
MS (ESI)	m/z: 375,3 ( $M+H$ ) <sup>+</sup>
HR-MS	375,2502 (izračunana: 375,2495) za $C_{18}H_{35}N_2O_6$
$^{13}C$ NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )	$\delta$ [ppm]= 26.20, 27.70, 28.09, 31.25, 78.07, 79.72, 80.76, 155.16, 171.54
Izgled	bela amorfna snov

## 4.3 REAKCIJSKA SHEMA 3

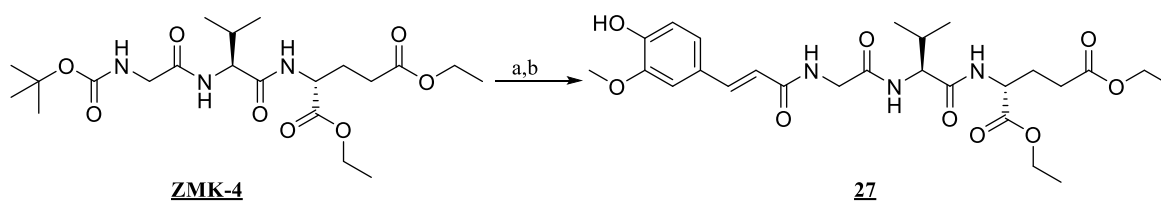
### Priprava intermediiata II



1: a) TFA/diklorometan (1:7) b) *trans*-ferulična kislina, EDC×HCl, HOBt, trietilamin, DMAP, DMF

2: 1M LIOH, THF

### 4.3.1 Sinteza dietil ((*E*)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil-D-glutamata (27)



a) TFA/diklorometan (1:7)

b) *trans*-ferulična kislina, EDC×HCl, HOBt, trietilamin, DMAP, DMF

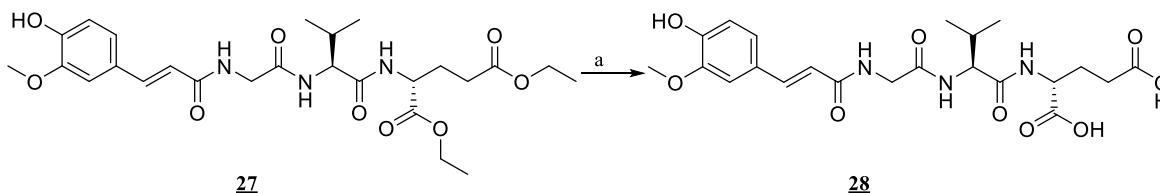
V prvo bučko smo natehtali 0,560 g spojine ZMK-4 (1,219 mmol), jo raztopili v 7 mL diklorometana in ohladili na ledeni kopeli. Nato smo po kapljicah dodali 1 mL trifluoroocetne kisline. Odstranili smo ledeno kopel in reakcijsko zmes pustili mešati 2 uri pri sobni temperaturi. Medtem smo v drugo bučko natehtali 0,277 g *trans*-ferulične kisline (1,428 mmol, 1,17 ekv.) in jo raztopili v 1 mL DMF. Raztopini smo dodali 0,273 g EDC×HCl (1,428 mmol, 1,17 ekv.) in 0,193 g HOBt (1,428 mmol, 1,17 ekv.) ter jo pustili mešati pri sobni temperaturi 1 uro.

Po 2 urah smo zaznali konec reakcije in iz prve bučke odpareli topilo pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo prelili z dietil etrom ( $2 \times 10$  mL) in ga odpareli pod znižanim tlakom. Preostanek smo raztopili v 0,5 mL DMF in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Dodali smo 0,903 mL trietilamina (6,490 mmol, 5,30 ekv.), vsebino druge bučke in katalitično količino DMAP. Odstranili smo ledeno kopel in pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 24 urah smo reakcijski zmesi dodali 80 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl ( $3 \times 25$  mL), destilirano vodo ( $2 \times 25$  mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> ( $2 \times 25$  mL) in nasičeno raztopino NaCl ( $1 \times 25$  mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 0,560 g spojine 27.

Spojina <u>27</u>	dietil ((E)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil-D-glutamat
Mr (izračunana)	535,59
Elementna sestava	C <sub>26</sub> H <sub>37</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub>
Izkoristek reakcije	85,76 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,48 (orositveni reagent: ninhidrin)
T <sub>tališča</sub>	117-120 °C
Izgled	rumena amorfna snov

Referenca za spojino 27: (20)

#### 4.3.2 Sinteza ((E)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil-D-glutaminske kisline (28)



a) 1M LiOH, THF

Spojino 27 (0,560 g, 1,046 mmol) smo raztopili v 10 mL THF, dodali 5,23 mL 1M LiOH (5,23 mmol, 5 ekv.) in pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 24 urah smo odpareli THF pod znižanim tlakom, preostalo vodno fazo pa nakisali do pH = 2-3 s 3M HCl. Izpadla je oborina, ki smo jo odfiltrirali in matičnico ekstrahirali z etilacetatom ( $3 \times 10$  mL). Združene organske faze smo spirali z nasičeno raztopino NaCl ( $2 \times 10$  mL), jih sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in filtrirali. Topilo smo odpareli pod znižanim tlakom. Dobili smo 0,210 g spojine 28.

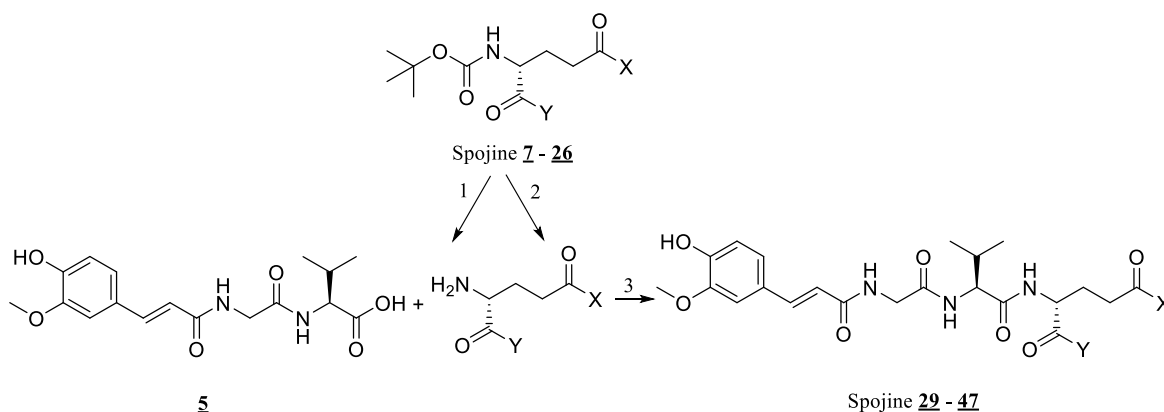
Spojina <u>28</u>	((E)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil-D-glutaminska kislina
Mr (izračunana)	479,49
Elementna sestava	C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub>

Izkoristek reakcije	41,83 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,67 (orositveni reagent: ninhidrin)
T <sub>tališča</sub>	100-104 °C
Izgled	rumeno viskozno olje

Referenca za spojino **28**: (20)

## 4.4 REAKCIJSKA SHEMA 4

### Strategija I

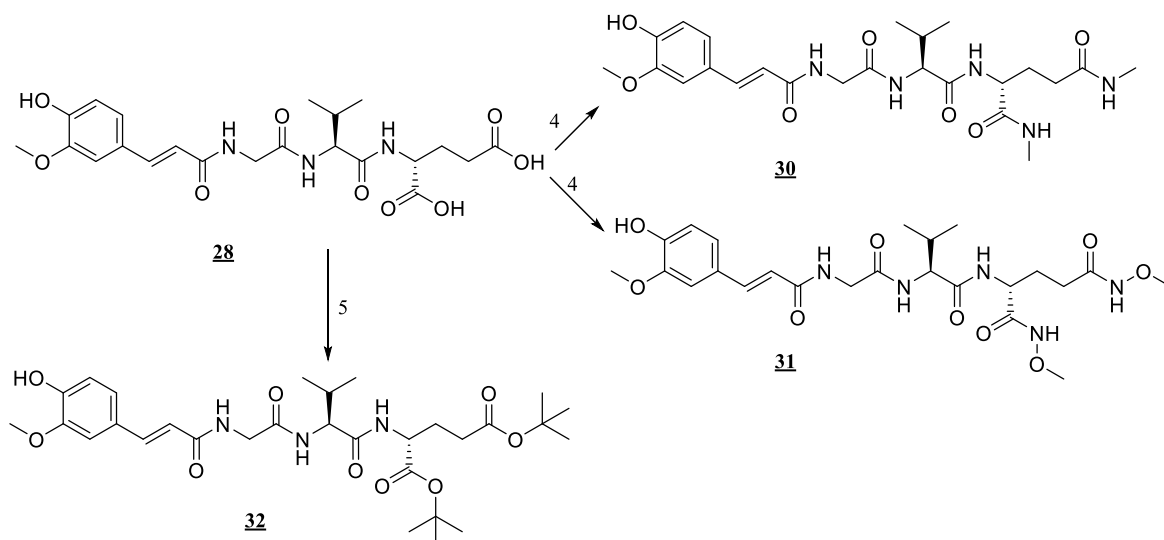


1: TFA/diklorometan

2: 1M HCl/AcOH, EtOAc

3: EDC×HCl, HOBt, trietilamin, DMAP, DMF

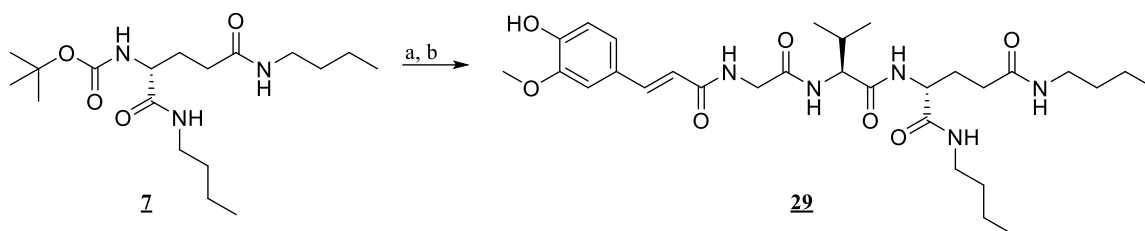
### Strategija II



4: a) EDC×HCl, HOBt, DMF b) MeNH<sub>2</sub> ali MeONH<sub>2</sub>, trietilamin, DMAP

5: *tert*-butil 2,2,2-trikloroacetamidat, BF<sub>3</sub> × Et<sub>2</sub>O, THF, cikloheksan

#### 4.4.1 Sinteza (*R*)-*N*<sup>l</sup>, *N*<sup>5</sup>-dibutil-2-((*S*)-2-(2-((*E*)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetmido)-3-metilbutanamido)pentan-1,5-diamida (**29**)



- TFA/diklorometan (1:6)
- spojina **5**, EDC×HCl, HOBt, trietilamin, DMAP, DMF

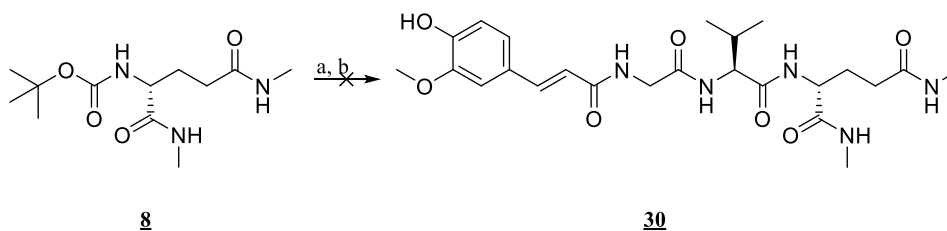
Spojino **7** (120 mg, 0,336 mmol) smo raztopili v 2 mL diklorometana in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Nato smo po kapljicah dodali 0,3 mL trifluoroocetne kisline, odstranili ledeno kopel in pustili mešati 2 uri pri sobni temperaturi. Topilo smo odpareli pod znižanim tlakom, suh preostanek smo triturali z dietil etrom (2 × 10 mL) in tudi tega odpareli pod znižanim tlakom. Preostanek smo raztopili v 1 mL DMF in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Potem smo dodali: 0,234 mL trietilamina (1,68 mmol, 5,0 ekv.), 130 mg spojine **5** (0,370 mmol, 1,1 ekv.), 71 mg EDC×HCl (0,370 mmol, 1,1 ekv.), 50 mg HOBt (0,370 mmol, 1,1 ekv.) in katalitično količino DMAP. Ledeno kopel smo odstranili in reakcijsko zmes pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 24 urah smo reakcijski zmesi dodali 40 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3 × 10 mL), destilirano vodo (1 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo prefiltrirali in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Dobili smo 115 mg spojine **29**.

Spojina <b>29</b>	( <i>R</i> )- <i>N</i> <sup>l</sup> , <i>N</i> <sup>5</sup> -dibutil-2-(( <i>S</i> )-2-(2-(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetmido)-3-metilbutanamido)pentan-1,5-diamid
Mr (izračunana)	589,73
Elementna sestava	C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>
Izkoristek reakcije	58,08 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,49 (orositveni reagent: ninhidrin)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ[ppm]= 0.80 – 0.87 (m, 12H, 2 × CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , 2 × CH <sub>3</sub> -Val), 1.22 – 1.36 (m, 8H, 2 × CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.63 – 1.78 (m, 1H, CH <sub>2A</sub> -β-Glu), 1.81 – 1.98 (m, 2H, CH <sub>2B</sub> -β-Glu, CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 1.99 – 2.10 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -γ-Glu), 3.00 – 3.06 (m, 4H, 2 × CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 3.80 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 3.86 – 3.92 (m, 2H, NHCH <sub>2</sub> CO), 4.11 – 4.18 (m, 2H, CH-α-Glu, CH-α-Val), 6.55 (d, 1H, <i>J</i> = 16.0 Hz, CH=CHCO), 6.79 (d, 1H, <i>J</i> = 8.0 Hz, H-Ar), 7.00 (dd, 1H, <i>J</i> = 8.0 Hz, <i>J</i> = 1.2 Hz, H-Ar), 7.14 (d, 1H, <i>J</i> = 2.0 Hz, H-Ar), 7.33 (d, 1H, <i>J</i> = 15.6, CH=CHCO), 7.71 – 7.85 (m,

	2H, 2 × NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 7.94 – 8.05 (m, 1H, NH), 8.16 (t, 1H, J = 5.6 Hz, NHCH <sub>2</sub> ), 8.25 (d, 1H, J = 8.0 Hz, NH), 9.45 (s, 1H, OH)
MS (ESI)	m/z: 590,4 (M+H) <sup>+</sup>
HR-MS	590,3542 (izračunana: 590,3554) za C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>
HPLC (254 nm)	100,00 % (t <sub>R</sub> = 6,55 min)
IR	3279, 2959, 1630, 1517, 1454, 1377, 1267, 1200, 1128, 1031, 980, 706 cm <sup>-1</sup>
<sup>13</sup> C NMR (100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ[ppm]= 13.65, 18.26, 19.8, 19.45, 19.53, 31.13, 31.21, 31.87, 38.09, 52.37, 55.46, 110.81, 115.60, 121.54, 138.21, 139.38, 147.76, 169.45, 171.13, 171.17, 171.18
T <sub>tališča</sub>	135-142 °C
Izgled	rumeno - oranžna amorfna snov

#### 4.4.2 Poskus sinteze (*R*)-2-((*S*)-2-(2-((*E*)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido) acetamido)-3-metilbutanamido)-*N*<sup>1</sup>, *N*<sup>5</sup>-dimetilpentan-1,5-diamida (**30**)

##### Strategija I (1)

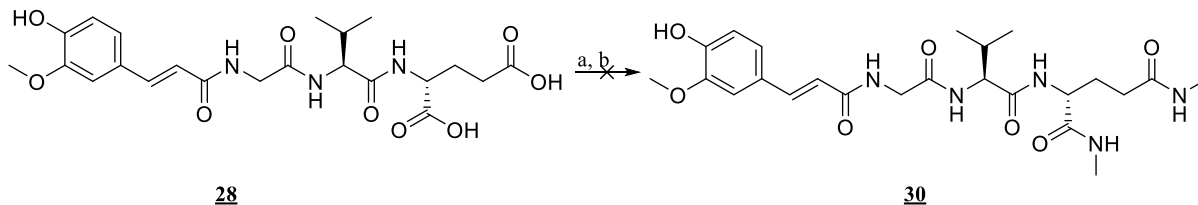


- TFA/diklorometan (1:6)
- spojina **5**, EDC×HCl, HOBt, trietilamin, DMAP, DMF

Spojino **8** (30 mg, 0,11 mmol) smo raztopili v 2 mL diklorometana in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Nato smo po kapljicah dodali 0,3 mL trifluoroocetne kisline, odstranili ledeno kopel in pustili mešati 2 uri pri sobni temperaturi. Topilo smo odpareli pod znižanim tlakom, suh preostanek triturirali z dietil etrom (2 × 10 mL) in tudi tega odpareli pod znižanim tlakom. Preostanek smo raztopili v 1 mL DMF in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Potem smo dodali: 77 µL trietilamina (0,55 mmol, 5 ekv.), 39 mg spojine **5** (0,11 mmol, 1 ekv.), 0,021 g EDC×HCl (0,11 mmol, 1 ekv.), 15 mg HOBt (0,11 mmol, 1 ekv.) in katalitično količino DMAP. Ledeno kopel smo odstranili in pustili mešati 24 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo reakcijski zmesi dodali 40 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3 × 10 mL), destilirano vodo (1 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Organsko fazo

smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo prefiltrirali in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Dobili smo manj kot 10 mg rumene amorfne snovi.

### Strategija II:



- a) EDC×HCl, HOBt, DMF
- b) MeNH<sub>2</sub>, trietilamin, DMAP

Spojino 28 (50 mg, 0,104 mmol) smo raztopili v 1 mL DMF, raztopini dodali 45 mg EDC×HCl (0,260 mmol, 2,5 ekv.) in 35 mg HOBt (0,260 mmol, 2,5 ekv.) ter jo pustili mešati 30 minut pri sobni temperaturi. Nato smo dodali 39 µL metilamina (0,312 mmol, 3,0 ekv.), 58 µL trietilamina (0,416 mmol, 4,0 ekv.) ter katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 22 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo zmesi dodali 40 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3 × 10 mL), destilirano vodo (1 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (1 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL) Organsko fazo smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 15 mg rumene amorfne snovi.

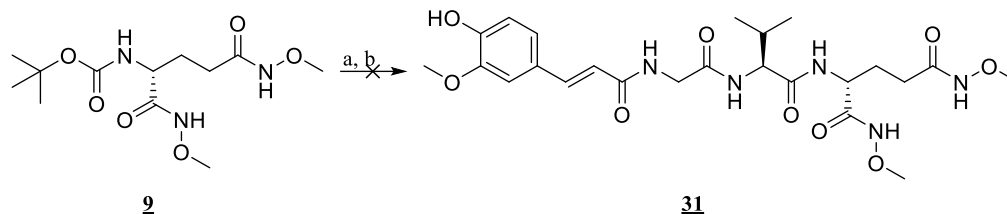
Spojina <u>30</u>	( <i>R</i> )-2-(( <i>S</i> )-2-(2-(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)- <i>N</i> <sup>1</sup> , <i>N</i> <sup>5</sup> -dimetilpentan-1,5-diamid
Mr (izračunana)	505,57
Elementna sestava	C <sub>24</sub> H <sub>35</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>
Izkoristek reakcije	I) 0 % II) 0 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,55 (orositveni reagent: ninhidrin)
Izgled	rumena amorfna snov

Reakcija ni uspela, saj smo iz analiz ugotovili, da ni nastal želeni produkt.



#### 4.4.3 Poskus sinteze (*R*)-2-((*S*)-2-(2-((*E*)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)-*N*<sup>1</sup>, *N*<sup>5</sup>-dimetoksipentan-1,5-diamida (**31**)

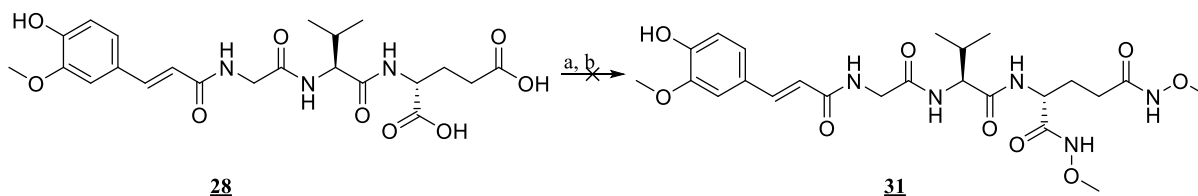
##### Strategija I (1)



- TFA/diklorometan (1:6)
- spojina **5**, EDC×HCl, HOBt, trietilamin, DMAP, DMF

Spojino **9** (30 mg, 0,113 mmol) smo raztopili v 2 mL diklorometana in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Nato smo po kapljicah dodali 0,3 mL trifluoroocetne kisline, odstranili ledeno kopel in pustili mešati 2 uri pri sobni temperaturi. Topilo smo odpareli pod znižanim tlakom, suh preostanek triturirali z dietil etrom (2 × 10 mL) in tudi tega odpareli pod znižanim tlakom. Preostanek smo raztopili v 0,8 mL DMF in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Potem smo dodali: 79 µL trietilamina (0,565 mmol, 5,0 ekv.), 44 mg spojine **5** (0,124 mmol, 1,1 ekv.), 24 mg EDC×HCl (0,124 mmol, 1,1 ekv), 17 mg HOBt (0,124 mmol, 1,1 ekv.) in katalitično količino DMAP. Odstranili smo ledeno kopel in pustili mešati 24 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo reakcijski zmesi dodali 40 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3 × 10 mL), destilirano vodo (1 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo prefiltrirali in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Dobili smo manj kot 10 mg bele amorfne snovi.

##### Strategija II:



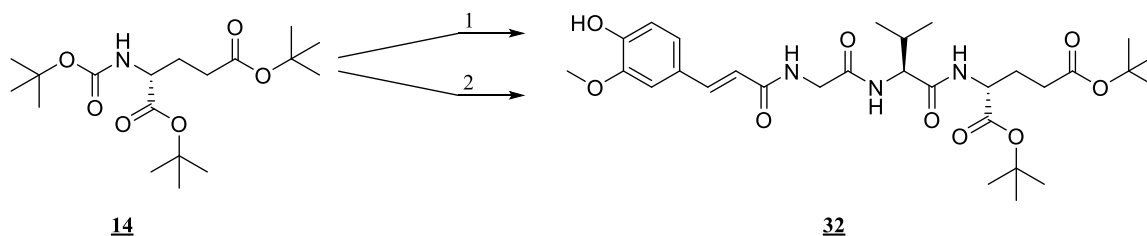
- EDC×HCl, HOBt, DMF
- Cl<sup>-</sup>H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-OMe, trietilamin, DMAP

Spojino **28** (60 mg, 0,125 mmol) smo raztopili v 1 mL DMF, raztopini dodali 60 mg EDC×HCl (0,313 mmol, 2,5 ekv.) in 42 mg HOBt (0,313 mmol, 2,5 ekv.) ter jo pustili mešati 30 minut pri sobni temperaturi. Nato smo dodali 31 mg metoksiaminijevega klorida (0,375 mmol, 3,0 ekv.), 70 µL trietilamina (0,500 mmol, 4,0 ekv.) ter katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 22 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo zmesi dodali 40 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3 × 10 mL), destilirano vodo (1 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (1 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Organsko fazo smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 10 mg bele amorfne snovi.

Spojina <b>31</b>	( <i>R</i> )-2-(( <i>S</i> )-2-(2-(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)- <i>N</i> <sup>1</sup> , <i>N</i> <sup>5</sup> -dimetoksipentan-1,5-diamid
Mr (izračunana)	537,57
Elementna sestava	C <sub>24</sub> H <sub>35</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub>
Izkoristek reakcije	I) 0 % II) 0 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,49 (orositveni reagent: ninhidrin)
Izgled	bela amorfna snov

Reakcija ni uspela, saj smo iz analiz ugotovili, da ni nastal želeni produkt.

#### 4.4.4 Sinteza di-*terc*-butil ((*E*)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil-D-glutamata (**32**)



##### Strategija I (1):

- TFA/diklorometan (1:8)
- spojina **5**, EDC×HCl, HOBt, trietilamin, DMAP, DMF

Spojino **14** (80 mg, 0,223 mmol) smo raztopili v 2 mL diklorometana in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Nato smo po kapljicah dodali 0,25 mL trifluoroocetne kisline, odstranili ledeno kopel in pustili mešati 2 uri pri sobni temperaturi. Topilo smo odpareli pod znižanim tlakom, suh preostanek triturirali z dietil etrom (2 × 10 mL) in tudi tega odpareli pod znižanim tlakom. Preostanek smo raztopili v 1 mL DMF in ga ohladili na ledeni

kopeli. Potem smo dodali: 155  $\mu$ L trietilamina (1,115 mmol, 5,0 ekv.), 86 mg spojine 5 (0,245 mmol, 1,1 ekv.), 47 mg EDC $\times$ HCl (0,245 mmol, 1,1 ekv), 33 mg HOBt (0,245 mmol, 1,1 ekv.) in katalitično količino DMAP. Odstranili smo ledeno kopel in pustili mešati 24 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo reakcijski zmesi dodali 40 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3  $\times$  10 mL), destilirano vodo (1  $\times$  10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (1  $\times$  10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1  $\times$  10 mL). Ker smo nekaj spojine izgubili v alkalni vodni fazi, smo le-to nakisali in ekstrahirali z etilacetatom (2  $\times$  10 mL). Združene organske faze smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, prefiltrirali in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Dobljen produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo. Za mobilno fazo smo uporabili DKM:metanol v razmerju 20:1. Dobili smo 17 mg spojine 32.

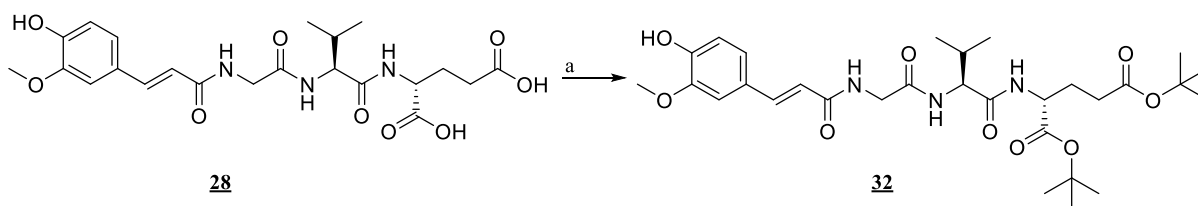
### **Strategija I (2):**

- a) 1M HCl/AcOH, EtOAc
- b) spojina 5, EDC $\times$ HCl, HOBt, trietilamin, DMAP, DMF

V prvo bučko smo natehtali 55 mg spojine 14 (0,153 mmol), jo raztopili v 2 mL etilacetata in ohladili na ledeni kopeli. Nato smo po kapljicah dodali 2 mL 1M HCl/AcOH. Odstranili smo ledeno kopel in reakcijsko zmes pustili mešati 2 uri pri sobni temperaturi. Medtem smo v drugo bučko natehtali 64 mg spojine 5 (0,184 mmol, 1,2 ekv.) in jo raztopili v 1 mL DMF. Raztopini smo dodali 35 mg EDC $\times$ HCl (0,184 mmol, 1,2 ekv.) in 25 mg HOBt (0,184 mmol, 1,2 ekv.) ter jo pustili mešati pri sobni temperaturi 1 uro.

Po 2 urah smo v prvo bučko dodali 30 mL etilacetata in ga spirali z 1M NaOH (3  $\times$  10 mL). Organsko fazo smo nato sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo raztopili 0,5 mL DMF in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Dodali smo 106  $\mu$ L trietilamina (0,765 mmol, 5,0 ekv.), vsebino druge bučke in katalitično količino DMAP. Odstranili smo ledeno kopel in pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 24 urah smo v bučko dodali 40 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3  $\times$  10 mL), destilirano vodo (2  $\times$  10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2  $\times$  10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1  $\times$  10 mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobljen surov produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo. Za mobilno fazo smo uporabili DKM:metanol v razmerju 20:1. Dobili smo 27 mg spojine 32.

## Strategija II:



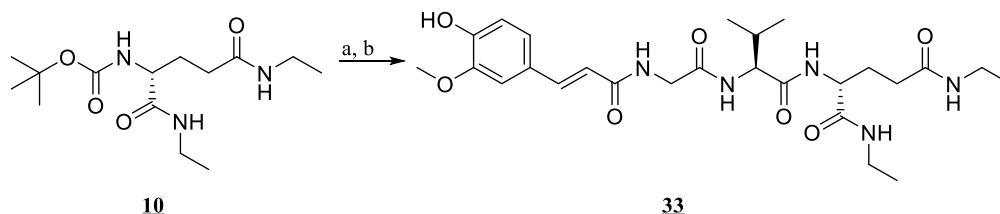
a) *tert*-butil 2,2,2-trikloroacetamidat,  $\text{BF}_3 \times \text{Et}_2\text{O}$ , THF, cikloheksan

Spojino **28** (87 mg, 0,181 mmol) smo natehtali v prvo bučko in jo raztopili v 3 mL THF. V drugo bučko smo natehtali 158 mg *tert*-butil 2,2,2-trikloroacetamidata (0,724 mmol, 4,00 ekv.), ga raztopili v 3 mL cikloheksana in ga prenesli v prvo bučko. V reakcijsko zmes smo dodali še 15  $\mu\text{L}$  borovega trifluorida dietil eterata (0,119 mmol, 0,66 ekv.) in pustili mešati 24 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo v bučko dodali žličko  $\text{NaHCO}_3$ , odfiltrirali oborino in jo spirali s THF. Nato smo odpareli topilo pod znižanim tlakom, suh preostanek raztopili v 20 mL etilacetata ter ga sprali z nasičeno raztopino  $\text{NaHCO}_3$  (2  $\times$  10 mL). Organsko fazo smo posušili z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobljen surov produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo. Za mobilno fazo smo uporabili DKM:metanol v razmerju 20:1. Dobili smo 28 mg spojine **32**.

Spojina <b>32</b>	di- <i>tert</i> -butil (( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil-D-glutamat
Mr (izračunana)	591,70
Elementna sestava	$\text{C}_{30}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_9$
Izkoristek reakcije	A) 12,88 % B) 29,67 % C) 26,17 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,56 (orositveni reagent: ninhidrin)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, MeOD)	$\delta$ [ppm]= 0.93 (t, 6H, $J = 7.2$ Hz, 2 $\times$ $\text{CH}_3$ -Val), 1.38 (s, 9H, $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.42 (s, 9H, $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.81 – 1.94 (m, 1H, $\text{CH}_{2\text{A}}$ - $\beta$ -Glu), 2.00 – 2.15 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{B}}$ - $\beta$ -Glu, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.26 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, $\text{CH}_2$ - $\gamma$ -Glu), 3.85 (s, 3H, $\text{OCH}_3$ ), 3.91 – 4.02 (m, 2H, $\text{NHCH}_2$ ), 4.25 – 4.29 (m, 2H, $\text{CH}$ - $\alpha$ -Glu, $\text{CH}$ - $\alpha$ -Val), 6.46 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, $\text{CH}=\text{CHCO}$ ), 6.76 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, $\text{H}$ -Ar), 7.01 (dd, 1H, $J = 8.4$ Hz, $J = 2.0$ Hz, $\text{H}$ -Ar), 7.11 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz, $\text{H}$ -Ar), 7.44 (d, 1H, $J = 15.6$ , $\text{CH}=\text{CHCO}$ )
MS (ESI)	$m/z$ : 590,3 (M-H) <sup>-</sup>
HR-MS	590,3062 (izračunana: 590,3078) za $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{O}_9$
HPLC (254 nm)	100,00 % ( $t_R = 13,71$ min)
IR	3742, 2980, 2360, 1734, 1522, 1466, 1370, 1335, 1281, 1212, 1152, 923, 842 $\text{cm}^{-1}$
<sup>13</sup> C NMR (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	$\delta$ [ppm]= 27.32, 27.96, 28.01, 28.10, 38.61, 52.43, 58.47, 80.92, 110.20, 114.70, 117.24, 122.49, 127.17, 138.75, 144.20, 144.83, 146.93, 147.17, 165.00, 166.75, 170.71, 171.23, 172.28, 173.12

T <sub>tališča</sub>	65-70 °C
Izgled	oranžna amorfna snov

#### 4.4.5 Sinteza (R)- N<sup>l</sup>, N<sup>5</sup>-dietil-2-((S)-2-(2-((E)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)pentan-1,5-diamida (**33**)



- 1M HCl/AcOH, EtOAc
- spojina **5**, EDC×HCl, HOBt, trietilamin, DMAP, DMF

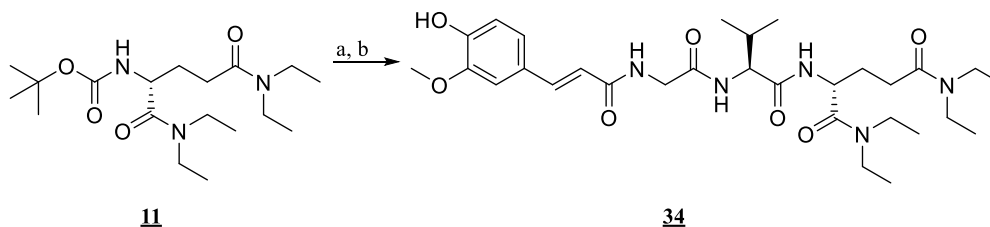
V prvo bučko smo natehtali 108 mg spojine **10** (0,326 mmol), jo raztopili v 2 mL etilacetata in ohladili na ledeni kopeli. Nato smo po kapljicah dodali 2 mL 1M HCl/AcOH. Odstranili smo ledeno kopel in reakcijsko zmes pustili mešati 2 uri pri sobni temperaturi. Medtem smo v drugo bučko natehtali 139 mg spojine **5** (0,391 mmol, 1,2 ekv.) in jo raztopili v 1 mL DMF. Raztopini smo dodali 76 mg EDC×HCl (0,391 mmol, 1,2 ekv.) in 53 mg HOBt (0,391 mmol, 1,2 ekv.) ter jo pustili mešati pri sobni temperaturi 1 uro.

Po 2 urah smo zaznali konec reakcije in iz prve bučke pod znižanim tlakom odpareli topilo. Suh preostanek smo prelili z dietil etrom (2 × 10 mL) ter ga odpareli pod znižanim tlakom. Preostanek smo raztopili v 0,5 mL DMF in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Dodali smo 250 µL trietilamina (1,630 mmol, 5,0 ekv.), vsebino druge bučke in katalitično količino DMAP. Odstranili smo ledeno kopel in pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 24 urah smo reakcijski zmesi dodali 40 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3 × 10 mL), destilirano vodo (2 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 99 mg spojine **33**.

Spojina <b>33</b>	(R)- N <sup>l</sup> , N <sup>5</sup> -dietil-2-((S)-2-(2-((E)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)pentan-1,5-diamid
Mr (izračunana)	533,63
Elementna sestava	C <sub>26</sub> H <sub>39</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>
Izkoristek reakcije	57,08 %
R <sub>f</sub> (DKM/MeOH 9:1)	0,56 (orositveni reagent: ninhidrin)
<sup>1</sup> H-NMR	δ[ppm]= 0.96 – 0.98 (m, 6H, 2 × CH <sub>3</sub> -Val), 1.00 – 1.19 (m, 6H,

(400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	2 × CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , 1.60 – 1.83 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -β-Glu), 1.86 – 2.18 (m, 3H, CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), CH <sub>2</sub> -γ-Glu), 3.02 – 3.07 (m, 4H, 2 × CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 3.80 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 3.82 – 3.92 (m, 2H, NHCH <sub>2</sub> ), 4.05 – 4.28 (m, 2H, CH-α-Glu, CH-α-Val), 6.57 (d, 1H, <i>J</i> = 15.6 Hz, CH=CHCO), 6.79 (d, 1H, <i>J</i> = 8.0 Hz, H-Ar), 7.00 (dd, 1H, <i>J</i> = 8.0 Hz, <i>J</i> = 1.6 Hz, H-Ar), 7.14 (d, 1H, <i>J</i> = 1.6 Hz, H-Ar), 7.33 (d, 1H, <i>J</i> = 16.0, CH=CHCO), 7.75 – 7.90 (m, 2H, 2 × NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 8.00 – 8.03 (m, 1H, NH), 8.13 – 8.40 (m, 2H, NH, NHCH <sub>2</sub> ), 9.45 (s, 1H, OH)
MS (ESI)	m/z: 534,3 (M+H) <sup>+</sup>
HR-MS	534,2986 (izračunana: 534,2990) za C <sub>26</sub> H <sub>40</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>
HPLC (254 nm)	94,30 % (t <sub>R</sub> = 5,17 min)
IR	3282, 2969, 2360, 1730, 1644, 1514, 1456, 1373, 1262, 1205, 1155, 1125, 1031, 978, 843, 816 cm <sup>-1</sup>
<sup>13</sup> C NMR (100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ[ppm]= 14.69, 21.90, 24.43, 26.69, 27.60, 27.69, 29.96, 31.40, 33.28, 46.64, 55.47, 84.11, 107.07, 107.63, 110.81, 115.61, 118.57, 125.45, 126.67, 147.77, 148.30, 159.44, 160.10, 160.85, 166.32, 169.41, 169.48, 169.51, 171.05
T <sub>tališča</sub>	81-85 °C
Izgled	oranžna amorfna snov

#### 4.4.6 Sinteza (*R*)- *N*<sup>1</sup>, *N*<sup>1</sup>, *N*<sup>5</sup>, *N*<sup>5</sup>-tetraetil-2-((*S*)-2-(2-((*E*)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)pentan-1,5-diamida (**34**)



- 1M HCl/AcOH, EtOAc
- spojina **5**, EDC×HCl, HOBt, trietilamin, DMAP, DMF

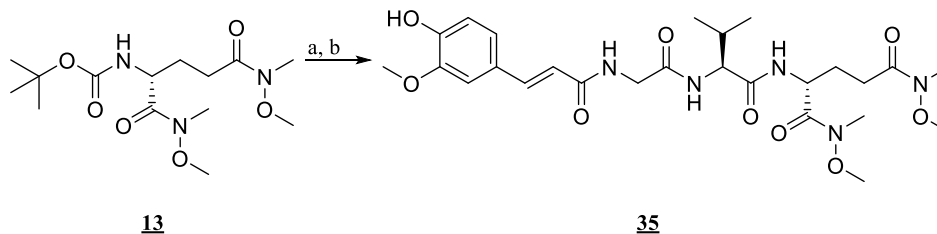
V prvo bučko smo natehtali 98 mg spojine **11** (0,274 mmol), jo raztopili v 3 mL etilacetata in ohladili na ledeni kopeli. Nato smo po kapljicah dodali 2 mL 1M HCl/AcOH. Odstranili smo ledeno kopel in reakcijsko zmes pustili mešati 3 ure pri sobni temperaturi. Medtem smo v drugo bučko natehtali 115 mg spojine **5** (0,329 mmol, 1,2 ekv.) in jo raztopili v 1,5 mL DMF. Raztopini smo dodali 63 mg EDC×HCl (0,329 mmol, 1,2 ekv.) in 45 mg HOBt (0,329 mmol, 1,2 ekv.) ter jo pustili mešati pri sobni temperaturi 1 uro.

Po 3 urah smo v prvo bučko dodali 30 mL etilacetata in ga spirali z 1M NaOH (2 × 10 mL). Organsko fazo smo nato sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in topilo odstranili pod znižanim

tlakom. Suh preostanek smo raztopili v kapljici DMF in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Dodali smo 191  $\mu\text{L}$  trietilamina (1,370 mmol, 5,0 ekv.), vsebino druge bučke in katalitično količino DMAP. Odstranili smo ledeno kopel in pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 24 urah smo reakcijski zmesi dodali 40 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl ( $3 \times 10$  mL), destilirano vodo ( $2 \times 10$  mL), nasičeno raztopino  $\text{NaHCO}_3$  ( $2 \times 10$  mL) in nasičeno raztopino NaCl ( $1 \times 10$  mL). Organsko fazo smo sušili z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 45 mg spojine **34**.

Spojina <b>34</b>	( <i>R</i> )- <i>N</i> <sup>1</sup> , <i>N</i> <sup>1</sup> , <i>N</i> <sup>5</sup> , <i>N</i> <sup>5</sup> -tetraetil-2-(( <i>S</i> )-2-(2-(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)pentan-1,5-diamid
Mr (izračunana)	589,73
Elementna sestava	$\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{N}_5\text{O}_7$
Izkoristek reakcije	27,78 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,52 (orositveni reagent: ninhidrin)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	$\delta$ [ppm]= 0.95 – 1.39 (m, 19H, $2 \times \text{CH}_3$ -Val, $4 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$ , $\text{CH}_{2\text{A}}-\beta$ -Glu), 1.59 – 1.73 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{B}}-\beta$ -Glu, $\text{CH}(\text{CH}_2)_3$ ), 2.23 – 2.33 (m, 2H, $\text{CH}_2-\gamma$ -Glu), 3.17 – 3.26 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.73 – 4.00 (m, 11H, $\text{OCH}_3$ , $\text{NHCH}_2$ , $3 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 4.18 – 4.33 (m, 1H, $\text{CH}-\alpha$ ), 4.49 – 4.53 (m, 1H, $\text{CH}-\alpha$ ), 6.59 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, $\text{CH}=\text{CHCO}$ ), 6.75 – 6.86 (m, 3H, $3 \times \text{H-Ar}$ ), 6.99 – 7.02 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CHCO}$ ), 8.26 – 8.33 (m, 2H, $2 \times \text{NH}$ ), 8.39 – 8.44 (m, 1H, $\text{NHCH}_2$ ), 9.45 (s, 1H, $\text{OH}$ )
MS (ESI)	$m/z$ : 590,4 ( $\text{M}+\text{H}$ ) <sup>+</sup>
HR-MS	590,3549 (izračunana: 590,3554) za $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{N}_5\text{O}_7$
IR	3284, 2972, 2360, 1636, 1514, 1460, 1371, 1261, 1202, 1155, 1126, 1031, 980, 846 $\text{cm}^{-1}$
<sup>13</sup> C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	$\delta$ [ppm]= 12.91, 14.07, 17.80, 18.90, 30.06, 30.34, 51.70, 55.47, 55.75, 110.84, 115.62, 126.32, 139.80, 148.03, 151.10, 157.62, 164.12, 169.50, 172.44
Tališča	96-102 °C
Izgled	rjava amorfna snov

#### 4.4.7 Sinteza (*R*)-2-((*S*)-2-(2-((*E*)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido) acetamido)-3-metilbutanamido)-*N*<sup>1</sup>, *N*<sup>5</sup>-dimetoksi-*N*<sup>1</sup>, *N*<sup>5</sup>-dimetilpentan-1,5-diamida (**35**)



- a) 1M HCl/AcOH, EtOAc
- b) spojina **5**, EDC $\times$ HCl, HOBt, trietilamin, DMAP, DMF

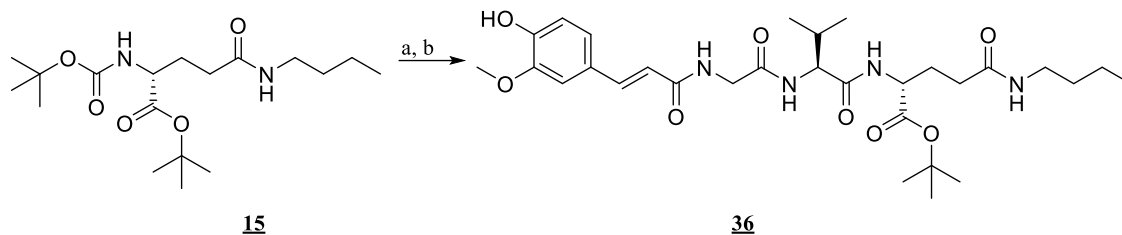
V prvo bučko smo natehtali 83 mg spojine **13** (0,249 mmol), jo raztopili v 4 mL etilacetata in ohladili na ledeni kopeli. Nato smo po kapljicah dodali 1,5 mL 1M HCl/AcOH. Odstranili smo ledeno kopel in reakcijsko zmes pustili mešati 3 ure pri sobni temperaturi. Medtem smo v drugo bučko natehtali 105 mg spojine **5** (0,299 mmol, 1,2 ekv.) in jo raztopili v 1 mL DMF. Raztopini smo dodali 57 mg EDC×HCl (0,299 mmol, 1,2 ekv.) in 40 mg HOBt (0,299 mmol, 1,2 ekv.) ter jo pustili mešati pri sobni temperaturi 1 uro.

Po 3 urah smo zaznali konec reakcije in iz prve bučke pod znižanim tlakom odpareli topilo. Suh preostanek smo prelili z dietil etrom (2 × 10 mL) ter ga odpareli pod znižanim tlakom. Preostanek smo raztopili v 0,5 mL DMF in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Dodali smo 173 µL trietilamina (1,245 mmol, 5,0 ekv.), vsebino druge bučke in katalitično količino DMAP. Odstranili smo ledeno kopel in pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 72 urah smo reakcijski zmesi dodali 40 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3 × 10 mL), destilirano vodo (2 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 40 mg spojine **35**.

Spojina <b>35</b>	(R)-2-((S)-2-(2-((E)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)-N <sup>1</sup> , N <sup>5</sup> -dimetoksi-N <sup>1</sup> , N <sup>5</sup> -dimetilpentan-1,5-diamid
Mr (izračunana)	565,62
Elementna sestava	C <sub>26</sub> H <sub>39</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub>
Izkoristek reakcije	28,37 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,60 (orositveni reagent: ninhidrin)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ[ppm]= 0.90 – 0.92 (m, 6H, 2 × CH <sub>3</sub> -Val), 1.70 – 1.75 (m, 1H, CH <sub>2A</sub> -β-Glu), 1.92 – 2.19 (m, 2H, CH <sub>2B</sub> -β-Glu, CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 2.46 – 2.58 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -γ-Glu), 3.07 – 3.19 (m, 6H, 2 × NCH <sub>3</sub> ), 3.58 – 3.83 (m, 8H, 2 × OCH <sub>3</sub> , CH-α-Glu, CH-α-Val), 3.85 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 3.93 – 4.05 (m, 2H, NHCH <sub>2</sub> ), 6.47 (d, 1H, J = 16.0 Hz, CH=CHCO), 6.76 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H-Ar), 7.01 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H-Ar), 7.10 (d, 1H, J = 2.0 Hz, H-Ar), 7.44 (d, 1H, J = 15.6 Hz, CH=CHCO),
MS (ESI)	m/z: 566,3 (M+H) <sup>+</sup>
HR-MS	566,2829 (izračunana: 566,2826) za C <sub>26</sub> H <sub>40</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub>
HPLC (254 nm)	100,00 % (t <sub>R</sub> = 3,94 min)
IR	3286, 2968, 2360, 1733, 1644, 1514, 1458, 1374, 1266, 1205, 1158, 1126, 1031, 983, 816 cm <sup>-1</sup>
<sup>13</sup> C NMR (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ[ppm]= 17.80, 19.01, 24.95, 25.61, 28.36, 31.17, 32.12, 32.16, 43.50, 52.28, 55.93, 57.40, 58.25, 61.19, 61.66, 109.68, 114.82, 117.28, 122.47, 127.12, 141.87, 146.83, 147.66, 166.79, 169.30, 170.41, 172.15, 172.30, 173.82, 173.95
T <sub>tališča</sub>	57-65 °C
Izgled	rumeno-oranžna amorfna snov



**4.4.8 Sinteza *tert*-butil *N*<sup>5</sup>-butil-*N*<sup>2</sup>-((*E*)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil-D-glutaminata (**36**)**



- a) TFA/diklorometan (1:8)  
 b) spojina **5**, EDC×HCl, HOBt, trietilamin, DMAP, DMF

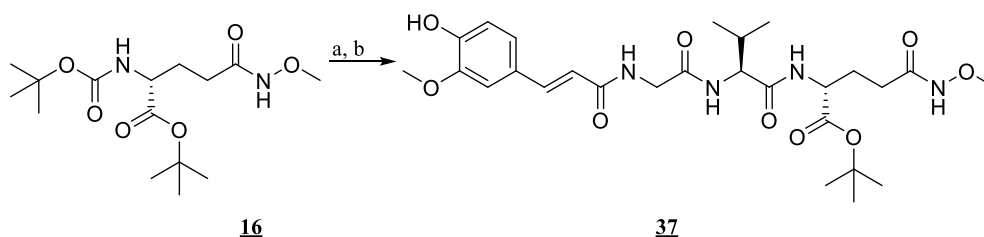
V prvo bučko smo natehtali 45 mg spojine **15** (0,126 mmol), jo raztopili v 2,5 mL diklorometana in ohladili na ledeni kopeli. Nato smo po kapljicah dodali 0,3 mL trifluoroocetne kisline. Ledeno kopel smo odstranili in reakcijsko zmes pustili mešati 2 uri pri sobni temperaturi. Medtem smo v drugo bučko natehtali 53 mg spojine **5** (0,151 mmol, 1,2 ekv.) in jo raztopili v 1 mL DMF. Raztopini smo dodali 29 mg EDC×HCl (0,151 mmol, 1,2 ekv.) in 20 mg HOBt (0,151 mmol, 1,2 ekv.) ter jo pustili mešati pri sobni temperaturi 1 uro.

Po 2 urah smo zaznali konec reakcije in iz prve bučke pod znižanim tlakom odpareli topilo. Suh preostanek smo prelili z dietil etrom (2 × 10 mL) ter ga odpareli pod znižanim tlakom. Preostanek smo raztopili v 0,5 mL DMF in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Dodali smo 88 µL trietilamina (0,630 mmol, 5,0 ekv.), vsebino druge bučke in katalitično količino DMAP. Odstranili smo ledeno kopel in pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 90 urah smo reakcijski zmesi dodali 40 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3 × 10 mL), destilirano vodo (2 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 35 mg spojine **36**.

Spojina <b>36</b>	<i>tert</i> -butil <i>N</i> <sup>5</sup> -butil- <i>N</i> <sup>2</sup> -(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil-D-glutaminat
Mr (izračunana)	590,72
Elementna sestava	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub>
Izkoristek reakcije	47,30 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,58 (orositveni reagent: ninhidrin)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ[ppm]= 0.82 – 0.97 (m, 9H, 2 × CH <sub>3</sub> -Val, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.20 – 1.33 (m, 3H, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 1.41 (s, 9H, O(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.79 – 1.94 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -β-Glu), 2.03 – 2.22 (m, 4H, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> -γ-Glu), 3.00 – 3.15 (m, 2H,

	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 3.85 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 3.89 – 4.09 (m, 2H, NHCH <sub>2</sub> CO), 4.14 - 4.24 (m, 2H, CH- $\alpha$ -Val, CH- $\alpha$ -Glu), 6.46 (d, 1H, <i>J</i> = 15.6 Hz, CH=CHCO), 6.76 (d, 1H, <i>J</i> = 8.0 Hz, H-Ar), 7.00 (d, 1H, <i>J</i> = 8.0 Hz, H-Ar), 7.10 (s, 1H, H-Ar), 7.42 (d, 1H, <i>J</i> = 15.6 Hz, CH=CHCO)
MS (ESI)	m/z: 591,3 (M+H) <sup>+</sup>
HR-MS	591,3403 (izračunana: 591,3394) za C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub>
HPLC (254 nm)	96,12 % (t <sub>R</sub> = 8,89 min)
IR	3290, 2962, 2360, 1733, 1645, 1515, 1458, 1371, 1256, 1213, 1155, 1032, 978, 844, 814 cm <sup>-1</sup>
<sup>13</sup> C NMR (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	$\delta$ [ppm]= 13.77, 17.64, 19.43, 20.12, 27.96, 30.43, 31.52, 31.58, 32.63, 39.49, 43.81, 52.65, 55.93, 58.95, 82.22, 110.02, 114.91, 117.25, 122.29, 127.02, 141.72, 142.02, 146.92, 147.79, 167.11, 167.32, 169.98, 171.03, 171.41, 172.41, 172.46
T <sub>tališča</sub>	68-72 °C
Izgled	rumena amorfna snov

#### 4.4.9 Sinteza *tert*-butil *N*<sup>2</sup>-((*E*)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil-*N*<sup>5</sup>-metoksi-D-glutaminata (**37**)



- a) 1M HCl/AcOH, EtOAc  
b) spojina **5**, EDC×HCl, HOBt, trietilamin, DMAP, DMF

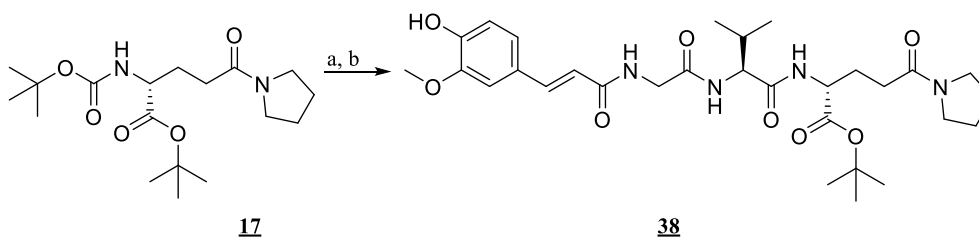
V prvo bučko smo natehtali 62 mg spojine **16** (0,187 mmol), jo raztopili v 4 mL etilacetata in ohladili na ledeni kopeli. Nato smo po kapljicah dodali 1,5 ml 1M HCl/AcOH. Odstranili smo ledeno kopel in reakcijsko zmes pustili mešati 3 ure pri sobni temperaturi. Medtem smo v drugo bučko natehtali 79 mg spojine **5** (0,224 mmol, 1,2 ekv.) in jo raztopili v 1 mL DMF. Raztopini smo dodali 43 mg EDC×HCl (0,224 mmol, 1,2 ekv.) in 30 mg HOBt (0,224 mmol, 1,2 ekv.) ter jo pustili mešati pri sobni temperaturi 1 uro.

Po 3 urah smo zaznali konec reakcije in iz prve bučke odpareli topilo pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo prelili z dietil etrom (2 × 10 mL) in ga odpareli pod znižanim tlakom. Preostanek smo raztopili v 0,5 mL DMF in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Dodali smo 130  $\mu$ L trietilamina (0,935 mmol, 5,0 ekv.), vsebino druge bučke in katalitično količino DMAP. Odstranili smo ledeno kopel in pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 72 urah smo reakcijski zmesi dodali 40 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3 × 10

mL), destilirano vodo (2 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo, kjer smo za mobilno fazo uporabili diklorometan:metanol v razmerju 30:1. Dobili smo 12 mg spojine **37**.

Spojina <b>37</b>	<i>tert</i> -butil <i>N</i> <sup>2</sup> -(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil- <i>N</i> <sup>5</sup> -metoksi-D-glutaminat
Mr (izračunana)	564,64
Elementna sestava	C <sub>27</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub>
Izkoristek reakcije	11.32 %
Rf (DKM/MeOH 30:1)	0,18 (orositveni reagent: ninhidrin)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ[ppm]= 0.90 – 0.92 (m, 6H, 2 × CH <sub>3</sub> -Val), 1.44 (s, 9H, O(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.76 – 1.88 (m, 1H, CH <sub>2A</sub> -β-Glu), 2.02 – 2.15 (m, 2H, CH <sub>2B</sub> -β-Glu, CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 2.20 – 2.45 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -γ-Glu), 3.68 (s, 3H, Ar-OCH <sub>3</sub> ), 3.85 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 3.93 – 4.05 (m, 2H, NHCH <sub>2</sub> ), 4.09 – 4.13 (m, 1H, CH-α), 4.33 – 4.34 (m, 1H, CH-α), 6.47 (d, 1H, <i>J</i> = 15.6 Hz, CH=CHCO), 6.76 (d, 1H, <i>J</i> = 8.0 Hz, H-Ar), 7.01 (dd, 1H, <i>J</i> = 8.0 Hz, <i>J</i> = 1.6 Hz, H-Ar), 7.11 (d, 1H, <i>J</i> = 2.0 Hz, H-Ar), 7.44 (d, 1H, <i>J</i> = 15.6 Hz, CH=CHCO)
MS (ESI)	m/z: 563,3 (M-H) <sup>-</sup>
HR-MS	563,2722 (izračunana: 563,2717) za C <sub>27</sub> H <sub>39</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub>
HPLC (254 nm)	94,27 % (t <sub>R</sub> = 3,95 min)
<sup>13</sup> C NMR (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ[ppm]= 17.75, 19.00, 24.88, 27.98, 28.29, 29.32, 31.19, 43.49, 52.30, 55.96, 57.32, 82.51, 109.51, 114.18, 114.74, 117.21, 122.54, 124.23, 127.12, 141.98, 146.74, 161.17, 166.65, 167.42, 169.08, 172.20
Izgled	oranžno-rumena viskozna tekočina

#### 4.4.10 Sinteza *tert*-butil (*R*)-2-((*S*)-2-(2-((*E*)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)-5-okso-5-(pirolidin-1-il)pentanoata (**38**)



- a) 1M HCl/AcOH, EtOAc
- b) spojina **5**, EDC×HCl, HOBt, trietilamin, DMAP, DMF

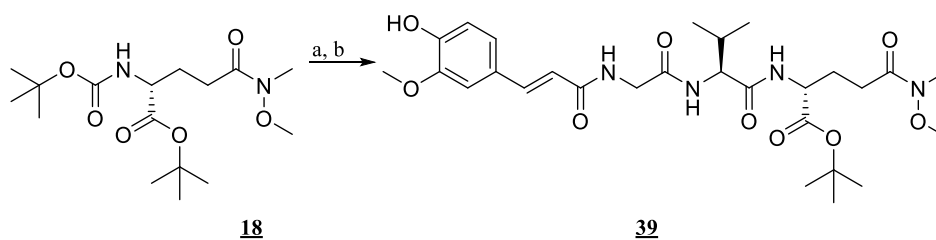
V prvo bučko smo natehtali 70 mg spojine **17** (0,196 mmol), jo raztopili v 4 mL etilacetata in ohladili na ledeni kopeli. Nato smo po kapljicah postopoma dodali 2,5 mL 1M HCl/AcOH. Odstranili smo ledeno kopel in reakcijsko zmes pustili mešati 3 ure pri sobni

temperaturi. Medtem smo v drugo bučko natehtali 82 mg spojine 5 (0,235 mmol, 1,2 ekv.) in jo raztopili v 1 mL DMF. Raztopini smo dodali 45 mg EDC×HCl (0,235 mmol, 1,2 ekv.) in 32 mg HOBt (0,235 mmol, 1,2 ekv.) ter jo pustili mešati pri sobni temperaturi 1 uro.

Po 3 urah smo zaznali konec reakcije in iz prve bučke odpareli topilo pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo prelili z dietil etrom (2 × 10 mL) in ga odpareli pod znižanim tlakom. Preostanek smo raztopili v 0,5 mL DMF in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Dodali smo 136 µL trietilamina (0,980 mmol, 5,0 ekv.), vsebino druge bučke in katalitično količino DMAP. Odstranili smo ledeno kopel in pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 24 urah smo reakcijski zmesi dodali 40 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3 × 10 mL), destilirano vodo (2 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 65 mg spojine 38.

Spojina <u>38</u>	<i>tert</i> -butil ( <i>R</i> )-2-(( <i>S</i> )-2-(2-(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)-5-okso-5-(pirolidin-1-il)pentanoat
Mr (izračunana)	588,70
Elementna sestava	C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub>
Izkoristek reakcije	56,52 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,52 (orositveni reagent: ninhidrin)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ[ppm]= 0.89 – 0.97 (m, 6H, 2 × CH <sub>3</sub> -Val), 1.37 – 1.44 (m, 9H, OC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.68 - 2.21 (m, 7H, 2 × CH <sub>2</sub> -pirolidin, CH <sub>2</sub> -β-Glu, CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 2.25 – 2.43 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -γ-Glu), 3.31 – 3.43 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -pirolidin), 3.65 – 3.83 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -pirolidin), 3.84 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 3.90 – 4.09 (m, 2H, NHCH <sub>2</sub> ), 4.16 – 4.42 (m, 2H, 2 × CH-α), 6.46 (d, 1H, <i>J</i> = 15.6 Hz, CH=CHCO), 6.76 (d, 1H, <i>J</i> = 8.0 Hz, H-Ar), 7.00 (d, 1H, <i>J</i> = 8.0 Hz, H-Ar), 7.10 (s, 1H, H-Ar), 7.44 (d, 1H, <i>J</i> = 16.0 Hz, CH=CHCO)
MS (ESI)	m/z: 587,3 (M-H) <sup>-</sup>
HR-MS	587,3088 (izračunana: 587,3081) za C <sub>30</sub> H <sub>43</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub>
IR	3281, 2971, 2360, 1730, 1620, 1515, 1454, 1370, 1252, 1207, 1153, 1032, 977, 917, 844, 728 cm <sup>-1</sup>
<sup>13</sup> C NMR (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ[ppm]= 18.02, 19.33, 19.37, 24.37, 26.09, 28.08, 31.22, 43.49, 46.01, 46.12, 46.74, 46.77, 46.84, 53.39, 53.52, 56.00, 56.02, 58.44, 58.47, 80.92, 82.00, 110.12, 110.21, 114.94, 115.04, 115.10, 117.60, 117.66, 122.22, 122.29, 127.19, 127.28, 141.70, 146.98, 147.07, 147.81, 167.03, 167.08, 169.80, 171.08, 171.17, 172.27 *podvajanje signalov je posledica zmesi diastereomerov
T <sub>tališča</sub>	79-84 °C
Izgled	rumena amorfna snov

**4.4.11 Sinteza *tert*-butil  $N^2$ -((*E*)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil- $N^5$ -metoksi- $N^5$ -metil-D-glutaminata (**39**)**



- a) 1M HCl/AcOH, EtOAc  
b) spojina **5**, EDC×HCl, HOBt, trietilamin, DMAP, DMF

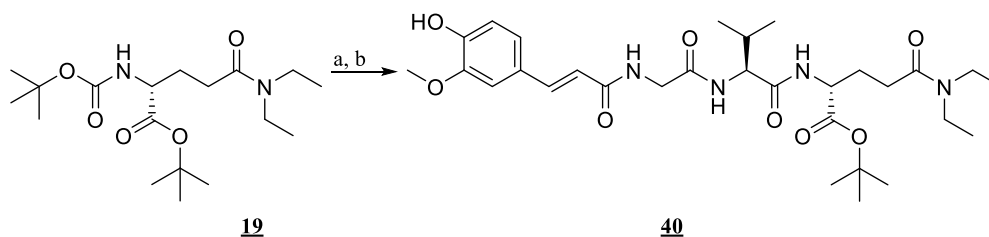
V prvo bučko smo natehtali 78 mg spojine **18** (0,225 mmol), jo raztopili v 4 mL etilacetata in ohladili na ledeni kopeli. Nato smo po kapljicah postopoma dodali 2,5 mL 1M HCl/AcOH. Odstranili smo ledeno kopel in raztopino pustili mešati 3 ure pri sobni temperaturi. Medtem smo v drugo bučko natehtali 95 mg spojine **5** (0,270 mmol, 1,2 ekv.) in jo raztopili v 1 mL DMF. Raztopini smo dodali 52 mg EDC×HCl (0,270 mmol, 1,2 ekv.) in 36 mg HOBt (0,270 mmol, 1,2 ekv.) ter jo pustili mešati pri sobni temperaturi 1 uro.

Po 3 urah smo zaznali konec reakcije in iz prve bučke odpareli topilo pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo prelili z dietil etrom (2 × 10 mL) in ga odpareli pod znižanim tlakom. Preostanek smo raztopili v 0,5 mL DMF in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Dodali smo 157 µL trietilamina (1,125 mmol, 5,0 ekv.), vsebino druge bučke in katalitično količino DMAP. Odstranili smo ledeno kopel in pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 24 urah smo reakcijski zmesi dodali 40 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3 × 10 mL), destilirano vodo (2 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 57 mg spojine **39**.

Spojina <b>39</b>	<i>tert</i> -butil $N^2$ -(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil- $N^5$ -metoksi- $N^5$ -metil-D-glutaminat
Mr (izračunana)	578,66
Elementna sestava	C <sub>28</sub> H <sub>42</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub>
Izkoristek reakcije	43,85 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,58 (orositveni reagent: ninhidrin)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ[ppm]= 0.90 – 0.97 (m, 6H, 2 × CH <sub>3</sub> -Val), 1.41 – 1.42 (m, 9H, OC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.84 – 1.98 (m, 1H, CH <sub>2A</sub> -β-Glu), 2.01 – 2.18 (m, 2H, CH <sub>2B</sub> -β-Glu, CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 2.42 – 2.58 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -γ-Glu),

	3.07 – 3.13 (m, 3H, NCH <sub>3</sub> ), 3.57 – 3.70 (m, 3H, N-OCH <sub>3</sub> ), 3.85 (s, 3H, Ar-OCH <sub>3</sub> ), 3.90 – 4.05 (m, 2H, NHCH <sub>2</sub> ), 4.20 – 4.34 (m, 2H, 2 × CH-α), 6.46 (d, 1H, <i>J</i> = 15.6 Hz, CH=CHCO), 6.76 (d, 1H, <i>J</i> = 8.0 Hz, <u>H</u> -Ar), 7.01 (dd, 1H, <i>J</i> = 8.0 Hz, <i>J</i> = 1.6 Hz, <u>H</u> -Ar), 7.10 (d, 1H, <i>J</i> = 1.6 Hz, <u>H</u> -Ar), 7.44 (d, 1H, <i>J</i> = 15.6 Hz, CH=CHCO)
MS (ESI)	m/z: 577,3 (M-H) <sup>-</sup>
HR-MS	577,2858 (izračunana: 577,2874) za C <sub>28</sub> H <sub>41</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub>
IR	3292, 2972, 2360, 2157, 1969, 1734, 1649, 1516, 1462, 1372, 1273, 1209, 1154, 979, 925, 841, 731 cm <sup>-1</sup>
<sup>13</sup> C NMR (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ[ppm]= 15.28, 18.07, 19.16, 19.35, 26.16, 28.32, 31.14, 31.26, 32.19, 43.37, 43.57, 52.99, 53.06, 55.91, 58.37, 58.43, 61.22, 65.88, 82.03, 110.01, 114.86, 117.55, 122.22, 122.25, 127.22, 141.63, 141.82, 146.88, 147.62, 166.94, 169.40, 169.65, 170.65, 171.20, 173.44, 173.63 *podvajanje signalov je posledica zmesi diastereomerov
T <sub>tališča</sub>	60-68 °C
Izgled	rumeno-oranžna amorfna snov

#### 4.4.12 Sinteza *tert*-butil N<sup>5</sup>, N<sup>5</sup>-dietil-N<sup>2</sup>-((*E*)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil-D-glutaminata (**40**)



- a) 1M HCl/AcOH, EtOAc  
b) spojina **5**, EDC×HCl, HOBt, trietilamin, DMAP, DMF

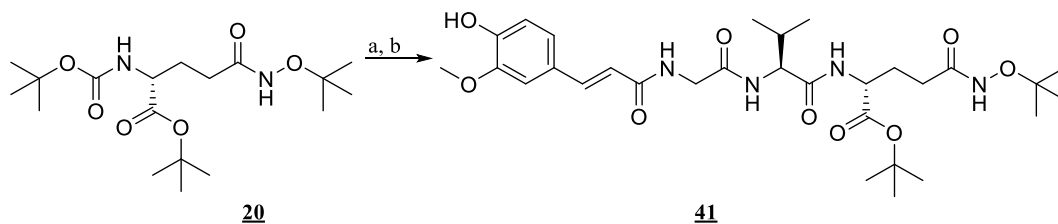
V prvo bučko smo natehtali 50 mg spojine **19** (0,140 mmol), jo raztopili v 4 mL etilacetata in ohladili na ledeni kopeli. Nato smo po kapljicah dodali 1,5 mL 1M HCl/AcOH. Odstranili smo ledeno kopel in reakcijsko zmes pustili mešati 3 ure pri sobni temperaturi. Medtem smo v drugo bučko natehtali 59 mg spojine **5** (0,168 mmol, 1,2 ekv.) in jo raztopili v 1 mL DMF. Raztopini smo dodali 32 mg EDC×HCl (0,168 mmol, 1,2 ekv.) in 23 mg HOBt (0,168 mmol, 1,2 ekv.) ter jo pustili mešati pri sobni temperaturi 1 uro.

Po 3 urah smo zaznali konec reakcije in iz prve bučke odpareli topilo pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo prelili z dietil etrom (2 × 10 mL) in ga odpareli pod znižanim tlakom. Preostanek smo raztopili v 0,5 mL DMF in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Dodali smo 97 μL trietilamina (0,700 mmol, 5,0 ekv.), vsebino druge bučke in katalitično količino

DMAP. Odstranili smo ledeno kopel in pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 24 urah smo reakcijski zmesi dodali 40 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3 × 10 mL), destilirano vodo (2 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 58 mg spojine **40**.

Spojina <b>40</b>	<i>tert</i> -butil <i>N</i> <sup>5</sup> , <i>N</i> <sup>5</sup> -dietil- <i>N</i> <sup>2</sup> -(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil-D-glutaminat
Mr (izračunana)	590,72
Elementna sestava	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub>
Izkoristek reakcije	69,88 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,51 (orositveni reagent: ninhidrin)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ[ppm]= 0.95 – 1.01 (m, 6H, 2 × CH <sub>3</sub> -Val), 1.10 – 1.15 (m, 3H, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.26 – 1.31 (m, 3H, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.45 (s, 9H, OC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.81 – 1.91 (m, 1H, CH <sub>2A</sub> -β-Glu), 1.94 – 2.03 (m, 1H, CH <sub>2B</sub> -β-Glu), 2.07 – 2.20 (m, 1H, CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 2.32 – 2.37 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -γ-Glu), 3.42 – 3.64 (m, 3H, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , CH <sub>2B</sub> CH <sub>3</sub> ), 3.82 – 3.90 (m, 1H, CH <sub>2B</sub> CH <sub>3</sub> ), 3.91 (s, 3H, Ar-OCH <sub>3</sub> ), 3.94 – 4.12 (m, 2H, NHCH <sub>2</sub> ), 4.25 – 4.41 (m, 2H, 2 × CH-α), 6.46 (dd, 1H, <i>J</i> = 15.6 Hz, <i>J</i> = 3.6 Hz, CH=CHCO), 6.82 (d, 1H, <i>J</i> = 8.0 Hz, H-Ar), 7.08 (dd, 1H, <i>J</i> = 8.0 Hz, <i>J</i> = 1.6 Hz, H-Ar), 7.17 (d, 1H, <i>J</i> = 1.6 Hz, H-Ar), 7.51 (d, 1H, <i>J</i> = 15.6 Hz, CH=CHCO)
MS (ESI)	m/z: 591,3 (M+H) <sup>+</sup>
HR-MS	591,3400 (izračunana: 591,3394) za C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub>
HPLC (254 nm)	46,13 % (t <sub>R</sub> = 9,63 min), 46,86 % (t <sub>R</sub> = 10,29 min) *zmes diastereomerov
IR	3285, 2971, 2360, 1724, 1625, 1514, 1459, 1370, 1260, 1210, 1153, 1032, 979, 843 cm <sup>-1</sup>
<sup>13</sup> C NMR (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ[ppm]= 12.92, 14.46, 14.60, 17.82, 18.04, 19.18, 19.30, 28.05, 31.00, 31.44, 31.52, 40.58, 40.61, 41.97, 43.34, 43.43, 48.09, 48.28, 55.90, 58.43, 65.88, 80.79, 109.90, 114.83, 117.69, 122.19, 122.44, 127.31, 146.80, 147.52, 166.56, 166.77, 169.34, 169.37, 169.42, 170.79, 170.83, 172.12, 172.20 *podvajanje signalov je posledica zmesi diastereomerov
T <sub>tališča</sub>	74-81 °C
Izgled	rjava amorfna snov

#### 4.4.13 Sinteza *tert*-butil *N*<sup>5</sup>-(*tert*-butoksi)-*N*<sup>2</sup>-((*E*)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil-D-glutaminata (**41**)



a) 1M HCl/AcOH, EtOAc

b) spojina **5**, EDC×HCl, HOBt, trietilamin, DMAP, DMF

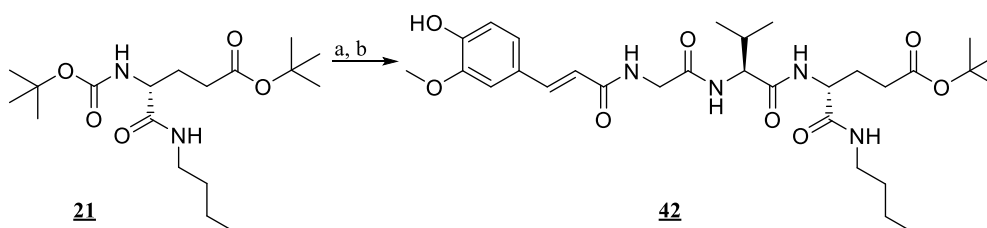
V prvo bučko smo natehtali 70 mg spojine **20** (0,187 mmol), jo raztopili v 4 mL etilacetata in ohladili na ledeni kopeli. Nato smo po kapljicah dodali 2,5 mL 1M HCl/AcOH. Odstranili smo ledeno kopel in reakcijsko zmes pustili mešati 3 ure pri sobni temperaturi. Medtem smo v drugo bučko natehtali 79 mg spojine **5** (0,224 mmol, 1,2 ekv.) in jo raztopili v 1 mL DMF. Raztopini smo dodali 43 mg EDC×HCl (0,224 mmol, 1,2 ekv.) in 30 mg HOBt (0,224 mmol, 1,2 ekv.) ter jo pustili mešati pri sobni temperaturi 1 uro.

Po 3 urah smo zaznali konec reakcije in iz prve bučke odpareli topilo pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo prelili z dietil etrom (2 × 10 mL) in ga odpareli pod znižanim tlakom. Preostanek smo raztopili v 0,5 mL DMF in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Dodali smo 130 µL trietilamina (0,935 mmol, 5,0 ekv.), vsebino druge bučke in katalitično količino DMAP. Odstranili smo ledeno kopel in pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 24 urah smo reakcijski zmesi dodali 40 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3 × 10 mL), destilirano vodo (2 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 65 mg spojine **41**.

Spojina <b>41</b>	<i>tert</i> -butil <i>N</i> <sup>5</sup> -( <i>tert</i> -butoksi)- <i>N</i> <sup>2</sup> -(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil-D-glutaminat
Mr (izračunana)	606,72
Elementna sestava	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub>
Izkoristek reakcije	57,52 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0.48 (orositveni reagent: ninhidrin)
( <sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ[ppm]= 0.91 – 0.95 (m, 6H, 2 × CH <sub>3</sub> -Val), 1.17 – 1.24 (m, 9H, NHOC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.38 – 1.41 (m, 9H, OC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.83 – 1.98 (m, 1H, CH <sub>2A</sub> -β-Glu), 2.01 – 2.13 (m, 2H, CH <sub>2B</sub> -β-Glu, CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 2.22 – 2.38 (m, 1H, CH <sub>2</sub> -γ-Glu), 3.84 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 3.91 – 4.03 (m, 2H, NHCH <sub>2</sub> ), 4.10 – 4.19 (m, 1H, CH-α), 4.24 – 4.34 (m, 1H, CH-α), 6.46 (d, 1H, <i>J</i> = 15.6 Hz, CH=CHCO), 6.75 (d, 1H, <i>J</i> = 8.4 Hz, <u>H</u> -Ar), 7.01 (dd, 1H, <i>J</i> = 8.4 Hz, <i>J</i> = 1.2 Hz, <u>H</u> -Ar), 7.10 (d, 1H, <i>J</i> = 1.6 Hz, <u>H</u> -Ar), 7.44 (d, 1H, <i>J</i> = 15.6 Hz, CH=CHCO)
MS (ESI)	m/z: 605,3 (M-H) <sup>-</sup>
HR-MS	605,3185 (izračunana: 605,3187) za C <sub>30</sub> H <sub>45</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub>
HPLC (254 nm)	50,65 % (t <sub>R</sub> = 8,60 min) in 49,35 % (t <sub>R</sub> = 8,91 min) *zmes diastereomerov
IR	3280, 2975, 2359, 1639, 1515, 1462, 1368, 1267, 1154, 1029, 982, 847 cm <sup>-1</sup>
T <sub>tališča</sub>	99-107 °C
Izgled	rumena amorfna snov



#### 4.4.14 Sinteza *tert*-butil (*R*)-5-(butilamino)-4-((*S*)-2-(2-((*E*)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)-5-oksopentanoata (**42**)



- a) TFA/diklorometan (1:8)  
 b) spojina **5**, EDC×HCl, HOBT, trietilamin, DMAP, DMF

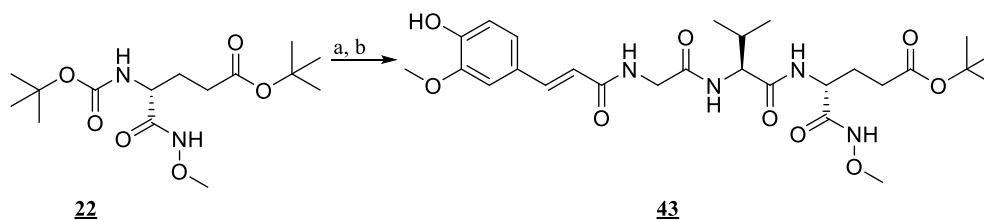
V prvo bučko smo natehtali 70 mg spojine **21** (0,195 mmol), jo raztopili v 2,5 mL diklorometana in ohladili na ledeni kopeli. Nato smo po kapljicah dodali 0,3 mL trifluoroocetne kisline. Odstranili smo ledeno kopel in reakcijsko zmes pustili mešati 2 uri pri sobni temperaturi. Medtem smo v drugo bučko natehtali 82 mg spojine **5** (0,234 mmol, 1,2 ekv.) in jo raztopili v kapljici DMF. Raztopini smo dodali 45 mg EDC×HCl (0,234 mmol, 1,2 ekv.) in 32 mg HOBT (0,234 mmol, 1,2 ekv.) ter jo pustili mešati pri sobni temperaturi 1 uro.

Po 2 urah smo zaznali konec reakcije in iz prve bučke odpareli topilo pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo prelili z dietil etrom (2 × 10 mL) in ga odpareli pod znižanim tlakom. Preostanek smo raztopili v kapljici DMF in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Dodali smo 136 µL trietilamina (0,234 mmol, 5,0 ekv.), vsebino druge bučke in katalitično količino DMAP. Odstranili smo ledeno kopel in pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 90 urah smo reakcijski zmesi dodali 40 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3 × 10 mL), destilirano vodo (2 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 23 mg spojine **42**.

Spojina <b>42</b>	<i>tert</i> -butil ( <i>R</i> )-5-(butilamino)-4-(( <i>S</i> )-2-(2-(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)-5-oksopentanoat
Mr (izračunana)	590,72
Elementna sestava	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub>
Izkoristek reakcije	20,00 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,52 (orositveni reagent: ninhidrin)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ[ppm]= 0.88 – 1.04 (m, 9H, 2 × CH <sub>3</sub> -Val, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.27 – 1.35 (m, 4H, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.44 – 1.47 (m, 9H, OC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.80 – 1.89 (m, 1H, CH <sub>2A</sub> -β-Glu), 2.00 – 2.24 (m,

	2H, $\text{CH}_{2\beta}$ - $\beta$ -Glu, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , 2.27 – 2.41 (m, 2H, $\text{CH}_{2\gamma}$ -Glu), 3.07 – 3.26 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.91 (s, 3H, $\text{OCH}_3$ ), 4.00 – 4.18 (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CO}$ ), 4.32 – 4.41 (m, 2H, $\text{CH}\text{-}\alpha$ , $\text{CH}\text{-}\alpha$ -Glu), 6.53 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, $\text{CH}=\text{CHCO}$ ), 6.82 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, $\text{H}\text{-Ar}$ ), 7.07 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, $\text{H}\text{-Ar}$ ), 7.17 (s, 1H, $\text{H}\text{-Ar}$ ), 7.51 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, $\text{CH}=\text{CHCO}$ )
MS (ESI)	m/z: 591,3 (M+H) <sup>+</sup>
HR-MS	591,3397 (izračunana: 591,3394) za $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{N}_4\text{O}_8$
HPLC (254 nm)	94,73 % ( $t_R = 10,01$ min)
IR	3286, 2969, 2360, 1726, 1643, 1515, 1458, 1371, 1266, 1210, 1153, 1034, 980, 846, 815 $\text{cm}^{-1}$
T <sub>tališča</sub>	67-73 °C
Izgled	rumena amorfna snov

#### 4.4.15 Sinteza *tert*-butil (*R*)-4-((*S*)-2-(2-((*E*)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)-5-(metoksiamino)-5-oksopentanoata (**43**)



- a) 1M HCl/AcOH, EtOAc  
b) spojina **5**, EDC×HCl, HOBt, trietilamin, DMAP, DMF

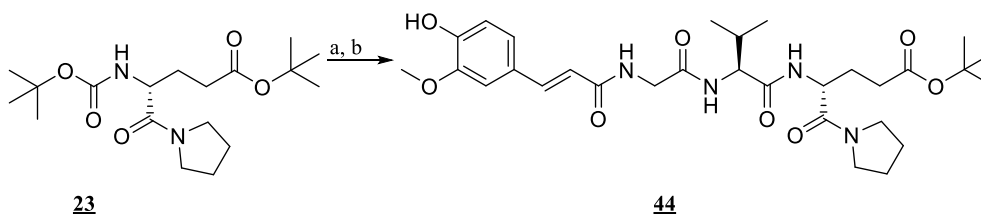
V prvo bučko smo natehtali 60 mg spojine **22** (0,181 mmol), jo raztopili v 4 mL etilacetata in ohladili na ledeni kopeli. Nato smo po kapljicah postopoma dodali 3 mL 1M HCl/AcOH. Odstranili smo ledeno kopel in reakcijsko zmes pustili mešati 3 ure pri sobni temperaturi. Medtem smo v drugo bučko natehtali 76 mg spojine **5** (0,217 mmol, 1,2 ekv.) in jo raztopili v 1 mL DMF. Raztopini smo dodali 42 mg EDC×HCl (0,217 mmol, 1,2 ekv.) in 29 mg HOBt (0,217 mmol, 1,2 ekv.) ter jo pustili mešati pri sobni temperaturi 1 uro.

Po 3 urah smo zaznali konec reakcije in iz prve bučke odpareli topilo pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo prelili z dietil etrom ( $2 \times 10$  mL) in ga odpareli pod znižanim tlakom. Preostanek smo raztopili v 0,5 mL DMF in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Dodali smo 126  $\mu\text{L}$  trietilamina (0,905 mmol, 5,0 ekv.), vsebino druge bučke in katalitično količino DMAP. Odstranili smo ledeno kopel in pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 24 urah smo reakcijski zmesi dodali 40 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl ( $3 \times 10$

mL), destilirano vodo (2 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 40 mg spojine **43**.

Spojina <b>43</b>	<i>tert</i> -butil ( <i>R</i> )-4-(( <i>S</i> )-2-(2-(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)-5-(metoksiamino)-5-okso-pentanoat
Mr (izračunana)	564,64
Elementna sestava	C <sub>27</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub>
Izkoristek reakcije	39,22 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,54 (orositveni reagent: ninhidrin)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ[ppm]= 0.90 – 0.95 (m, 6H, 2 × CH <sub>3</sub> -Val), 1.38 – 1.40 (m, 9H, OC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.80 – 1.97 (m, 1H, CH <sub>2A</sub> -β-Glu), 1.98 – 2.13 (m, 2H, CH <sub>2B</sub> -β-Glu, CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 2.20 – 2.36 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -γ-Glu), 3.61 – 3.62 (m, 3H, Ar-OCH <sub>3</sub> ), 3.84 (s, 3H, NH-OCH <sub>3</sub> ), 3.91 – 4.09 (m, 2H, NHCH <sub>2</sub> ), 4.13 – 4.34 (m, 2H, 2 × CH-α), 6.46 (d, 1H, <i>J</i> = 15.6 Hz, CH=CHCO), 6.76 (d, 1H, <i>J</i> = 8.4 Hz, H-Ar), 7.01 (dd, 1H, <i>J</i> = 8.4 Hz, <i>J</i> = 1.2 Hz, H-Ar), 7.10 (d, 1H, <i>J</i> = 1.2 Hz, H-Ar), 7.44 (d, 1H, <i>J</i> = 16.0 Hz, CH=CHCO)
MS (ESI)	m/z: 565,3 (M+H) <sup>+</sup>
HR-MS	565,2861 (izračunano: 565,2874) za C <sub>27</sub> H <sub>41</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub>
HPLC (254 nm)	47,81 % (t <sub>R</sub> = 5,72 min), 52,19 % (t <sub>R</sub> = 6,11 min) *zmes diastereomerov
IR	3278, 2972, 2359, 1646, 1514, 1461, 1371, 1265, 1209, 1153, 1033, 979, 844, 817, 729 cm <sup>-1</sup>
T <sub>tališča</sub>	82-90 °C
Izgled	belo-siva amorfna snov

#### 4.4.16 Sinteza *tert*-butil (*R*)-4-((*S*)-2-(2-((*E*)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)-5-okso-5-(pirolidin-1-il)pentanoata (**44**)



- 1M HCl/AcOH, EtOAc
- spojina **5**, EDC×HCl, HOBT, trietilamin, DMAP, DMF

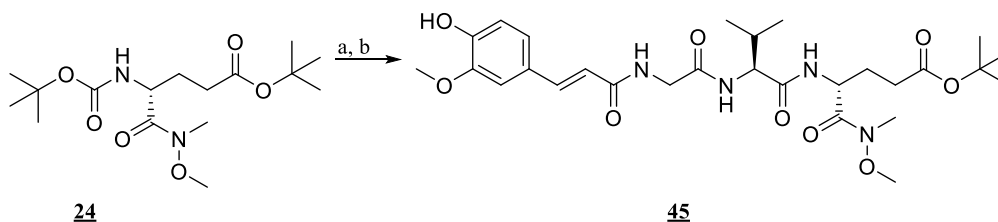
V prvo bučko smo natehtali 65 mg spojine **23** (0,182 mmol), jo raztopili v 4 mL etilacetata in ohladili na ledeni kopeli. Nato smo po kapljicah postopoma dodali 2,5 mL 1M HCl/AcOH. Odstranili smo ledeno kopel in reakcijsko zmes pustili mešati 3 ure pri sobni temperaturi. Medtem smo v drugo bučko natehtali 76 mg spojine **5** (0,218 mmol, 1,2 ekv.)

in jo raztopili v 1 mL DMF. Raztopini smo dodali 42 mg EDC×HCl (0,218 mmol, 1,2 ekv.) in 29 mg HOBt (0,218 mmol, 1,2 ekv.) ter jo pustili mešati pri sobni temperaturi 1 uro.

Po 3 urah smo zaznali konec reakcije in iz prve bučke odpareli topilo pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo prelili z dietil etrom (2 × 10 mL) in ga odpareli pod znižanim tlakom. Preostanek smo raztopili v 0,5 mL DMF in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Dodali smo 127 µL trietilamina (0,910 mmol, 5,0 ekv.), vsebino druge bučke in katalitično količino DMAP. Odstranili smo ledeno kopel in pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 24 urah smo reakcijski zmesi dodali 40 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3 × 10 mL), destilirano vodo (2 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 30 mg spojine **44**.

Spojina <b>44</b>	<i>tert</i> -butil ( <i>R</i> )-4-(( <i>S</i> )-2-(2-(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)-5-okso-5-(pirolidin-1-il)pentanoat
Mr (izračunana)	588,70
Elementna sestava	C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub>
Izkoristek reakcije	28,04 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,38 (orositveni reagent: ninhidrin)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ[ppm]= 0.89 – 0.94 (m, 6H, 2 × CH <sub>3</sub> -Val), 1.38 – 1.41 (m, 9H, OC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.79 – 1.86 (m, 3H, CH <sub>2</sub> -pirolidin, CH <sub>2A</sub> -β-Glu), 1.91 – 2.02 (m, 3H, CH <sub>2</sub> -pirolidin, CH <sub>2B</sub> -β-Glu), 2.04 – 2.14 (m, 1H, CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 2.22 – 2.34 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -γ-Glu), 3.31 – 3.44 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -pirolidin), 3.59 – 3.70 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -pirolidin), 3.84 (s, 3H, Ar-OCH <sub>3</sub> ), 3.90 – 4.06 (m, 2H, NHCH <sub>2</sub> ), 4.19 – 4.34 (m, 1H, CH-α-Val), 4.60 – 4.65 (m, 1H, CH-α-Glu), 6.47 (dd, 1H, <i>J</i> = 15.6 Hz, <i>J</i> = 2.0 Hz, CH=CHCO), 6.76 (d, 1H, <i>J</i> = 8.4 Hz, H-Ar), 7.01 (dd, 1H, <i>J</i> = 8.0 Hz, <i>J</i> = 1.6 Hz, H-Ar), 7.10 (d, 1H, <i>J</i> = 2.0 Hz, H-Ar), 7.44 (d, 1H, <i>J</i> = 15.6 Hz, CH=CHCO)
MS (ESI)	m/z: 587,3 (M-H) <sup>-</sup>
HR-MS	587,3078 (izračunana: 587,3081) za C <sub>30</sub> H <sub>43</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub>
HPLC (254 nm)	37.54 % (t <sub>R</sub> = 7,99 min) in 63.46 % (t <sub>R</sub> = 8.71 min) *zmes diastereomerov
IR	3744, 3281, 2973, 2360, 2160, 2032, 1967, 1727, 1625, 1517, 1457, 1370, 1277, 1209, 1152, 838, 727 cm <sup>-1</sup>
<sup>13</sup> C NMR (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ[ppm]= 17.88, 17.99, 19.30, 24.12, 26.01, 27.24, 28.06, 30.88, 30.92, 30.97, 31.35, 43.41, 46.21, 46.60, 50.02, 55.92, 58.13, 80.79, 109.91, 114.79, 117.80, 122.16, 127.35, 141.40, 141.58, 146.81, 147.49, 166.85, 169.42, 169.57, 169.94, 171.01, 172.09, 172.20 *podvajanje signalov je posledica zmesi diastereomerov
T <sub>tališča</sub>	72-80 °C
Izgled	rumena amorfná snov

**4.4.17 Sinteza *tert*-butil (*R*)-4-((*S*)-2-(2-((*E*)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)-5-(metoksi(metil)amino)-5-oksopentanoata (**45**)**



- a) 1M HCl/AcOH, EtOAc  
 b) spojina **5**, EDC×HCl, HOBt, trietilamin, DMAP, DMF

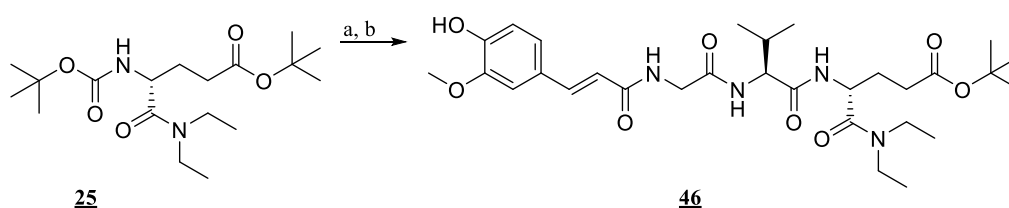
V prvo bučko smo natehtali 70 mg spojine **24** (0,201 mmol), jo raztopili v 4 mL etilacetata in ohladili na ledeni kopeli. Nato smo po kapljicah postopoma dodali 2,5 mL 1M HCl/AcOH. Odstranili smo ledeno kopel in reakcijsko zmes pustili mešati 3 ure pri sobni temperaturi. Medtem smo v drugo bučko natehtali 84 mg spojine **5** (0,241 mmol, 1,2 ekv.) in jo raztopili v 1 mL DMF. Raztopini smo dodali 46 mg EDC×HCl (0,241 mmol, 1,2 ekv.) in 33 mg HOBt (0,241 mmol, 1,2 ekv.) ter jo pustili mešati pri sobni temperaturi 1 uro.

Po 3 urah smo zaznali konec reakcije in iz prve bučke odpareli topilo pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo prelili z dietil etrom (2 × 10 mL) in ga odpareli pod znižanim tlakom. Preostanek smo raztopili v 1 mL DMF in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Dodali smo 168 µL trietilamina (1,205 mmol, 5,0 ekv.), vsebino druge bučke in katalitično količino DMAP. Odstranili smo ledeno kopel in pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 24 urah smo reakcijski zmesi dodali 40 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3 × 10 mL), destilirano vodo (2 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 40 mg spojine **45**.

Spojina <b>45</b>	<i>tert</i> -butil ( <i>R</i> )-4-(( <i>S</i> )-2-(2-(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)-5-(metoksi(metil)amino)-5-oksopentanoat
Mr (izračunana)	578,66
Elementna sestava	C <sub>28</sub> H <sub>42</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub>
Izkoristek reakcije	34,48 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,64 (orositveni reagent: ninhidrin)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ[ppm]= 0.90 – 0.95 (m, 6H, 2 × CH <sub>3</sub> -Val), 1.38 – 1.41 (m, 9H, OC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.78 – 1.89 (m, 1H, CH <sub>2A</sub> -β-Glu), 1.92 – 2.16 (m, 2H, CH <sub>2B</sub> -β-Glu, CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 2.22 – 2.36 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -γ-Glu), 3.15 (s,

	3H, NCH <sub>3</sub> ), 3.77 (s, 3H, N-OCH <sub>3</sub> ), 3.85 (s, 3H, Ar-OCH <sub>3</sub> ), 3.91 – 4.06 (m, 2H, NHCH <sub>2</sub> ), 4.22 – 4.34 (m, 2H, CH- $\alpha$ -Glu, CH- $\alpha$ -Val), 6.47 (dd, 1H, $J = 15.6$ Hz, $J = 2.8$ Hz, CH=CHCO), 6.76 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-Ar), 7.01 (dd, 1H, $J = 8.0$ Hz, $J = 1.6$ Hz, H-Ar), 7.10 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, H-Ar), 7.44 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, CH=CHCO)
MS (ESI)	m/z: 579,3 (M+H) <sup>+</sup>
HR-MS	579,3036 (izračunana: 579,3030) za C <sub>28</sub> H <sub>43</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub>
HPLC (254 nm)	46,20 % (t <sub>R</sub> = 7,70 min) in 45,78 % (t <sub>R</sub> = 8,44 min) *zmes diastereomerov
IR	3291, 2967, 2360, 1727, 1644, 1515, 1459, 1372, 1265, 1210, 1154, 1033, 981, 922, 844, 817, 728 cm <sup>-1</sup>
<sup>13</sup> C NMR (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	$\delta$ [ppm]= 15.28, 17.87, 18.13, 19.20, 19.35, 26.95, 28.05, 31.23, 32.14, 43.41, 43.46, 48.73, 48.82, 55.92, 58.28, 58.39, 61.64, 65.88, 80.77, 109.91, 109.98, 114.81, 117.62, 122.19, 122.25, 127.29, 141.61, 146.82, 147.54, 166.85, 169.38, 169.46, 171.12, 171.22, 172.08, 172.29 *podvajanje signalov je posledica zmesi diastereomerov
T tališča	69-74 °C
Izgled	oranžno-rumena amorfna snov

#### 4.4.18 Sinteza *tert*-butil (*R*)-5-(dietilamino)-4-((*S*)-2-(2-((*E*)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)-5-oksopentanoata (**46**)



a) 1M HCl/AcOH, EtOAc

b) spojina **5**, EDC×HCl, HOBt, trietilamin, DMAP, DMF

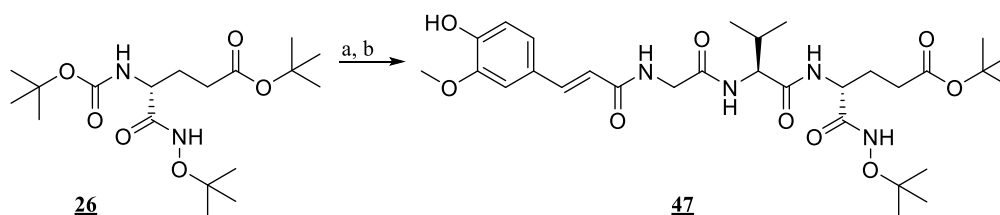
V prvo bučko smo natehtali 62 mg spojine **25** (0,173 mmol), jo raztopili v 4 mL etilacetata in ohladili na ledeni kopeli. Nato smo po kapljicah dodali 2 mL 1M HCl/AcOH. Odstranili smo ledeno kopel in reakcijsko zmes pustili mešati 2 uri pri sobni temperaturi. Medtem smo v drugo bučko natehtali 73 mg spojine **5** (0,208 mmol, 1,2 ekv.) in jo raztopili v 1 mL DMF. Raztopini smo dodali 38 mg EDC×HCl (0,208 mmol, 1,2 ekv.) in 28 mg HOBt (0,208 mmol, 1,2 ekv.) ter jo pustili mešati pri sobni temperaturi 1 uro.

Po 3 urah smo zaznali konec reakcije in iz prve bučke odpareli topilo pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo prelili z dietil etrom (2 × 10 mL) in ga odpareli pod znižanim tlakom. Preostanek smo raztopili v 1 mL DMF in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Dodali smo 120  $\mu$ L trietilamina (0,865 mmol, 5,0 ekv.), vsebino druge bučke in katalitično količino

DMAP. Odstranili smo ledeno kopel in pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 24 urah smo reakcijski zmesi dodali 40 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3 × 10 mL), destilirano vodo (2 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 35 mg spojine **46**.

Spojina <b>46</b>	<i>tert</i> -butil ( <i>R</i> )-5-(dietilamino)-4-(( <i>S</i> )-2-(2-(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)-5-oksopentanoat
Mr (izračunana)	590,72
Elementna sestava	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub>
Izkoristek reakcije	34,31 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,44 (orositveni reagent: ninhidrin)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ[ppm]= 0.95 – 1.01 (m, 6H, 2 × CH <sub>3</sub> -Val), 1.11 – 1.14 (m, 3H, NCH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ), 1.26 – 1.30 (m, 3H, NCH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ), 1.45 – 1.46 (m, 9H, OC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.80 – 1.91 (m, 1H, CH <sub>2A</sub> -β-Glu), 1.94 – 2.05 (m, 1H, CH <sub>2B</sub> -β-Glu), 2.07 – 2.26 (m, 1H, CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 2.27 – 2.44 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -γ-Glu), 3.40 – 3.66 (m, 2H, NCH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ), 3.84 – 3.97 (m, 5H, NCH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> , Ar-OCH <sub>3</sub> ), 4.00 – 4.17 (m, 2H, NHCH <sub>2</sub> ), 4.27 – 4.41 (m, 2H, CH-α-Glu, CH-α-Val), 6.53 (d, 1H, <i>J</i> = 15.6 Hz, CH=CHCO), 6.82 (d, 1H, <i>J</i> = 8.4 Hz, H-Ar), 7.07 (dd, 1H, <i>J</i> = 8.4 Hz, <i>J</i> = 2.0 Hz, H-Ar), 7.17 (d, 1H, <i>J</i> = 2.0 Hz, H-Ar), 7.51 (d, 1H, <i>J</i> = 16.0 Hz, CH=CHCO)
MS (ESI)	m/z: 589,3 (M-H) <sup>-</sup>
HR-MS	589,3239 (izračunana: 589,3237) za C <sub>30</sub> H <sub>45</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub>
HPLC (254 nm)	91,38 % (t <sub>R</sub> = 10,31 min)
IR	3741, 3285, 2970, 2360, 1726, 1624, 1514, 1461, 1371, 1260, 1208, 1153, 1031, 977, 841, 727 cm <sup>-1</sup>
<sup>13</sup> C NMR (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ[ppm]= 12.92, 14.45, 15.28, 17.79, 19.30, 28.04, 31.01, 31.39, 40.60, 40.64, 42.00, 43.34, 48.27, 55.88, 58.19, 65.88, 80.80, 109.96, 114.87, 117.69, 122.19, 127.29, 141.44, 141.54, 141.79, 146.87, 146.91, 147.55, 147.70, 166.86, 169.49, 169.53, 170.56, 170.90, 170.98, 172.13, 172.22
T <sub>tališča</sub>	84-89 °C
Izgled	rumena amorfna snov

#### 4.4.19 Sinteza *tert*-butil (*R*)-5-(*tert*-butoksiamino)-4-((*S*)-2-(2-((*E*)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)-5-oksopentanoata (**47**)



a) 1M HCl/AcOH, EtOAc

b) spojina **5**, EDC×HCl, HOBT, trietilamin, DMAP, DMF

V prvo bučko smo natehtali 84 mg spojine **26** (0,224 mmol), jo raztopili v 4 mL etilacetata in ohladili na ledeni kopeli. Nato smo po kapljicah postopoma dodali 3 mL 1M HCl/AcOH. Odstranili smo ledeno kopel in reakcijsko zmes pustili mešati 3,5 ure pri sobni temperaturi. Medtem smo v drugo bučko natehtali 94 mg spojine **5** (0,269 mmol, 1,2 ekv.) in jo raztopili v 1 mL DMF. Raztopini smo dodali 51 mg EDC×HCl (0,269 mmol, 1,2 ekv.) in 36 mg HOBt (0,269 mmol, 1,2 ekv.) ter jo pustili mešati pri sobni temperaturi 1 uro.

Po 3,5 urah smo zaznali konec reakcije in iz prve bučke odpareli topilo pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo prelili z dietil etrom (2 × 10 mL) in ga odpareli pod znižanim tlakom. Preostanek smo raztopili v 0,5 mL DMF in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Dodali smo 156 µL trietilamina (1,120 mmol, 5,0 ekv.), vsebino druge bučke in katalitično količino DMAP. Odstranili smo ledeno kopel in pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 24 urah smo reakcijski zmesi dodali 40 mL etilacetata in organsko fazo spirali z 1M HCl (3 × 10 mL), destilirano vodo (2 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 68 mg spojine **47**.

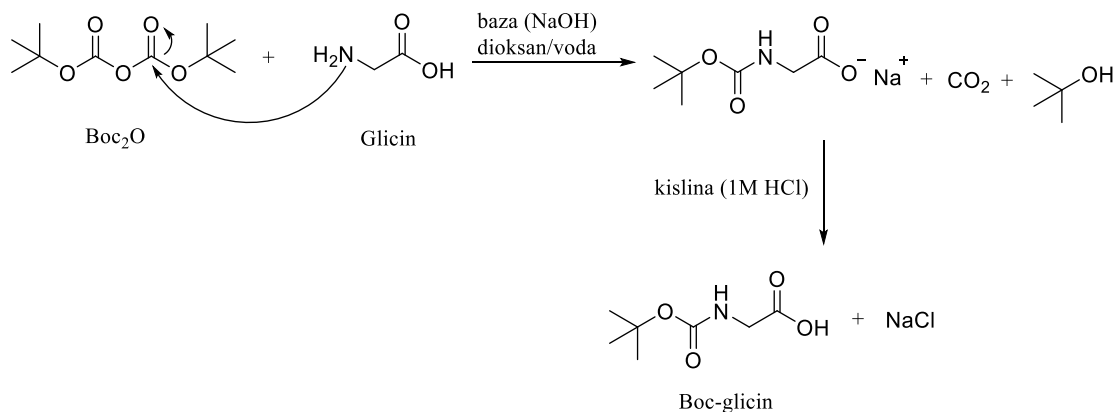
Spojina <b>47</b>	<i>tert</i> -butil ( <i>R</i> )-5-( <i>tert</i> -butoksiamino)-4-(( <i>S</i> )-2-(2-(( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilamido)acetamido)-3-metilbutanamido)-5-oksopentanoat
Mr (izračunana)	606,72
Elementna sestava	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub>
Izkoristek reakcije	50,07 %
Rf (DKM/MeOH 9:1)	0,44 (orositveni reagent: ninhidrin)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ[ppm]= 0.91 – 0.95 (m, 6H, 2 × CH <sub>3</sub> -Val), 1.17 – 1.18 (m, 9H, OC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.38 – 1.40 (m, 9H, OC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.82 – 2.13 (m, 3H, CH <sub>2</sub> -β-Glu, CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 2.22 – 2.37 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -γ-Glu), 3.84 (s, 3H, Ar-OCH <sub>3</sub> ), 3.92 – 4.02 (m, 2H, NHCH <sub>2</sub> ), 4.10 – 4.20 (m, 1H, CH-α), 4.25 – 4.34 (m, 1H, CH-α), 6.47 (d, 1H, <i>J</i> = 15.6 Hz, CH=CHCO), 6.76 (d, 1H, <i>J</i> = 8.4 Hz, H-Ar), 7.01 (d, 1H, <i>J</i> = 8.0 Hz, H-Ar), 7.10 (d, 1H, <i>J</i> = 1.6 Hz, H-Ar), 7.44 (d, 1H, <i>J</i> = 16.0 Hz, CH=CHCO)
MS (ESI)	m/z: 605,3 (M-H) <sup>-</sup>
HR-MS	605,3179 (izračunana: 605,3187) za C <sub>30</sub> H <sub>45</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub>
HPLC (254 nm)	100,00 % (t <sub>R</sub> = 8,90 min)
IR	3279, 2974, 2360, 1725, 1641, 1597, 1515, 1462, 1368, 1267, 1208, 1154, 1029, 981, 847 cm <sup>-1</sup>
T <sub>tališča</sub>	102-110 °C
Izgled	belo-rumena amorfna snov



## 5 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1 UVEDBA *TERC*-BUTILKARBAMATNE ZAŠČITE

Kadar ima spojina več reaktivnih centrov, moramo tiste centre, na katerih si ne želimo, da bi prišlo do reakcije, zaščititi. Mi smo se tovrstne metode poslužili pri glicinu pri sintezi spojine **2** (slika 17) in pri D-glutaminski kislini pri sintezi spojine **6**. Pri obeh smo s *tert*-butil karbamatom (Boc) zaščitili aminske skupine, saj smo želeli, da je karboksilna skupina mesto reakcije. Pri reakciji smo uporabili reagent di-*tert*-butil dikarbonat ( $\text{Boc}_2\text{O}$ ) ob prisotnosti baze (NaOH), ki zagotavlja, da amin ostane neprotoniran, kot topilo pa zmes dioksana in vode. Po končani reakciji smo dioksan odpareli, dobljeno alkalno vodno fazo pa spirali z dietil etrom, saj smo tako odstranili nezreagirani di-*tert*-butil dikarbonat. Vodno fazo smo nato nakisali do vrednosti pH med 2 in 3, saj smo tako pridobili neionizirano obliko produkta, ki je prešel v organsko fazo. Reakciji sta potekli z zmernim izkoristkom (67,5% in 68,1%). Možno je, da smo nekaj spojine izgubili pri izolaciji ali pa smo vodno fazo preveč nakisali, pri tem pa je prišlo do razpada Boc zaščite. Boc zaščita je namreč stabilna ob prisotnosti večine baz in nukleofilov, nestabilna pa je pri zelo kislih pogojih (39).

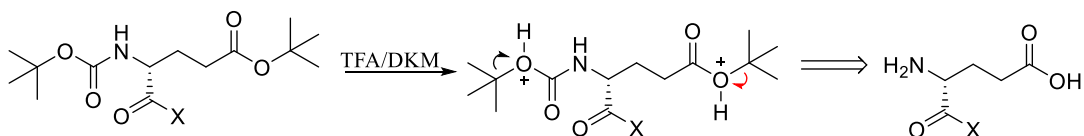


Slika 17: Uvedba Boc zaščite na aminske skupine glicina (prirejeno po (39)).

### 5.2 ODSTRANITEV *TERC*-BUTILKARBAMATNE ZAŠČITE

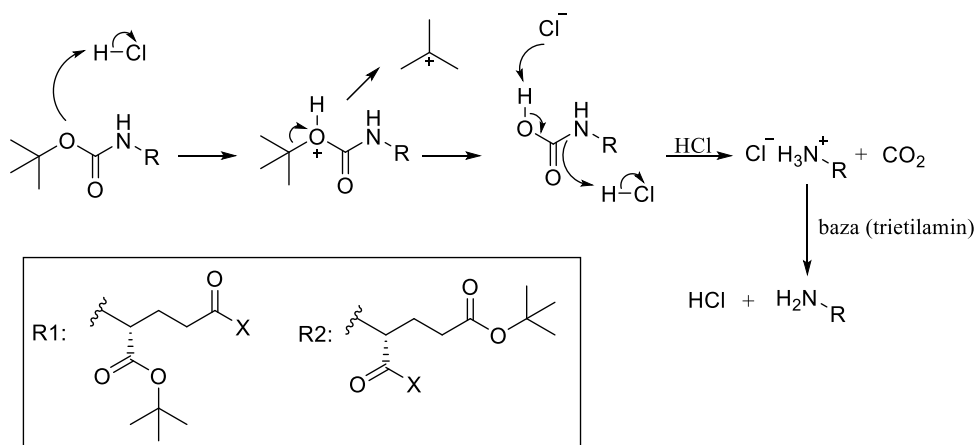
Pri sintezi spojine **4**, kjer smo tvorili amidno vez med *trans*-ferulično kislino in spojino **3**, smo morali predhodno odstraniti Boc-zaščito na dušikovem atomu glicina. Prav tako smo morali Boc-zaščito odstraniti iz mimetikov D-glutaminske kisline pri sintezi končnih spojin in pri sintezi spojine **27**, saj smo nato s prosto aminske skupine želeli tvoriti amidno

vez. Uporabili smo trifluoroocetno kislino (TFA) v DKM, ki smo jo dodajali po kapljicah na ledeni kopeli pri 0 °C, saj je reakcija eksotermna. Problem TFA je selektivna odstranitev Boc-zaščite ob prisotnosti *tert*-butilnega estra (40), zato smo se je poslužili le v primerih, kjer izhodna spojina v svoji strukturi nima *tert*-butilnega estra. V primeru sinteze spojine **36** in **42**, kjer je na D-Glu delu le-ta prisoten, so bili izkoristi slabi (47,3% in 20,0 %), kar lahko pripišemo tudi uporabi TFA (slika 18).



**Slika 18:** Primer neselektivne odstranitve Boc-zaščite s TFA/DKM (prirejeno po (41)).

Zaradi tega smo pri odščiti Boc-zaščite iz ostalih spojin uporabili 1M HCl/AcOH (slika 19), kot topilo pa etilacetat (v razmerju 1M HCl/AcOH:EtOH 1:2-3). Ker je bila tudi ta reakcija eksotermna, smo reagent dodajali po kapljicah pri 0 °C.

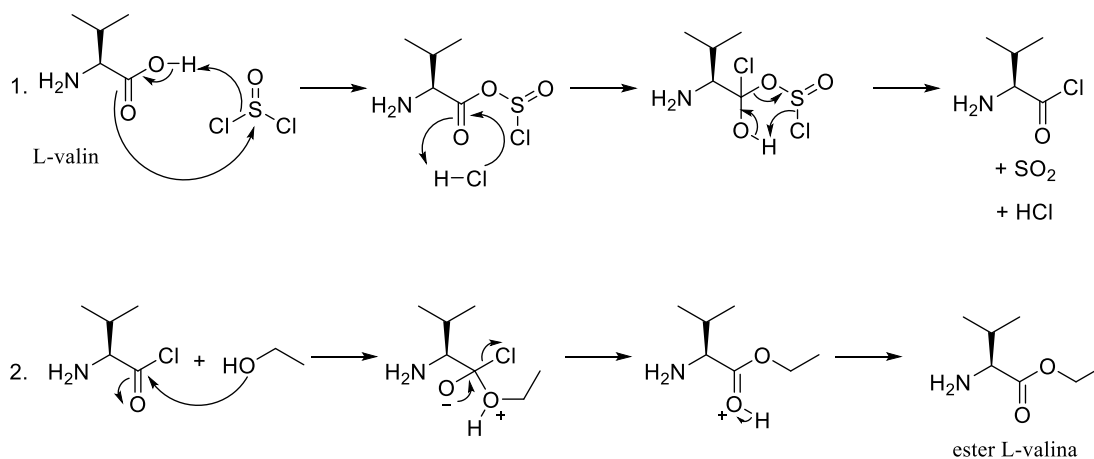


**Slika 19:** Mehanizem selektivne odstranitve Boc-zaščite z 1M HCl/AcOH (prirejeno po (41)).

Dokazano močne kisline v organskih topilih, kot je 1M HCl/AcOH izkazujejo dobro selektivnost, kot alternativo pa bi lahko uporabili tudi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> v *tert*-butil acetatu (40). V vseh primerih smo nastalo kislino ob koncu reakcije nevtralizirali z dodatkom trietilamina, ki je poskrbel tudi, da je bila aminska skupina neprotonirana. Na prosto aminske skupino smo nato preko amidne vezi pripeli spojino **5** in tako dobili končne spojine (od spojine **29** – **47**).

## 5.3 TVORBA ESTRSKE VEZI

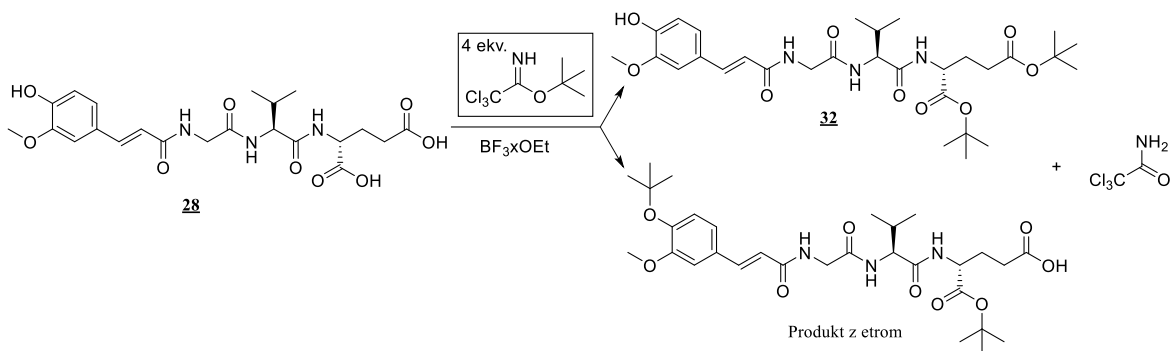
Pri sintezah spojin **1**, **14** in **32** smo tvorili estrsko vez. V primeru spojine **1** smo tvorili etilni ester na karboksilni skupini L-valina, da smo jo zaščitili pred nadaljnjimi reakcijami. Reakcijo smo izvedli med karboksilno kislino in alkoholom ob prisotnosti tionil klorida. Spojino smo raztopili v absolutnem etanolu, ki je služil hkrati kot topilo in nukleofil. Reakcijsko zmes smo ohladili na ledeni kopeli na 0 °C in po kapljicah dodajali tionil klorid, saj je reakcija eksotermna. Reakcija je nato potekala 24 ur pri povišani temperaturi (80 °C). Izkoristek reakcije je bil zelo dober (97,4 %). Tionil klorid je kislino najprej pretvoril v kislinski klorid in s tem aktiviral karboksilno skupino. Ta je nato z lahkoto zreagirala z etanolom kot nukleofilom (42). Ker lahko ob prisotnosti vode kislinski klorid hidrolizira, smo uporabili brezvodni etanol. Reakcija, ki je potekla, je dvakratna nukleofilna adicija s sledečo eliminacijo (slika 20).



**Slika 20:** 1. Nastanek kislinskega klorida s pomočjo SOCl<sub>2</sub>. 2. Napad etanola na reaktivni center kislinskega klorida in nastanek estra (prirejeno po (42)).

V primeru sinteze spojine **14** smo na prosti karboksilni skupini tvorili *tert*-butilni ester. Prav tako smo hkrati želeli uvesti *tert*-butilni ester na dveh karboksilnih skupinah v primeru sinteze spojine **32**. Za sintezo smo kot vir *tert*-butilnega kationa uporabili *tert*-butil 2,2,2-trikloroacetamidat, ki se je že v preteklosti izkazal kot zelo učinkovit. Prednost uporabe tega reagenta je preprosta reakcija, ki ne zahteva uporabe baze in poteka v brezvodnem okolju, poleg tega se izkoristki reakcije gibajo nekje od 70 do 90 %. Kot katalizator smo uporabili borov trifluorid dietil eterat, ki omogoča višje izkoristke (43, 44). Po končani reakciji smo v reakcijsko zmes dodali žličko NaHCO<sub>3</sub> in nastalo oborino odfiltrirali. Tako smo se znebili 2,2,2-trikloroacetamida, ki je nastal kot stranski produkt reakcije (43). Pri reakciji s pomočjo katalizatorja nastane stabilni *tert*-butilni kation, ki

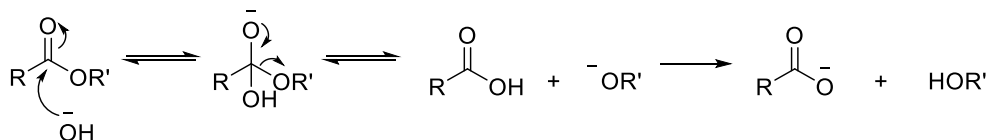
reagira s karboksilnim anionom in tako nastane ester (43, 44). Reakcija je v primeru spojine **14** potekla s 54,8 % izkoristkom, v primeru spojine **32** pa s 26,2 % izkoristkom. Slabši izkoristek lahko pripišemo tudi temu, da je verjetno nekaj *tert*-butil 2,2,2-trikloroacetamidata pri sintezi spojine **32** zreagiralo z OH skupino in pri tem tvorilo *tert*-butilni eter, medtem pa je karboksilna kislina ostala prosta (slika 21).



**Slika 21:** Nastanek dveh *tert*-butilnih estrov pri sintezi spojine **32** in nastanek enega *tert*-butilnega estra in enega *tert*-butilnega etra kot neželenega produkta pri sintezi spojine **32** (prirejeno po (43, 44)).

## 5.4 HIDROLIZA ESTRSKE VEZI

Hidrolizo estra smo izvedli pri sintezi spojine **5** in **28**, saj smo želeli pridobiti proste karboksilne skupine. Reakcija je potekala 20 – 24 ur ob dodatku petih ekvivalentov baze (1M LiOH), da je zreagirala ves ester. Kot sotopilo smo uporabili THF, ki smo ga po koncu reakcije odpareli. Nastala je natrijeva sol kisline, ki smo jo v nedisociirano obliko pretvorili z nakisanjem s kislino (1M HCl) do pH = 2 – 3. Reakcija, ki poteče, je nukleofilna substitucija, kjer pride najprej do napada hidroksidnega aniona na elektrofilni ogljikov atom estra. Nadalje se odcepi alkoksidni ion, ki z izstopajočim protonom tvori alkohol (slika 22) (45). Prva reakcija je potekla s 97,9 % izkoristkom, druga z 39,7 % izkoristkom. V drugi reakciji smo nekaj spojine izgubili pri ekstrakciji v vodni fazi, saj se ni v celoti pretvorila v nedisociirano obliko, poleg tega pa je bila spojina tudi zelo polarna.

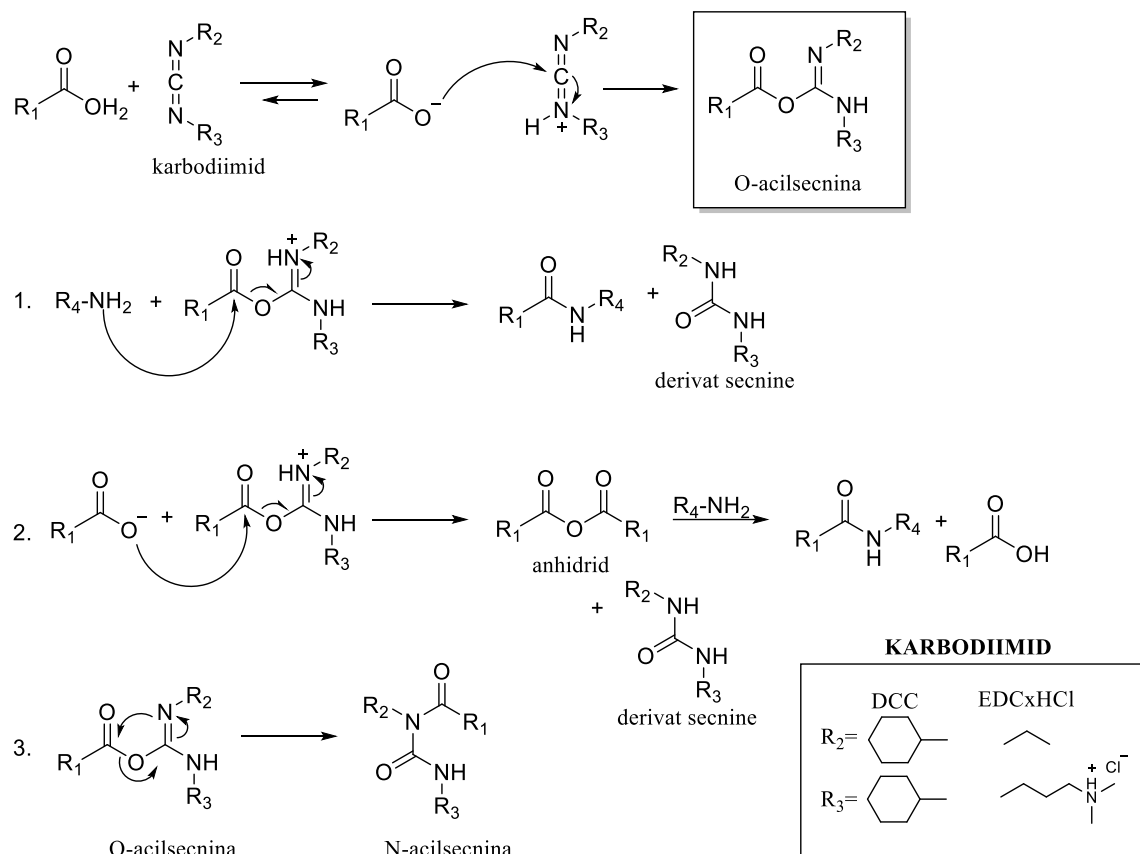


**Slika 22:** Hidroliza estrske vezi (prirejeno po (45)).

## 5.5 TVORBA AMIDNE VEZI

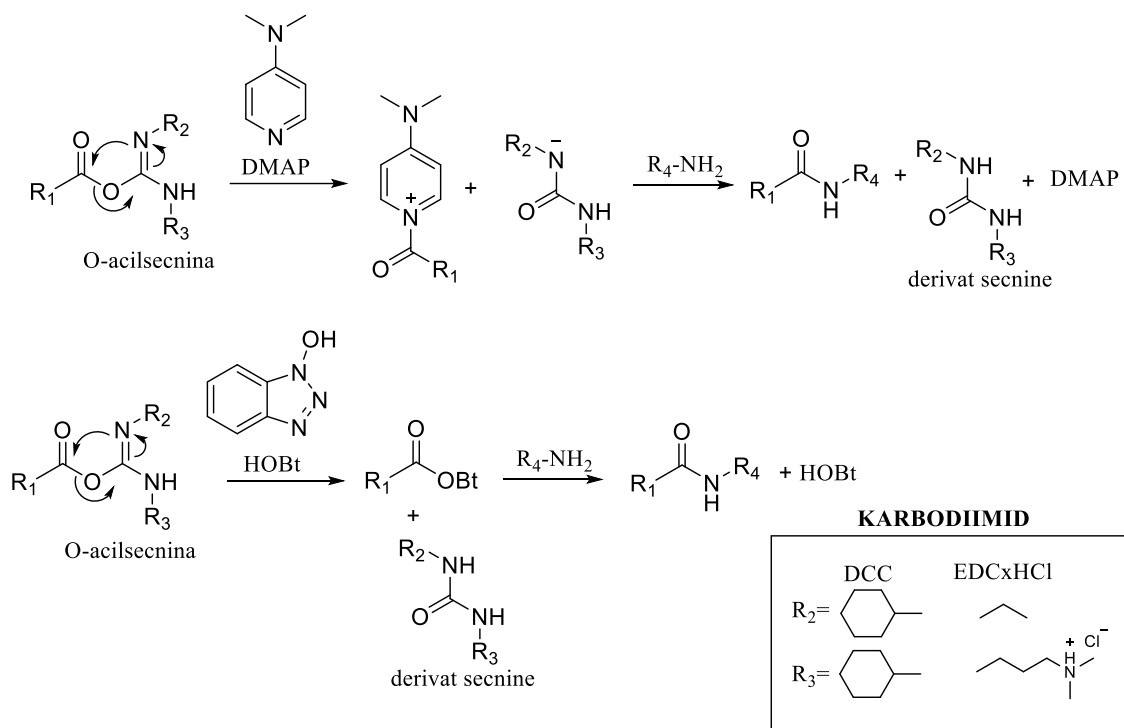
Amidno vez smo tvorili pri sintezi spojine **3**, **4**, **27** in pri sintezi vmesnih spojin, ko smo na proste karboksilne skupine pripenjali različne funkcionalne skupine (od **7** – **13** in od **15** – **26**). Tvorili smo jo tudi pri sintezi končnih spojin (**29** – **47**), ko smo na prostoaminsko skupino vmesnih spojin, ki smo jim predhodno odstranili Boc zaščito, pripeli spojino **5** in tako dobili končni tripeptid.

Pri sintezi amidne vezi moramo najprej aktivirati kislino v bolj reaktivno zvrst, da lahko poteče nukleofilna substitucija. To smo naredili s tako imenovanimi sklopitvenimi reagenti. V sintezi spojine **3** smo uporabili *N,N*-dicikloheksilkarbodiimid (DCC), v ostalih primerih pa 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid (EDC×HCl). V prvem koraku reakcije med DCC/EDC×HCl in karboksilno kislino nastane *O*-acilsečnina. Ta lahko hitro zreagira z aminom in tvori amidno vez. Stranski produkt, ki nastane, je derivat sečnine, ki je ponavadi v topilu netopen in ga lahko odstranimo s filtriranjem. *O*-acilsečnina sicer lahko zreagira tudi do ustreznega anhidrida karboksilne kisline, ta pa kot aktivirana zvrst z aminom zreagira do amida. Možnost pa je, da vodi nastanek *O*-acilsečnine do racemizacije ali pa do nastanka *N*-acilsečnine kot stranskega produkta (slika 23), zato smo v reakcijsko zmes dodali HOBt in DMAP, ki reagirata hitreje kot reakcija prenosa acilne skupine in tako preprečujeta nastanek neželenih produktov. EDC×HCl je za razliko od DCC bolje topen v vodi, prav tako so boljše topni tudi stranski produkti, ki nastajajo v reakciji. Zaradi tega jih lažje odstranimo pri izolaciji spojine s spiranjem s kislom vodno fazo, kar je prednost pred uporabo DCC-ja kot sklopitvenega reagenta (46).



**Slika 23:** Aktivacija kisline s sklopitvenim reagentom EDC<sub>x</sub>HCl ali DCC in nastanek O-acilsečnine. 1. Reakcija O-acilsečnine direktno z aminom. 2. Reakcija O-acilsečnine posredno preko anhidrida. 3. Nastanek stranskega produkta – N-acilsečnine (prirejeno po (46, 47)).

Katalizatorji in pomožni nukleofili pospešijo reakcijo, zmanjšajo možnost poteka racemizacije in nastanka stranskih produktov ter zvišajo izkoristke reakcij (46). Mi smo uporabili 1-hidroksi-1*H*-benzotriazol (HOBt) in DMAP, ki tvorita aktivirane estre ali protonirane amide, s katerimi nato zreagira amin (slika 24). Reakcijo smo izvedli ob dodatku baze – trietilamina, ki je omogočila ionizacijo karboksilne skupine. Za boljšo topnost smo dodali še DMF ali etilacetat.



**Slika 24:** Uporaba HOBt in DMAP kot pomožna nukleofila in katalizatorja (prirejeno po (46, 47)).

Pri sintezi spojine **3** smo uporabili DCC, ki je sklopitveni reagent iz skupine karbodiimidov. Z njim smo aktivirali karboksilno kislino, da je lažje zreagirala z aminom, ki je bil sterično oviran z izopropilno skupino v stranski verigi L-valina. Pri tej reakciji obstaja velika možnost nastanka stranskih produktov (*N*-acilsečnine) in racemizacije, zato smo že pred dodatkom DCC-ja dodali v reakcijsko zmes pomožni nukleofil HOBt in nato še ohlajali reakcijsko zmes na ledeni kopeli na 0 °C. Po končani reakciji smo v reakcijsko zmes dodali heksan in jo za 1 uro postavili v hladilnik, zato da se je izboril neželen stranski produkt - *N*-acilsečnina, ki smo jo nato lahko odfiltrirali. *N*-acilsečnina namreč ni topna v vodi, zato je nemoremo preprosto odstraniti s spiranjem z vodno fazo. Glede na sterično oviran amin in na veliko možnost nastanka stranskih produktov je bil izkoristek reakcije dober: 66,3 %. Verjetno zaradi sterične ovire nekaj amina ni zreagiralo, nekaj spojine smo izgubili pri ekstrakciji z etilacetatom, kar smo dokazali s tankoplastno kromatografijo, nastali pa so tudi stranski produkti v obliki oborine, ki smo jo odfiltrirali.

Pri sintezi vmesnih spojin (od **7** – **13** in od **15** – **26**) smo na proste karboksilne skupine pripenjali funkcionalne skupine preko amidne vezi. Izhodne spojine so bile spojina **6**, *N*-Boc-D-Glu-OtBu ali *N*-Boc-D-Glu-5-OtBu. Kislino smo raztopili v DMF, ki je v večini primerov topilo izbora za sintezo peptidov, saj so v njem topni sklopitveni reagenti in

derivati aminokislin (48). Po dodatku sklopitvenega reagenta EDC×HCl in HOBt kot pomožnega nukleofila smo reakcijsko zmes pustili mešati na sobni temperaturi 30 minut, da se je karboksilna kislina aktivirala. Dodali smo še bazo (triethylamin) in pomožni nukleofil DMAP. Izkoristki reakcij so bili večinoma dobri (od nekje 50 – 80 %), razen pri sintezi spojine **8**, kjer smo v prvem poskusu sinteze veliko spojine izgubili v vodni fazi pri izolaciji. Spojina je namreč zelo polarna, zato smo sintezo ponovili še enkrat in jo namesto s 3 × 20 mL 1M HCl, spirali le z 1 × 20 mL 1M HCl. Izkoristek reakcije se je tako povečal iz 15,4 % na 37,0 %. Slabše izkoristke sta imeli tudi sintezi spojine **9** in **10** (27,5 % in 20,5%), ki sta prav tako zelo polarni. Nekaj spojine smo izgubili pri izolaciji spojine, lahko pa je prišlo tudi do nastanka stranskih produktov. Edina reakcija, ki ni potekla, je sinteza spojine **12**, čeprav smo jo 2 × ponovili. Razloga, zakaj ta reakcija ni potekla, čeprav smo jo izvajali po istem postopku kot vse ostale reakcije, nismo našli.

Pri sintezi končnih spojin (**29** – **47**) smo vmesnim spojinam, ki so bili analogi Boc-D-glutaminske kisline, najprej iz dušika odstranili Boc karbamatno zaščito. Nato smo spojino raztopili v DMF, ohladili na ledeni kopeli in dodali triethylamin, dipeptid (spojino **5**), HOBt, EDC×HCl in DMAP. Odstranili smo ledeno kopel in pustili reakcijo potekati 24 ur. Tako smo dobili končne tripeptide. Izkoristki so bili slabši, zato smo postopek optimizirali. Pri optimiziranem postopku smo spojino **5** raztopili v DMF, ji dodali HOBt in EDC×HCl, ter jo pustili 1 uro mešati pri sobni temperaturi, da se je kislina aktivirala. Šele nato smo na ledeni kopeli dodali triethylamin, odščiten analog D-glutaminske kisline in DMAP. Reakcijo smo nekje 24 ur pustili potekati na sobni temperaturi. Pri sintezi spojine **32** smo imeli pri prvem postopku izkoristek 12,9 %, pri sintezi spojine po optimiziranem postopku pa 29,7 %.

Pri sintezi spojin **30**, **31** in **32** so bili izkoristki slabši, ker so spojine zelo polarne, zato smo pri njihovi sintezi uporabili **strategijo II**. Najprej smo sintetizirali tripeptid, ki je imel na D-Glu delu prosti karboksilni skupini. Nato smo pri sintezi spojine **30** in **31** po enakem postopku kot pri sintezi vmesnih spojin, pripeli funkcionalni skupini preko amidne vezi. Medtem smo pri sintezi spojine **32** sintetizirali ester (glej poglavje 5.3).

Pri sintezi spojin **30** in **31** je nastalo zelo malo produkta pri uporabi **strategije I** in **strategije II**. Prav tako smo na NMR spektru videli signale, ki jih ni možno pripisati želenima produktoma, pa tudi z masno spektrometrijo produktov nismo zaznali. Reakciji



torej nista uspeli. V prvi vrsti pri sintezi teh dveh spojin postopka še nismo optimizirali, poleg tega gre za zelo polarni spojini, zato ju je težje sintetizirati in izolirati.

Ostale reakcije so uspele, izkoristki so se gibali od 20 do 70 %. Kot pričakovano so skupni izkoristki nekoliko slabši, saj gre za dve zaporedni reakciji. Najprej smo odščitili Boc in že pri tem koraku je možno, da reakcija ni potekla popolnoma. Manjši izkoristek je lahko tudi posledica tega, da se kislina ni popolnoma aktivirala, smo pa nekaj spojine izgubili pri sami izolaciji.

Pri meritvah optične sučnosti smo ugotovili, da so spojine **38**, **39**, **40**, **41**, **43**, **44** in **45** racemizirale, saj imajo v svoji strukturi dva stereogena centra. Rezultati optične sučnosti so pokazali, da je racemizacija potekla na stopnji hidrolize estra z 1M LiOH do spojine **5**. Zaradi tega so bile nadaljne spojine, pri sintezi katerih smo uporabili spojino **5**, zmesi diastereomerov. Močna baza je odcepila vodikov atom na stereogenem centru in nastal je karbokation. Vodikov atom je nato ponovno napadel karbokation iz ene ali druge strani in tako povzročil racemizacijo (49).

Racemizaciji bi se lahko izognili z uporabo bolj razredčene raztopine baze (npr. 0,1 M LiOH namesto 1M LiOH). Druga pomembna dejavnika sta temperatura in čas, saj pri nižji temperaturi reakcija racemizacije poteka počasneje kot pri višjih temperaturah. Reakcijo bi morali tudi spremljati s TLC in jo končati v trenutku, ko bi vsa izhodna spojina zreagirala, medtem ko smo mi reakcijo pustili, da je potekala čez noč. Tretji pomemben dejavnik je izbira topila. Da se izognemo racemizaciji uporabljamo polarna aprotična topila, ki imajo manjšo energijo solvatacije, zato omogočijo, da je nukleofil bolj reaktiven in tako reakcija poteče hitreje, pri tem pa ne pride do racemizacije. Medtem pa so polarna protična topila donorji vodikove vezi in stabilizirajo tako anion kot kation, ki nastaneta po odcepitvi vodika, kar pa vodi k nastanku racemizacije (49). Mi smo uporabili THF, kot alternativo pa bi lahko uporabili tudi DMF, DMSO ali acetonitril (ACN). Raziskovalci so kot zelo učinkovito navedli tudi kombinacijo topil THF/ACN, ki je v raziskavi dala produkt z najmanjšim deležem racemizacije (48).

Do racemizacije bi lahko prišlo tudi pri sintezi mimetikov D-Glu, pri odščiti Boc-zaščite ali pa pri zadnji reakcije sklopitve zaradi nastanka vmesnega intermedijata oksazolona ali zaradi direktne enolizacije (50).

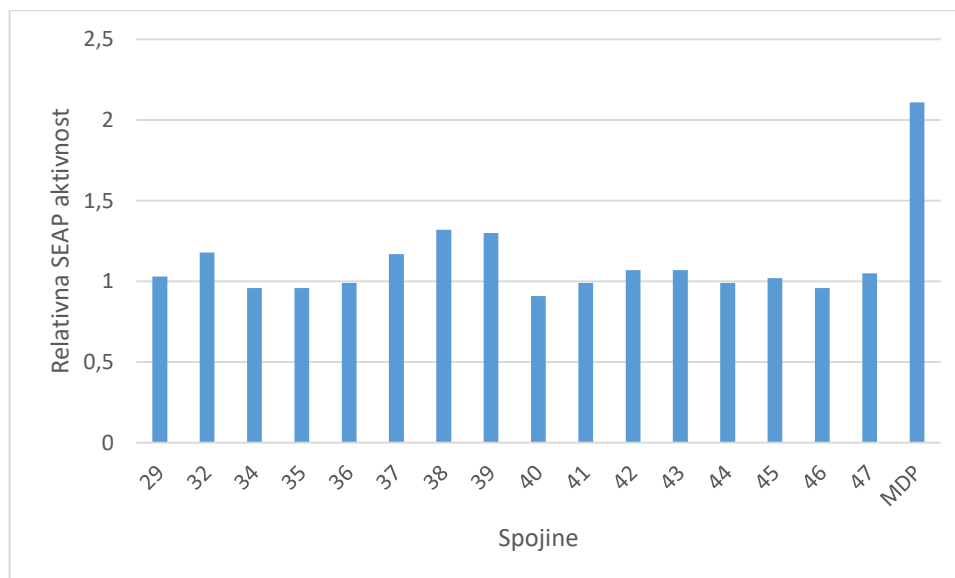
Pri tem je pomemben vidik uporabe pomožnih nukleofilov, v našem primeru smo uporabili HOBt in DMAP. Kot alternativo bi lahko uporabili HOAt ali etil 2-ciano-(2-hidroksiamino)acetat (Oxyma), ki je izkazal še boljše zmožnost zmanjšanja racemizacije kot HOBt (50).

Previdni moramo biti tudi pri izbiri sklopitvenih reagentov. Pred kratkim so poročali o protokolu, kjer je bilo prisotne zelo malo racemizacije. Uporabili so DIC (diizopropilkarbodiimid) in majhno količino HOBt ter en ekvivalent  $\text{CuCl}_2$ . Poleg karbodiimidov obstajajo tudi drugi sklopitveni reagenti, ki izkazujejo manjši delež racemizacije. Pogosto se uporabljajo fosfonijeve in uronijeve soli. Z namenom zmanjšanja racemizacije so razvili (benzotriazol-1-iloksi)tris(dimetilamino)fosfonijev heksafluorofosfat (BOP), vendar je stanski produkt, ki nastaja pri njegovi uporabi rakotvoren, zato so nadalje razvili PyBOP (benzotriazol-1-iloksi)tripirolidinofosfonijev heksafluorofosfat. Zelo dobre rezultate daje tudi TBTU (*O*-(Benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametilluronijev tetrafluoroborat), sploh uporabljen skupaj z HOBt (50, 51).

Pomembna je tudi uporaba primernih zaščitnih skupin na dušikovem atomu. Karbamati zmanjšajo verjetnost nastanka oksazolona, medtem ko elektron-akceptorske skupine povečajo možnost nastanka diastereomerov preko enolizacije (50).

## 5.6 BIOLOŠKO TESTIRANJE

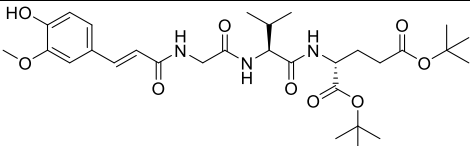
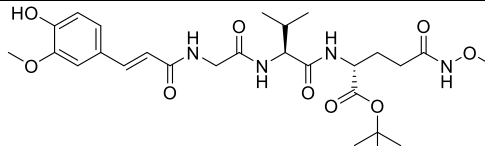
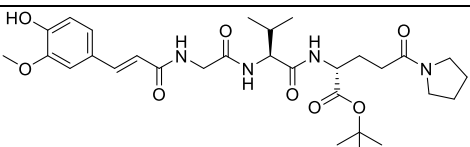
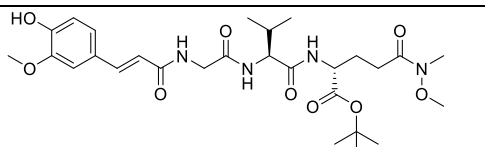
Nove sintetizirane dezmuramilpeptide smo dali biološko ovrednotiti na Katedro za klinično biokemijo na Fakulteto za farmacijo. Tam so na HEK-Blue™ hNOD2 celicah našim spojinam izmerili agonistično delovanje na receptor NOD2. Merili so izločanje SEAP, ki posredno odraža agonistično delovanje spojin na receptor NOD2, rezultate pa so primerjali glede na negativno kontrolo (netretirane celice) (graf 1).



**Graf 1:** Prikaz agonistične aktivnosti sintetiziranih spojin na receptor NOD2 glede na negativno kontrolo (netretirane celice).

Kot pozitivno kontrolo so uporabili MDP, ki je izkazal največjo agonistično aktivnost pri 20  $\mu$ M med vsemi izmerjenimi spojinami (2,11-krat večja sposobnost aktivacije NOD2 kot negativna kontrola). Čeprav so pri koncentraciji 20  $\mu$ M imele vse spojine nižjo agonistično aktivnost kot MDP, so se kot najboljše izkazale spojine **32** (1,18-krat večja agonistična aktivnost kot negativna kontrola), **37** (1,17-krat večja agonistična aktivnost kot negativna kontrola), **38** (1,32-krat večja agonistična aktivnost kot negativna kontrola) in **39** (1,30-krat večja agonistična aktivnost kot negativna kontrola). Vse ostale spojine so imele ali nižjo sposobnost aktivacije NOD2 kot negativna kontrola ali pa približno enako (ne več kot 1,07-krat večjo).

**Preglednica II:** Spojine, ki so izkazale zmerno agonistično aktivnost na receptor NOD2.

 <p style="text-align: center;"><b>32</b></p> <p>1,18-krat večja agonistična aktivnost</p>	 <p style="text-align: center;"><b>37</b></p> <p>1,18-krat večja agonistična aktivnost</p>
 <p style="text-align: center;"><b>38</b></p> <p>1,32-krat večja agonistična aktivnost</p>	 <p style="text-align: center;"><b>39</b></p> <p>1,30-krat večja agonistična aktivnost</p>

Zanimivo je, da imajo vse spojine, ki so izkazale večjo agonistično aktivnost, na  $\alpha$ -mestu D-glutaminske kisline *terc*-butilni ester. To bi nam lahko povedalo, kakšen fragment se za vezavo na receptor preferira na tem mestu. Lahko pa bi predvidevali tudi, da je kljub steričnim oviram *terc*-butilni ester še vedno podlegel napadu celičnih esteraz in razpadel na karboksilno kislino, ki se je nato vezala na receptor in izzvala agonistični učinek. Ti rezultati nakazujejo, da je prosta  $\alpha$ -karboksilna skupina bolj pomembna za vezavo na NOD2 kot pa prosta  $\gamma$ -karboksilna skupina. Vidimo tudi, da je med šibko aktivnimi analogi tudi spojina **32**, ki ima edina od spojin  $\alpha$ - in  $\gamma$ -karboksilni skupini D-Glu zaestreni v obliki *terc*-butilnih estrov.

Kot je znano že iz ostalih raziskav so za permeabilnost pomembne zaestrene karboksilne kisline, zato da lahko spojina vstopa v celico. Karboksilna kislina je namreč pri fiziološkem pH-ju ionizirana, kar ji otežuje pasiven prehod. Mi smo estrske skupine zamenjali z metabolno stabilnejšimi bioizosternimi zamenjavami, vendar so imele spojine slabo agonistično aktivnost ali pa le-te sploh niso imele. Ker smo imeli v strukturah spojin prisotne bioizosterne zamenjave, ki so imele podobno velikost in lipofilnost kot ester, lahko sklepamo, da so spojine prešle v celico. Razlika je bila v tem, da so bile zamenjave metabolno stabilnejše, torej se pri vstopu v celico niso razgradile (vsaj v časovnem okvirju izvedenega biološkega eksperimenta) do karboksilne kisline, kot se razgradijo estri. Iz tega bi lahko sklepali, da je karboksilna kislina, ki nastane po razgradnji estra v celici, dejansko aktivna učinkovina, ki zagotavlja vezavo in posledično agonistično delovanje na receptor NOD2. Isto hipotezo so predpostavljali tudi v že obstoječih raziskavah (poglavje 1.4.1). Da bi lahko našo domnevo potrdili, bi tudi mi morali testirati deleže spojin, ki so prešle v celico in kakšen delež spojin se je razgradil do proste karboksilne kisline. Poleg tega je že na voljo kristalna struktura, ki nam omogoča veliko možnost nadaljnjih raziskav in optimizacij spojine. Z njo bi lahko preverili, kateri fragmenti na D-Glu mestu naših spojin so bili pomembni za vezavo na receptor in kateri ne, tako pa bi lahko načrtovali in sintetizirali boljše agoniste receptorja NOD2 in odpravili strukturne pomanjkljivosti.

## 6 SKLEPI

- V okviru magistrske naloge smo sintetizirali 17 novih dezmuramilpeptidov, ki so bili analogi spojine spojine vodnice dietil ((*E*)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil-D-glutamata (spojine **G**), ki se je že v predhodni raziskavi izkazala kot dober agonist receptorja NOD2 ( $EC_{50} = 46$  nM).
- Etilne estre smo zamenjali z metabolno stabilnejšimi bioizosternimi zamenjavami in novim spojinam dali ovrednotiti agonistično delovanje na receptor NOD2.
- Vse spojine so izkazale nižjo agonistično aktivnost na NOD2 kot MDP, iz česar bi lahko sklepali da je karboksilna kislina, ki nastane po razgradnji estra v celici, dejansko aktivna učinkovina, ki zagotavlja vezavo in posledično agonistično delovanje na receptor NOD2. Estri se namreč z esterazami razgradijo v karboksilne kisline, ki so pri fiziološkem pH-ju negativno nabite, kar pa jim preprečuje pasiven prehod v celico. Ker smo jih mi zamenjali z metabolno stabilnejšimi bioizosterami, so lažje prehajali v celico, vendar pa se tam niso razgradili do karboksilne kisline.
- Kot šibki agonisti so se izkazale spojine **32**, **37**, **38** in **39**. Vse so imele na  $\alpha$ -mestu D-glutaminske kisline *tert*-butilni ester, ki znotraj celice delno hidrolizira. Iz teh rezultatov lahko torej sklepamo, da je prosta  $\alpha$ -karboksilna skupina bolj pomembna za vezavo na NOD2 kot pa prosta  $\gamma$ -karboksilna skupina.
- Težava karboksilnih kislin je, da ne prehajajo pasivno v celico, estrov kot predzdravil pa, da so metabolno nestabilni. Pri nadaljnjih raziskavah bi tako bilo smiselno ugotoviti, če obstajajo še druge alternative karboksilne kisline, ki bi jo lahko posnemale in se prav tako učinkovito vezale na receptor. Poleg tega bi se lahko poleg optimizacije dipeptidnega dela usmerili še na optimizacijo sladkornega dela, kar pa bo v prihodnosti zaradi razrešene kristalne strukture receptorja NOD2 veliko lažje.

## 7 LITERATURA

1. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL: Robbins basic pathology, 7th edition, Saunders, Philadelphia, 2003: 104.
2. Bajrovič F: Temelji patofiziologije s fiziologijo za študente zdravstvenih ved, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2017: 28-31.
3. Vozelj M: Temelji imunologije, DZS, Ljubljana, 2000: 1-16.
4. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S: Cellular and molecular immunology, 8th edition, Elsevier Saunders, Philadelphia, 2014: 1-12, 51-61.
5. Jakopin Ž: Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) inhibitors: a rational approach toward inhibition of NOD signaling pathway. *J. Med. Chem.* 2014; 57 (16): 6897-6918.
6. Rajae A, Barnett R, Cheadle WG: Pathogen- and danger-associated molecular patterns and the cytokine response in sepsis. *Surg. Infect. (Larchmt)* 2018; 19 (2): 107-116.
7. Zhu G, Xu Y, Cen X, Nandakumar KS, Liu S, Cheng K: Targeting pattern-recognition receptors to discover new small molecule immune modulators. *Eur. J. Med. Chem.* 2018; 144: 82-92.
8. Kawai T, Akira S: The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol.* 2009; 21 (4): 317-337.
9. Gharagozloo M, Gris KV, Mahvelati T, Amrani A, Lukens JR, Gris D: NLR-dependent regulation of inflammation in multiple sclerosis. *Front. Immunol.* 2017; 8: 2012.
10. Caruso R, Warner N, Inohara N, Núñez G: NOD1 and NOD2: signaling, host defense, and inflammatory disease. *Immunity* 2014; 41 (6): 898-908.
11. Espaillat A, Forsmo O, El Biari K, Björk R, Lemaitre B, Trygg J, Cañada FJ, de Pedro MA, Cava F: Chemometric analysis of bacterial peptidoglycan reveals atypical modifications that empower the cell wall against predatory enzymes and fly innate immunity. *J. Am. Chem. Soc.* 2016; 138 (29): 9193-9204.
12. Pashenkov MV, Dagil YA, Pinegin BV: NOD1 and NOD2: Molecular targets in prevention and treatment of infectious diseases. *Int. Immunopharmacol.* 2018; 54: 385-400.

13. Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, Casadevall A: Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015; 13 (10): 620-630.
14. Jakopin Ž, Corsini E, Gobec M, Mlinarič-Raščan I, Sollner Dolenc M: Design, synthesis and biological evaluation of novel desmuramyldipeptide analogs. *Eur. J. Med. Chem.* 2011; 46 (9): 3762-3777.
15. Correa RG, Milutinovic S, Reed JC: Roles of NOD1 (NLRC1) and NOD2 (NLRC2) in innate immunity and inflammatory diseases. *Biosci. Rep.* 2012; 32 (6): 597–608.
16. Al Nabhani Z, Dietrich G, Hugot J-P, Barreau F: Nod2: The intestinal gate keeper. *PLoS Pathog.* 2017; 13 (3): e1006177.
17. Keestra-Gounder AM, Tsolis RM: NOD1 and NOD2: beyond peptidoglycan sensing. *Trends. Immunol.* 2017; 38 (10): 758-767.
18. Sidiq T, Yoshihama S, Downs I, Kobayashi KS: Nod2: A critical regulator of ileal microbiota and Crohn's disease. *Front. Immunol.* 2016; 7: 367.
19. Henckaerts L, Vermeire S: NOD2/CARD15 disease associations other than Crohn's disease. *Inflamm. Bowel. Dis.* 2007; 13 (2): 235-241.
20. Gobec M, Tomašič T, Štimac A, Frkanec R, Trontelj J, Anderluh M, Mlinarič-Raščan I, Jakopin Ž: Discovery of nanomolar desmuramylpeptide agonists of the innate immune receptor nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 (NOD2) possessing immunostimulatory properties. *J. Med. Chem.* 2018; 61 (7): 2707-2724.
21. Jakopin Ž, Gobec M, Mlinarič-Raščan I, Sollner Dolenc M: Immunomodulatory properties of novel nucleotide oligomerization domain 2 (NOD2) agonistic desmuramyldipeptides. *J. Med. Chem.* 2012; 55 (14): 6478-6488.
22. Gobec M, Mlinarič-Raščan I, Sollner Dolenc M, Jakopin Ž: Structural requirements of acylated Gly-L-Ala-D-Glu analogs for activation of the innate immune receptor NOD2. *Eur. J. Med. Chem.* 2016; 116: 1-12.
23. Zhao N, Ma Y, Zhang S, Fang X, Liang Z, Liu G: New muramyl dipeptide (MDP) mimics without the carbohydrate moiety as potential adjuvant candidates for a therapeutic hepatitis B vaccine (HBV). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011; 21 (14): 4292-4295.

24. Sollner M, Pečar S, Štalc A: The influence of the lipophilicity of 7-oxoacyl-L-alanyl-D-isoglutamines on their immunorestitution activity in vivo. *Eur. J. Med. Chem.* 1996; 31 (11): 927-933.
25. Arabi AA: Routes to drug design via bioisosterism of carboxyl and sulfonamide groups. *Future Med. Chem.* 2017; 9 (18): 2167-2180.
26. Meanwell NA: Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design. *J. Med. Chem.* 2011; 54 (8): 2529–2591.
27. Patani GA, LaVoie EJ: Bioisosterism: a rational approach in drug design. *Chem. Rev.* 1996; 96 (8): 3147-3176.
28. Lima LM, Barreiro EJ: Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. *Curr. Med. Chem.* 2005; 12 (1): 23-49.
29. Rautio J, Kumpulainen H, Heimbach T, Oliyai R, Oh D, Järvinen T, Savolainen J: Prodrugs: design and clinical applications. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2008; 7 (3): 255-270.
30. Liederer BM, Borchardt RT: Enzymes involved in the bioconversion of ester-based prodrugs. *J. Pharm. Sci.* 2006; 95 (6): 1177-1195.
31. Chen X, Wang W: The use of bioisosteric groups in lead optimization. *Annual reports in medicinal chemistry* 2003; 38: 333-346.
32. Bioisosteric replacements:  
[https://www.cambridgemedchemconsulting.com/resources/bioisosteres/ester\\_bioisosteres.html](https://www.cambridgemedchemconsulting.com/resources/bioisosteres/ester_bioisosteres.html) (dostopano: 25.03.2018)
33. Blanchard SG, Andrews RC, Brown PJ, Gan LS, Lee FW, Sinhababu AK, Wheeler TN: Discovery of bioavailable inhibitors of secretory phospholipase A2. *Pharm. Biotechnol.* 1998; 11: 4450–4633
34. Ballatore C, Huryn DM, Amos B. Smith AB: Carboxylic Acid (Bio)Isosteres in Drug Design. *ChemMedChem* 2013; 8 (3): 385 – 395.
35. Vaughan JR.; Eichler Joyce A: The preparation of optically active peptides using mixed carbonic-carboxylic acid anhydrides. *Journal of the American Chemical Society* 1953; 75: 5556 – 5560.
36. Jahani F, Tajbakhsh M, Golchoubian H, Khaksar S: Guanidine hydrochloride as an organocatalyst for N-Boc protection of amino groups. *Tetrahedron Letters* 2011; 52 (12): 1260-1264.



37. Renil M, Rajasekharan Pillai VN: Synthesis of fully protected peptides on a tetraethyleneglycol diacrylate (TTEGDA)-crosslinked polystyrene support with a photolytically detachable 2-nitrobenzyl anchoring group. *Tetrahedron Letters* 1994; 35 (22): 3809-3812.
38. Chen ZH, He YB, Hu CG, Huang XH, Hu L: Synthesis and chiral recognition properties of a novel colorimetric chiral sensor for carboxylic anions. *Australian Journal of Chemistry* 2008; 61(4): 310-315.
39. tert-Butyl carbamates: <http://www.organic-chemistry.org/protectivegroups/amino/boc-amino.htm> (dostopano: 07.04.2018)
40. Kaul R, Brouillette Y, Sajjadi Z, Hansford KA, Lubell WD: Selective tert-butyl ester deprotection in the presence of acid labile protecting groups with use of ZnBr<sub>2</sub>. *J. Org. Chem.* 2004; 69 (18): 6131–6133.
41. Boc deprotection:  
[http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn\\_Pages/Boc\\_Protection/Boc\\_Protection\\_HCl\\_Mech.htm](http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_HCl_Mech.htm) (dostopano: 07.04.2018)
42. Carboxylic acid reactions overview: <https://www.khanacademy.org/test-prep/mcat/chemical-processes/carboxylic-acids/a/carboxylic-acid-reactions-overview> (dostopano: 14.04.2018)
43. Armstrong A, Brackenridge I, Jackson RFW, Kirk JM: A new method for the preparation of tertiary butyl ethers and esters. *Tetrahedron letters*. 1988; 29 (20): 2483-2486.
44. Thierry J, Yue C and Potier P: 2-Phenyl Isopropyl and t-Butyl Trichloroacetimidates: Useful Reagents for Ester Preparation of N-Protected Amino acids under Neutral Conditions. *Tetrahedron Letters* 1998; 39 (12): 1557-1560.
45. Brown WH, Iverson BL, Anslyn EV, Foote CS: *Organic chemistry*, 8th edition, Cengage learning, Boston, 2018: 277, 278.
46. Valeur E, Bradley M: Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chem Soc Rev.* 2009; 38 (2): 606-631.
47. Montalbetti CAGN, Falque V: Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*. 2005; 61 (46): 10827-10852.

48. Jad YE, Acosta GA, Khattab SN, de la Torre BG, Govender T, Kruger HG, El-Faham A, Albericio F: Peptide synthesis beyond DMF: THF and ACN as excellent and friendlier alternatives. *Org. Biomol. Chem.* 2015; 13 (8): 2393-2398.
49. Effects of Solvent, Leaving Group, and Nucleophile on Unimolecular Substitution: [https://chem.libretexts.org/Textbook\\_Maps/Organic\\_Chemistry/Map%3A\\_Organic\\_Chemistry\\_\(Vollhardt\\_and\\_Schore\)/07.\\_Further\\_Reactions\\_of\\_Haloalkanes%3A\\_Unimolecular\\_Substitution\\_and\\_Pathways\\_of\\_Elimination/7.4%3A\\_Effects\\_of\\_Solvent%2C\\_Leaving\\_Group%2C\\_and\\_Nucleophile\\_on\\_Unimolecular\\_Substitution](https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Organic_Chemistry/Map%3A_Organic_Chemistry_(Vollhardt_and_Schore)/07._Further_Reactions_of_Haloalkanes%3A_Unimolecular_Substitution_and_Pathways_of_Elimination/7.4%3A_Effects_of_Solvent%2C_Leaving_Group%2C_and_Nucleophile_on_Unimolecular_Substitution) (dostopano: 30.05.2018)
50. El-Faham A, Albericio F: Peptide coupling reagents, more than a letter soup. *Chem. Rev.* 2011; 111 (11): 6557-6602.
51. Knorr R, Trzeciak A, Bannwarth W, Gillessen D: New coupling reagents in peptide chemistry. *Tetrahedron Letters* 1989, 30 (15): 1927-1930.