

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA PERIC

**MAGISTRSKA NALOGA**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA PERIC

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA ACILIRANIH ANALOGO  
TRIPLEPTIDA Gly-L-Val-D-Glu KOT AGONISTOV RECEPTORJA  
NOD2**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF ACYLATED TRIPEPTIDE Gly-L-Val-  
D-Glu ANALOGS AS NOD2 RECEPTOR AGONISTS**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Žige Jakopina, mag. farm. Spektroskopske in druge meritve so bile izvedene na Fakulteti za farmacijo in na Institutu "Jožef Stefan" v Ljubljani. Sintetizirane spojine so biološko ovrednotili na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

## **ZAHVALA**

Posebna zahvala gre mentorju doc. dr. Žigi Jakopinu, mag. farm. za pomoč, nasvete ter strokovno usmerjanje pri izdelavi magistrske naloge.

Zahvaljujem se družini in bližnjim, ki so mi kakorkoli pomagali in me spodbujali pri nastajanju magistrskega dela ter mi stali ob strani v času študija.

Zahvaljujem se tudi Občini Šempeter-Vrtojba, ki me je štipendirala in mi s tem omogočila finančno podporo skozi vsa študijska leta.

## **IZJAVA**

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

Katja Peric

Predsednik komisije magistrskega izpita:izr. prof. dr. Matjaž Jeras, mag. farm.

Član komisije magistrskega izpita: doc. dr. Rok Dreu, mag. farm.

## VSEBINA

VSEBINA .....	I
POVZETEK.....	III
KLJUČNE BESEDE.....	V
SEZNAM OKRAJŠAV.....	V
1. UVOD .....	1
1.1. Imunski sistem.....	1
1.2. Receptorji za prepoznavo vzorcev (PRR).....	3
1.2.1. NOD-u podobni receptorji (NLR) .....	4
1.2.2. Receptor NOD2, njegova funkcija in signalna pot.....	4
1.3. Bakterijska celična stena in peptidoglikan.....	7
1.3.1. Muramil dipeptid in receptorska prepoznavna fragmentov peptidoglikana .....	8
1.4. Imunoadjuvansi .....	9
1.4.1. Dezmuramilpeptidi .....	11
2. NAČRT ZA DELO .....	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 tališča .....	20
3.2.4. Biološko testiranje spojin .....	21
4. EKSPERIMENTALNO DELO .....	22
4.1. Sinteza dezmuramilpeptidnih analogov .....	22
4.1.1. Sinteza ( <i>tert</i> -butoksikarbonil)-L-valina ( <b>1</b> ) .....	23
4.1.2. Sinteza ( <i>R</i> )-1,5-dietoksi-1,5-dioksopentan-2-aminijevega klorida ( <b>2</b> ) .....	24
4.1.3. Sinteza dietil ( <i>tert</i> -butoksikarbonil)-L-valil-D-glutamata ( <b>3</b> ).....	25
4.1.4. Sinteza dietil ( <i>tert</i> -butoksikarbonil)glicil-L-valil-D-glutamata ( <b>4</b> ).....	27
4.1.5. Sinteza dietil cinamoilglicil-L-valil-D-glutamata ( <b>5</b> ).....	29
4.1.6. Sinteza dietil (2-(3,4-difluorofenil)ciklopropan-1-karbonil)glicil-L-valil-D-glutamata ( <b>6</b> ).....	31
4.1.7. Poskus sinteze dietil (( <i>E</i> )-3-(3,4-difluorofenil)akrilolil)glicil-L-valil-D-glutamata ( <b>7</b> ) .....	32
4.1.8. Sinteza dietil (6-fenil-1 <i>H</i> -indol-2-karbonil)glicil-L-valil-D-glutamata ( <b>8</b> ) .....	34

4.1.9. Sinteza dietil (( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil-D-glutamata ( <b>9</b> )	36
4.1.10. Sinteza dietil ( <i>trans</i> -2-fenilciklopropan-1-karbonil)glicil-L-valil-D-glutamata ( <b>10</b> )	37
4.2. Poskus ciklopropanacije dvojne vezi na <i>trans</i> -ferulični kislini	39
4.2.1. Sinteza metil ( <i>E</i> )-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilata ( <b>11</b> )	40
4.2.2. Poskus sinteze metil 2-(4-hidroksi-3-metoksifenil)ciklopropan-1-karboksilata ( <b>12</b> )	41
4.2.3. Poskus sinteze metil ( <i>E</i> )-3-(4-acetoksi-3-metoksifenil)akrilata ( <b>13</b> )	42
4.2.4. Sinteza ( <i>E</i> )-3-(4-acetoksi-3-metoksifenil)akrilne kisline ( <b>14</b> )	44
4.2.5. Sinteza metil ( <i>E</i> )-3-(4-acetoksi-3-metoksifenil)akrilata ( <b>13</b> )	45
4.2.6. Poskus sinteze metil 2-(4-acetoksi-3-metoksifenil)ciklopropan-1-karboksilata ( <b>15</b> )	46
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	47
5.1. Sintezni postopki	47
5.1.1. Tvorba amidne vezi	47
5.1.2. Uvedba in odstranitev <i>terc</i> -butilkarbamatne (Boc) zaščite na aaminski skupini	53
5.1.3. Tvorba estrske vezi	54
5.1.4. Reakcija Corey-Chaykovsky	57
5.2. Biološko testiranje končnih sintetiziranih spojin	58
6. SKLEPI	62
7. LITERATURA	63
PRILOGA	i

## POVZETEK

Poglavitna funkcija imunskega sistema je varovanje gostitelja pred patogenimi mikrobi in njihova odstranitev. Elementi prirojene imunosti prepoznajo strukture, ki so značilne za tuje mikroorganizme in niso normalno prisotne v gostitelju. Takšne splošne mikrobne komponente prepoznajo in vežejo receptorji za prepoznavo vzorcev (PRR). V to skupino receptorjev spada tudi receptor z nukleotide-vezočo oligomerizacijsko domeno 2 (NOD2), ki prepozna muramil dipeptid, minimalni bioaktivni motiv peptidoglikana, skupen vsem bakterijam. Vezava agonistov na receptor NOD2 sproži specifične signalne kaskade, ki privedejo do aktivacije transkripcijskih dejavnikov, proizvodnje citokinov in kemokinov, indukcije avtofagije ter proizvodnje protimikrobnih peptidov in reaktivnih kisikovih zvrsti.

V sklopu magistrske naloge smo načrtovali in sintetizirali dezmuramilpeptidne analoge, in sicer acilirane analoge tripeptida Gly-L-Val-D-Glu, ki predstavljajo agoniste receptorja NOD2 in potencialne imunoadjuvance. Sintetizirali smo pet končnih spojin (spojine **5**, **6**, **8**, **9** in **10**), pri katerih smo na tripeptid Gly-L-Val-D-Glu(OEt)<sub>2</sub> s pomočjo sklopitvenega reagenta pripeli ustrezno karboksilno kislino kot mimetik sladkorne enote muramil dipeptida. Kot glikomimetik smo uporabili 6-fenil-1*H*-indol-2-karboksilno kislino in *trans*-cimetno kislino, saj se je v predhodni raziskavi pokazalo, da ključno prispevata k NOD2-agonistični aktivnosti dezmuramilpeptidov. Sintetizirali smo tudi spojine s substituiranim fenilnim obročem cinamoilnega fragmenta ter spojine, ki so namesto dvojne vezi vsebovale ciklopropan. Sinteza načrtovane spojine **7** (z (*E*)-3-(3,4-difluorofenil)akriloilnim fragmentom) ni uspela, vendar smo dobljeni produkt kljub temu biološko testirali. Sintetiziranim dezmuramilpeptidom smo ovrednotili agonistično aktivnost na receptorje NOD2 z uporabo celične linije HEK-Blue<sup>TM</sup> hNOD2, pri čemer smo kot pozitivno kontrolo uporabili muramil dipeptid. Dobro agonistično aktivnost sta izkazali spojini **5** (s cinamoilnim fragmentom) in **6** (z 2-(3,4-difluorofenil)ciklopropan-1-karbonilnim fragmentom), kot najboljši agonist NOD2 iz serije sintetiziranih spojin pa se je izkazala spojina **9**, pri kateri smo na tripeptid vezali *trans*-ferulično kislino. Njena agonistična aktivnost je bila primerljiva z aktivnostjo muramil dipeptida in tako ta spojina predstavlja dobro osnovo za nadaljnje raziskave in optimizacijo dezmuramilpeptidov kot potencialnih imunskih adjuvansov.

## ABSTRACT

The major function of the immune system is to protect the host against pathogens and to remove them. Components of the innate immunity recognize structures which are typical for microbes and are not normally present in the host. Such general microbial structures are recognized by binding to pattern recognition receptors (PRR). One of those receptors is nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 (NOD2). NOD2 recognizes muramyl dipeptide, minimal bioactive motif of peptidoglycan, which is common to all bacteria. The binding of agonists to the receptor NOD2 initiates specific signaling cascades that lead to activation of transcription factors, cytokine and chemokine production, induction of autophagy and production of antimicrobial peptides and reactive oxygen species.

Within the master's thesis we designed and synthesized desmuramylpeptides, acylated tripeptide Gly-L-Val-D-Glu analogs, which represent NOD2 receptor agonists and potential immunoadjuvants. We synthesized five end products (compounds **5**, **6**, **8**, **9** and **10**) by attaching a suitable carboxylic acid as a mimetic of the sugar unit of muramyl dipeptide to the tripeptide Gly-L-Val-D-Glu(OEt)<sub>2</sub> employing a coupling reagent. We used 6-phenyl-1*H*-indole-2-carboxylic acid and *trans*-cinnamic acid since it was shown previously that their incorporation imparts NOD2-agonistic activity to desmuramylpeptides. We also synthesized compounds with substituted phenyl ring of the cinnamoyl fragment and compounds with a cyclopropane replacement of the double bond. The synthesis of a designed compound **7** (with a (*E*)-3-(3,4-difluorophenyl)acryloyl fragment) was unsuccessful, but we still used the obtained product in the biological testing. The NOD2-agonistic activity of synthesised desmuramylpeptides has been evaluated using HEK-Blue<sup>TM</sup> hNOD2 cell line, wherein we used the muramyl dipeptide as a positive control. Compounds **5** (with a cinnamoyl fragment) and **6** (with a 2-(3,4-difluorophenyl)cyclopropane-1-carbonyl fragment) displayed good agonistic activity. Compound **9**, incorporating *trans*-ferulic acid moiety as glycomimetic, proved to be the best NOD2 agonist within the series of synthesized compounds. Its agonistic activity was comparable to that of muramyl dipeptide, therefore compound **9** represents a good basis for further research and optimization of desmuramylpeptides as potential immunoadjuvants.

**KLJUČNE BESEDE**

imunski sistem, receptor NOD2, muramil dipeptid, dezmuramilpeptid, imunoadjuvans, sinteza spojin, tripeptid Gly-L-Val-D-Glu(OEt)<sub>2</sub>, cinamoilni fragment, *trans*-ferulična kislina

**SEZNAM OKRAJŠAV**

OKRAJŠAVA	SLOVENSKI IZRAZ	ANGLEŠKI IZRAZ
<b>AD</b>	kisla transaktivacijska domena	acid transactivation domain
<b>ADP</b>	adenozin difosfat	adenosine diphosphate
<b>APC</b>	antigen predstavitvena celica	antigen presenting cell
<b>ATP</b>	adenozin trifosfat	adenosine triphosphate
<b>BIR</b>	domena bakulovirusnega inhibitorja	baculovirus inhibitor repeat domain
<b>Boc</b>	<i>tert</i> -butoksikarbonil	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
<b>Boc<sub>2</sub>O</b>	di- <i>tert</i> -butil dikarbonat	di- <i>tert</i> -butyl dicarbonate
<b>br s</b>	širok singlet	broad singlet
<b>CARD</b>	domena kaspazne aktivacije	caspase recruitment domain
<b>CB</b>	Crohnova bolezen	
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	devteriran kloroform	
<b>CSF</b>	kolonije spodbujajoči dejavnik	colony stimulating factor
<b>d</b>	dublet	doublet
<b>δ</b>	kemijski premik	
<b>D-Ala</b>	D-alanin	D-alanine
<b>D-Gln</b>	D-glutamin	D-glutamine
<b>D-Glu</b>	D-glutaminska kislina	D-glutamic acid
<b>D-iGln</b>	D-izoglutamin	D-isoglutamine
<b>DCC</b>	<i>N,N'</i> -dicikloheksilkarbodiimid	<i>N,N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide
<b>DIPEA</b>	<i>N,N</i> -diizopropiletilamin	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
<b>DMAP</b>	4-dimetilaminopiridin	4-dimethylaminopyridine
<b>DMSO</b>	dimetilsulfoksid	dimethyl sulfoxide
<b>DMSO-d<sub>6</sub></b>	devteriran dimetilsulfoksid	deuterated dimethyl sulfoxide
<b>EDC×HCl</b>	<i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilkarbodiimid hidroklorid	<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimide hydrochloride
<b>eq</b>	ekvivalent	equivalent
<b>ESI</b>	ionizacija z razprševanjem v električnem polju	electrospray ionization
<b>Gly</b>	glicin	glycine
<b>HOBt</b>	1-hidroksibenzotriazol	1-hydroxybenzotriazole
<b>HPLC</b>	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti	high performance liquid chromatography
<b>HR-MS</b>	masna spektrometrija visoke ločljivosti	high-resolution mass spectrometry
<b>IκB</b>	inhibitor κB	inhibitor of κB
<b>iE-DAP</b>	dipeptid γ-D-Glu- <i>mezo</i> -DAP	dipeptide γ-D-Glu- <i>meso</i> -DAP
<b>IFN</b>	interferon	interferon
<b>IKK</b>	kinaza IκB	IκB kinase
<b>IL</b>	interlevkin	interleukin
<b>IR</b>	infrardeča spektroskopija	infrared spectroscopy
<b>J</b>	sklopitvena konstanta	



<b>L-Ala</b>	L-alanin	L-alanine
<b>L-Lys</b>	L-lizin	L-lysine
<b>L-Val</b>	L-valin	L-valine
<b>LRR</b>	domena, bogata z levcinom	leucine-rich repeats
<b>m</b>	multiplet	multiplet
<b>M<sub>r</sub></b>	relativna molekulska masa	
<b>MAPK</b>	z mitogenom aktivirana proteinska kinaza	mitogen-activated protein kinase
<b>MDP</b>	muramil dipeptid	muramyl dipeptide
<b>MEKK4</b>	kinaza z mitogenom aktiviranega proteina/ERK kinaze	mitogen-activated protein/ERK kinase kinase
<b>meso-DAP</b>	<i>mezo</i> -diaminopimelinska kislina	<i>meso</i> -diaminopimelic acid
<b>MS</b>	masna spektrometrija	mass spectrometry
<b>MHC</b>	poglavitni kompleks tkivne skladnosti	major histocompatibility complex
<b>NACHT</b>	domena, prisotna v NAIP, CIITA, HET-E in TP-1	domain present in NAIP, CIITA, HET-E and TP-1
<b>NAG</b>	<i>N</i> -acetilglukozamin	<i>N</i> -acetylglucosamine
<b>NAM</b>	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina	<i>N</i> -acetylmuramic acid
<b>NEMO</b>	esencialni modulator NF- $\kappa$ B	NF- $\kappa$ B essential modulator
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	jedrni dejavnik $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ B
<b>celica NK</b>	naravna celica ubijalka	natural killer cell
<b>NLR</b>	NOD-u podoben receptor	NOD-like receptor
<b>NMR</b>	jedrnska magnetna resonanca	nuclear magnetic resonance
<b>NOD</b>	nukleotide-vezoča oligomerizacijska domena	nucleotide-binding oligomerization domain
<b>NOD1/2</b>	protein z nukleotide-vezočo oligomerizacijsko domeno 1/2	nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1/2
<b>PAMP</b>	s patogeni povezani molekulske vzorci	pathogen-associated molecular patterns
<b>PGN</b>	peptidoglikan	peptidoglycan
<b>ppm</b>	število delov na milijon	parts-per million
<b>PRR</b>	receptor za prepoznavo vzorcev	pattern recognition receptor
<b>PYD</b>	pirinska domena	pyrin domain
<b>R<sub>f</sub></b>	retencijski faktor	
<b>RIP2</b>	protein 2, ki interagira z receptorjem	receptor-interacting protein 2
<b>RNA</b>	ribonukleinska kislina	ribonucleic acid
<b>s</b>	singlet	singlet
<b>SEAP</b>	izločena zarodna alkalna fosfataza	secreted embryonic alkaline phosphatase
<b>t</b>	triplet	triplet
<b>t<sub>R</sub></b>	retencijski čas	
<b>TAB</b>	protein, ki veže TAK1	TAK1-binding protein
<b>TAK1</b>	kinaza 1, ki jo aktivira TGF- $\beta$	transforming growth factor $\beta$ -activated kinase 1
<b>TBTU</b>	<i>O</i> -(benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronijev tetrafluoroborat	<i>O</i> -(benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium tetrafluoroborate
<b>TFA</b>	trifluoroocetna kislina	trifluoroacetic acid
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	transformirajoči rastni dejavnik $\beta$	transforming growth factor $\beta$
<b>THF</b>	tetrahidrofuran	tetrahydrofuran
<b>TLC</b>	tankoplastna kromatografija	thin-layer chromatography
<b>TLR</b>	Toll-u podoben receptor	Toll-like receptor
<b>TNF</b>	dejavnik tumorske nekroze	tumor necrosis factor
<b>TriDAP</b>	tripeptid L-Ala-D-Glu- <i>mezo</i> -DAP	tripeptide L-Ala-D-Glu- <i>meso</i> -DAP

## **1. UVOD**

### **1.1. Imunski sistem**

Sesalci so razvili več vrst učinkovitih mehanizmov, da se ubranijo potencialnih patogenih mikrobov, med katerimi ima glavno vlogo imunski sistem. Poglavitna funkcija imunskega sistema je zavarovanje gostitelja pred patogenimi mikrobi in njihova odstranitev (1). Imunski sistem se proti patogenom bori z različnimi oblikami imunskega odziva. V grobem jih lahko razdelimo na dve skupini, in sicer na odzive prirojene in pridobljene imunosti, obsegajo pa tri faze – fazo prepoznave, aktivacije in efektorsko fazo (2, 3).

Prirojena ali naravna imunost je prva linija obrambe proti okužbam. Mehanizmi obrambe prirojene imunosti so prisotni pred srečanjem z mikrobi, le-ti pa jih hitro aktivirajo, in sicer še pred razvojem odzivov pridobljene imunosti (3). Pomembno vlogo pri preprečevanju okužb imajo epiteljske površine, ki niso samo fizična pregrada, ampak v njih nastajajo peptidi, ki imajo naravno antibiotično delovanje in preprečujejo vdor mikroorganizmov v telo (npr. defenzini). Poleg tega lahko epiteljske celice izločajo tudi nekatere citokine. K obrambi gostitelja dodatno pripomorejo še druge mehanske ovire (npr. gibanje resic) ter nespecifične baktericidne snovi telesnih tekočin (npr. želodčna kislina, mlečna kislina v lojnatih izločkih). Če mikroorganizmu uspe preiti te bariere, se najprej sproži prva faza gostiteljeve obrambe, ki vključuje celice in proteine prirojene imunosti. Glavne efektorske celice prirojene imunosti so fagocitne celice (monociti, makrofagi in nevtrofilci), ki »požirajo« tujke in s tem pripomorejo k odstranjevanju zunajceličnih mikrobov, in naravne celice ubijalke (celice NK), ki imajo glavno vlogo pri uničevanju okuženih in transformiranih gostiteljevih celic. Nekatere celice, zlasti makrofagi, nevtrofilci in celice NK, izločajo citokine. Citokini potem aktivirajo druge fagocite, stimulirajo vnetje, privabljajo in aktivirajo dodatne levkocite in vplivajo na sistemske spremembe, ki vključujejo povečanje sinteze in aktivacijo efektorskih celic in proteinov, ki okrepijo odziv proti mikrobom. Med efektorske mehanizme prirojene imunosti spadata tudi aktivacija sistema komplementa in povečanje koncentracije proteinov akutne faze (1, 3).

Komponente prirojene imunosti prepoznajo strukture, ki so značilne za tuje mikroorganizme in niso normalno prisotne v gostitelju. Te strukture vključujejo nukleinske kisline, značilne le za nekatere mikrobe (npr. dvojnovijačna RNA), mikrobne proteine, ogljikove hidrate oziroma njihove komplekse z lipidi, ki jih sintetizirajo mikrobi (npr.

gradniki bakterijske celične stene – lipopolisaharidi, teihoična kislina, ...). Take splošne mikrobne komponente širokega spektra, ki so tarče prirojene imunosti, imenujemo »s patogeni povezani molekularni vzorci« (PAMP). Receptorje, na katere se ti vzorci vežejo, pa »receptorji za prepoznavo vzorcev« (PRR). Prirojeni imunski sistem prepozna mikrobne produkte, ki so največkrat nujni za njihovo preživetje, zato mikrob teh komponent ne more spremeniti in se tako ne more izogniti prepoznavi gostitelja (3). Prepoznavna PAMP s PRR vodi v sproščanje obrambnih molekul, kar vključuje reaktivne kisikove in dušikove zvrsti, bakteriolitične encime, protimikrobne peptide in proteine komplementa (4).

Vsi ti mehanizmi pa velikokrat niso dovolj učinkoviti, zato imamo razvito še eno skupino obrambnih mehanizmov, imenovanih pridobljena ali adaptivna imunost, ki jih razvije posameznik kot odziv na vdor infekcijskega agensa. Zanja je značilna prepoznavna tuje snovi ali mikroba, nastanek protiteles, efektorskih celic in imunski spomin (1). Pridobljena imunost je torej nadgradnja prirojene imunosti, ki tako še izboljša obrambo gostitelja proti mikrobom (Preglednica 1) (3). V nasprotju s prirojeno imunostjo, ki prepozna skupne molekularne vzorce mikrobov, vsebuje pridobljeni imunski sistem veliko paleto specifičnih receptorjev za določene antigene. Visoka specifičnost omogoča razvoj imunskega spomina, na čemer temeljijo ojačitve in večja hitrost nastopa odziva ob naslednji izpostavitvi istemu antigenu ter delovanje cepiv. Imunski spomin in visoka specifičnost sta ključni karakteristiki pridobljenega imunskega sistema, katerega odziv temelji na specifični prepoznavi antigena z limfociti. Limfociti T so odgovorni predvsem za celično-posredovano imunost, fagocitom z aktivacijo pomagajo uničiti fagocitiran tujek ter prepoznajo in uničijo celice, okužene z virusi. Antigen prepoznajo preko T-celičnih receptorjev (TCR), prisotnih na svoji površini, in s tem regulirajo tudi odziv limfocitov B. Slednji so odgovorni za humoralni imunski odziv, ki se bori proti zunajceličnim patogenom, in sicer po aktivaciji izdelujejo in izločajo protitelesa, ki se specifično vežejo na antigen, aktivirajo sistem komplementa in tako pomagajo fagocitom prevzeti tujke (2).

Odziva prirojene in pridobljene imunosti sta tesno povezana. Povezuje ju posebna skupina celic – antigen predstavitvene celice (dendritične celice, makrofagi in nekateri limfociti B), ki na svoji površini preko molekul poglobitnega kompleksa tkivne skladnosti (MHC) predstavijo antigene celicam pridobljene imunosti (limfocitom T) ter proizvajajo citokine, ki uravnavajo funkcije in delovanje imunskih celic (Priloga II) (5, 2).

**Preglednica 1: Primerjava prirojene in pridobljene imunosti (6).**

	Imunost	
	prirojena	pridobljena
<i>ločevanje med lastnim in tujim</i>	DA, reakcija je proti tujkom	DA, reakcija je proti tujkom
<i>faza zakasnitve</i>	NE, odziv je takojšen	DA, primarni odziv se pojavi vsaj čez nekaj dni
<i>specifičnost</i>	OMEJENA, enak odziv na različne antigene	VISOKA, odziv je usmerjen le na antigene, ki ga sprožijo
<i>raznolikost</i>	OMEJENA, zato omejena specifičnost	OBŠIRNA, ki se kaže v širokem naboru receptorjev za številne antigene
<i>spomin</i>	NE, ponovna izpostavljenost določenemu antigenu generira enak odziv	DA, ponovna izpostavljenost določenemu antigenu sproži močnejši in hitrejši odziv

Citokini so proteinske ali glikoproteinske molekule, ki so vpletene v signalizacijo med celicami pri imunskem odzivu. Proizvajajo pa jih tako celice prirojene kot celice pridobljene imunosti ter stimulirajo različne odzive celic, vpletenih v imunske in vnetne reakcije. Lahko jih razvrstimo v več skupin (prikazano v Preglednici 2) (1, 2).

**Preglednica 2: Skupine citokinov in njihove glavne funkcije (1, 2).**

skupina citokinov	glavna funkcija
interferoni (IFN)	omejujejo širjenje virusnih okužb
interlevkini (IL)	številne funkcije, spodbujajo druge celice k delitvi in diferenciaciji (izdelujejo jih predvsem limfociti T, makrofagi in nekatere tkivne celice)
kolonije spodbujajoči dejavniki (CSF)	narekujejo delitev in diferenciacijo matičnih celic kostnega mozga in predhodnikov krvnih levkocitov
kemokini	kemotaktični citokini, stimulirajo gibanje levkocitov in regulirajo njihovo migracijo iz krvi v tkiva
ostali citokini: dejavnik tumorske nekroze (TNF), transformirajoči rastni dejavnik $\beta$ (TGF- $\beta$ )	številne funkcije, posebno pomembna pri posredovanju vnetja in citotoksičnih reakcij

## 1.2. Receptorji za prepoznavo vzorcev (PRR)

PRR imajo pomembno vlogo pri prirojenem imunskem odzivu, saj prepoznajo evolucijsko ohranjene »s patogeni povezane molekulske vzorce« (PAMP) in »z nevarnostjo povezane molekulske vzorce« (DAMP). PAMP sestavljajo mikrobne komponente, medtem ko so DAMP v glavnem dejavniki, ki izvirajo iz gostitelja in se kopičijo pod pogoji stresa in tkivnih poškodb (7, 8). Vsi PRR so pomembni pri odzivu na mikrobno okužbo. Vezava agonistov sproži specifične signalne kaskade, ki privedejo do aktivacije transkripcijskih dejavnikov, proizvodnje določenih vnetnih mediatorjev (citokinov, kemokinov) in posledično do odziva prirojene imunosti (9). PRR so razvrščeni v družine glede na njihovo lokalizacijo znotraj celice, molekulsko strukturo in glede na vzorce, ki jih prepoznajo. Na celično membrano vezani Toll-u podobni receptorji (TLR) in receptorji lektina tipa C

(CLR) neprekinjeno spremljajo zunajcelično okolje. NOD-u podobni receptorji (NLR), RIG-I podobni receptorji (RLR) in AIM2 podobni receptorji (ALR) pa se nahajajo v citoplazmi in varujejo znotrajcelični prostor (7, 8, 9).

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

Aktivacija NLR ima za posledico tvorbo inflamatornih ali sprožitvenih transkripcijskih signalnih kaskad, kar vodi v proizvodnjo vnetnih citokinov in baktericidnih dejavnikov (8). NLR so izraženi v številnih celicah, vključno z imunskimi in epitelijskimi celicami, določeni receptorji iz te družine pa so primarno izraženi v fagocitnih celicah (10). Pri ljudeh poznamo 22 proteinov, ki jih uvrščamo v družino NLR. Sestavljeni so iz številnih proteinskih domen, pri čemer ima vsaka domena svojo specifično funkcijo. Različne poddružine NLR imajo skupno centralno nukleotide-vezočo in oligomerizacijsko domeno (NACHT) in C-terminalno domeno, bogato z levcinom (LRR). Domena NACHT posreduje oligomerizacijo receptorja, domena LRR pa je področje za zaznavo ligandov. N-terminalna efektorska domena posreduje signal naprej preko njene interakcije z nadaljnjimi signalnimi molekulami. Ta domena se med receptorji precej razlikuje in to nam omogoča, da klasificiramo proteine NLR v štiri poddružine (Preglednica 3, Priloga III) (8, 9).

**Preglednica 3: Poddružine NLR in efektorske domene, ki jih vsebujejo pripadajoči receptorji (8, 9).**

<b>Poddružina NLR</b>	<b>Efektorska domena</b>
NLRA	domena kaspazne aktivacije (CARD) in kislina transaktivacijska domena (AD)
NLRB	ponovitvena domena bakulovirusnega inhibitorja (BIR)
NLRC/X	domena kaspazne aktivacije (CARD)/ne definirana domena, ki je podobna CARD
NLRP	pirinska domena (PYD)

### 1.2.2. Receptor NOD2, njegova funkcija in signalna pot

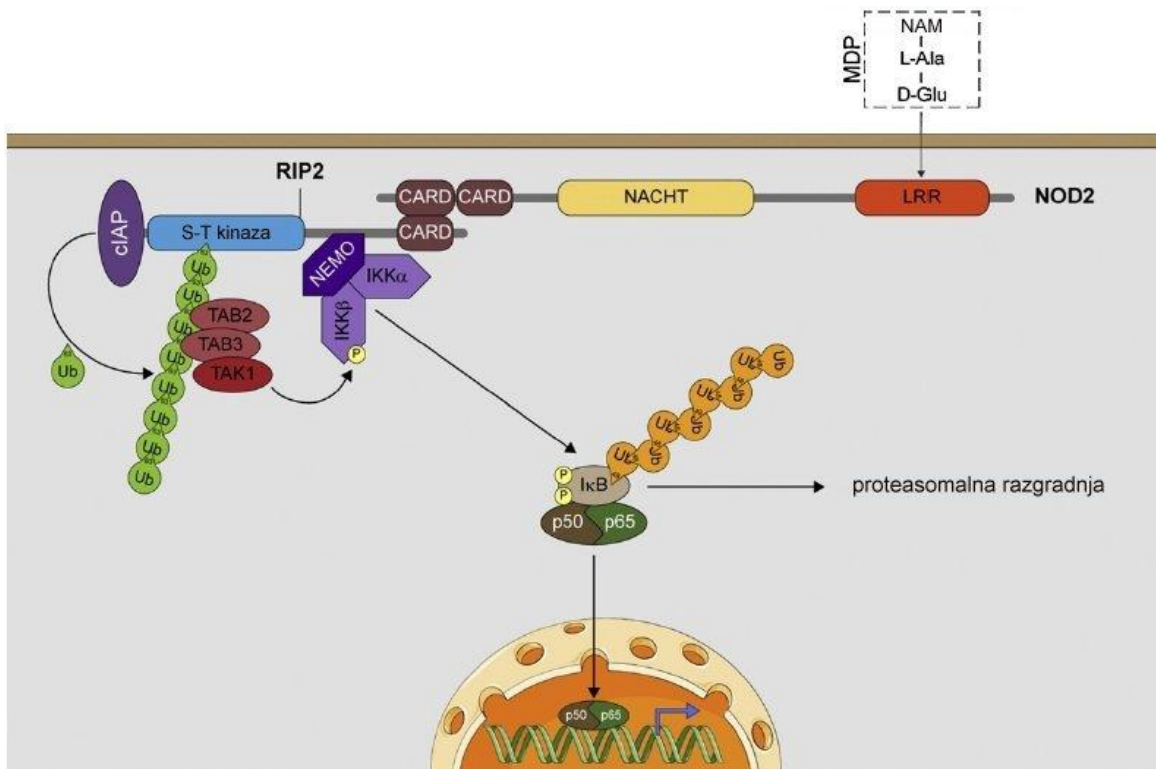
NOD2 (receptor z nukleotide-vezočo oligomerizacijsko domeno 2) je receptor PRR, ki se nahaja v citozolu celice in je pretežno izražen v monocitih, makrofagih in dendritičnih celicah ter v manjši meri tudi v intestinalnih epitelijskih celicah (4, 11). Muramil dipeptid (MDP) je najmanjši fragment, ki se veže na NOD2 in ga s tem aktivira, pri čemer pride do sproščanja citokinov in kemokinov, indukcije avtofagije ter proizvodnje protimikrobnih peptidov in reaktivnih kisikovih vrst (9). Receptor NOD2 spada v skupino receptorjev NLR in vsebuje 1.040 aminokislin, njegova molekulska masa pa je 110 kD (12). Sestavljen je iz (i) dveh N-terminalnih domen CARD, ki posredujeta protein–proteinske interakcije, (ii) centralne domene NACHT ter (iii) C-terminalne domene LRR. MDP se veže na domeno LRR receptorja, njegova aktivacija pa poteka preko RIP2 (proteina 2, ki

interagira z receptorjem). Ta sodi med serin-treoninske proteinske kinaze in sproži signalni poti, ki aktivirata jedrni dejavnik  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) in z mitogenom aktivirane proteinske kinaze (MAPK) (11, 13).

Signalna pot NF- $\kappa$ B (njen potek je prikazan na Sliki 1) je regulirana s številnimi posttranslacijskimi modifikacijami, vključno s fosforilacijo in ubikvitinacijo (9). Receptor NOD2 spada v družino ATPaz, povezanih z različnimi celičnimi aktivnostmi (AAA+). Centralna domena NACHT ima ATPazno aktivnost in veže nukleotide – adenozin trifosfat (ATP) in adenozin difosfat (ADP). Receptor se v celici nahaja v neaktivni obliki, ki jo doseže z vezavo ADP ali z avtoinhibitorno konformacijo preko interakcij med domenama NACHT in LRR ter interakcij s celičnimi šaperoni. Ko MDP vstopi v znotrajcelično okolje, se veže na domeno LRR receptorja NOD2, čemur sledi nukleotidna zamenjava (ADP z ATP) s sledečo hidrolizo vezanega ATP, kar povzroči spremembo konformacije in aktivacijo receptorja ter oligomerizacijo domene NACHT (14). Ko je receptor v neaktivni obliki, RIP2 tvori kompleks s kinazo z mitogenom aktiviranega proteina/ERK kinaze (MEKK4). Po aktivaciji receptorja kompleks MEKK4 : RIP2 disociira. Tvori se kompleks NOD2 : RIP2 preko interakcij med domenama CARD obeh proteinov (13). Temu sledi konjugacija kinazne domene proteina RIP2 s poliubikvitinsko verigo, kar omogoča priključitev kompleksa proteinov TAK1 (kinaze 1, ki jo aktivira TGF- $\beta$ ) in TAB2/3 (proteinov 2/3, ki vežeta TAK1) (9, 10). Sočasni vezavi I $\kappa$ B-kinaznega kompleksa (IKK) na vmesno domeno proteina RIP2 sledijo fosforilacija in aktivacija IKK (preko TAK1), ubikvitinacija regulatorne podenote IKK $\gamma$ , ki jo imenujemo tudi esencialni modulator NF- $\kappa$ B (NEMO), ter njena razgradnja, kar omogoča katalitičnima podenotama IKK $\alpha$  in IKK $\beta$  fosforilacijo inhibitorja  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) (10, 13). Ta vodi do njegove ubikvitinacije in posledične razgradnje s citoplazemskim proteasomom. Pri tem se sprosti NF- $\kappa$ B (heterodimer p50-p65), ki preide v jedro in povzroči prepisovanje tarčnih genov za citokine (npr. TNF, IL-12, IL-6, IL-10), kemokine (npr. IL-8, MCP-1, KC), kot tudi protimikrobne peptide (predvsem  $\alpha$ -defenzine) (9).

Podobno kot pri signalni poti NF- $\kappa$ B, sta RIP2 in TAK1 pomembna tudi pri od NOD2 odvisni aktivaciji MAPK. Aktivacija te poti sproži sproščanje transkripcijskega dejavnika AP1 (aktivatorski protein 1), ki je odgovoren za nadzor celične proliferacije, diferenciacije in pojavov apoptoze. Vmesni koraki te poti so sicer slabše poznani, njen končni rezultat pa je, podobno kot pri NF- $\kappa$ B, močan vnetni odziv (10, 12). NOD2 aktivira še nekatere druge

signalne poti, vključno z alternativno potjo s protivirusnim odzivom (12). Na okužbo z virusi z enoverižno RNA se odzove tako, da inducira proizvodnjo IFN tipa I (9).



Slika 1: Shematski prikaz poteka signalne poti NF-κB; prirejeno po (9). Legenda: Ub – ubikvitin, P – fosforilacija, S-T kinaza – serin-treoninska kinaza, cIAP (ang. cellular inhibitor of apoptosis protein) – E3 ubikvitinska ligaza

NOD2 sodeluje pri proizvodnji mikrobicidnih reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), ki so pomemben del protibakterijskega odziva prirojene imunosti. ROS neposredno aktivirajo protein DUOX2 (ang. dual oxidase 2), ki generira vodikov peroksid (9, 12). Ta ima protibakterijske lastnosti in se med okužbo sprošča v fagocitih. V primerjavi z normalnimi tkivi so v vnetih celicah dokazali višji nivo izražanja DOUX2 (12). Aktivacija NOD2 sproži tudi indukcijo inducibilne sinteze NO (iNOS), ki proizvaja dušikov oksid (NO). Kratkožive molekule NO lahko reagirajo s superoksidnimi anioni in povzročijo nastanek sekundarnih reaktivnih dušikovih zvrsti, ki imajo med drugim tudi protimikrobno delovanje (15).

Receptor NOD2 je vpleten tudi v proces avtofagije. V tem procesu sodeluje s proteinom ATG16L1 (ang. autophagy related 16-like 1), komponento proteinskega kompleksa, ki deluje kot regulator mehanizma avtofagije (12). NOD2 je preko avtofagije povezan z odzivom pridobljenega imunskega sistema, saj z razgradnjo patogenov v avtofagosomu nastanejo antigeni, ki jih nadalje procesirajo antigen predstavitvene celice (APC) (9). Na

povezavo NOD2 s pridobljenim imunskim sistemom kaže tudi povečano izražanje molekul razreda MHC II na površini APC, ki jo inducira stimulacija receptorja NOD2. Poleg tega je MDP učinkovit adjuvans za antigensko specifične T-celične odzive in B-limfocitno proizvodnjo protiteles (12).

Motnje v signalizaciji NLR so povezane s številnimi boleznimi, vključno s kroničnimi vnetji ter predispozicijo za avtoimunska in rakava obolenja. Motene funkcije NOD2, ki so posledica genskih mutacij, prispevajo med drugim tudi k patogenezi Crohnove bolezni (CB). To je kronična vnetna črevesna bolezen, ki v glavnem prizadene terminalni ileum in debelo črevo. Izkazalo se je, da trije polimorfizmi znotraj gena *CARD15/NOD2*, ki kodira receptor NOD2, bistveno povečajo dovzetnost za CB. Gre za dve mutaciji, pri katerih je ena aminokislina zamenjana znotraj domene LRR, in za eno mutacijo, ki je posledica delecije, kar povzroča premik bralnega okvira in izgubo 33 aminokislin (12). Te mutacije privedejo do zmanjšane ali izgubljene zmožnosti za aktivacijo NF- $\kappa$ B ob stimulaciji z MDP, kar se kaže v zmanjšani proizvodnji citokinov in  $\alpha$ -defenzinov v sluznici ileuma (10, 12). Tako so mutacije, ki privedejo do izgube funkcije receptorja NOD2, povezane z oslavitvijo funkcije epiteljske bariere, kar pospeši invazijo črevesne bakterijske flore in vnetje v črevesni pregradi (11). Znano je tudi, da mutacije, ki privedejo do zamenjave ene aminokislina znotraj domene NACHT proteina NOD2, povzročajo Blau sindrom in juvenilno sarkoidozo. To sta avtosomni dominantni bolezni, za kateri je značilen zgodnji nastop granulomatoznega vnetja kože, oči in sklepov. Te mutacije lahko povzročajo motnje v oligomerizaciji receptorja in vodijo v okrepitev odziva na MDP ter konstitutivno aktivacijo NF- $\kappa$ B tudi v odsotnosti stimulacije z MDP (10, 12). Polimorfizmi gena *CARD15/NOD2* naj bi bili povezani tudi s pojavom nekaterih oblik raka (12).

### **1.3. Bakterijska celična stena in peptidoglikan**

Celična stena, zunanja plast bakterijskih in glivnih celic, je struktura, ki ni sestavina gostitelja. Mikroorganizmom zagotavlja celično integriteto, deluje proti osmotskemu tlaku citoplazme, določa obliko celice in zagotavlja obrambo pred vplivi okolja. Glavna komponenta bakterijske celične stene je peptidoglikan (PGN), ki je PAMP in ga prepoznajo receptorji prirojene imunosti, med drugim tudi receptorji NOD (4).

Lokacija in struktura PGN se razlikuje med po Gramu pozitivnimi in po Gramu negativnimi bakterijami. Grampozitivne bakterije imajo debelejši (~ 20–80 nm) večplasten



PGN, ki obdaja celično membrano, medtem ko je PGN pri gramnegativnih bakterijah tanjši (~ 10 nm) in se nahaja med celično in zunanjo membrano (4). PGN, njegova zgradba je prikazana na Sliki 2, je glikopeptidni polimer, katerega osnovo predstavlja glikanska veriga iz izmenjajočih se  $\beta$ -(1,4)-povezanih *N*-acetilglukozaminov (NAG) in *N*-acetilmuraminskih kislin (NAM). Povprečna dolžina verige variira med 10 in 65 disaharidnimi enotami, odvisno od vrste bakterije. Glikanske verige so prečno povezane s kratkimi peptidi, vezanimi na NAM. Tipična struktura peptidne verige je sestavljena iz L-alanina (L-Ala), D-glutamata (D-Glu), *mezo*-diaminopimelinske kisline (*meso*-DAP) pri gramnegativnih bakterijah oziroma L-lizina (L-Lys) pri večini grampozitivnih bakterij ter D-alanina (D-Ala). Peptidne verige so med seboj povezane, najpogosteje med  $\epsilon$ -amino skupino tretje aminokisline in karboksilno skupino D-Ala (četrte aminokisline). Povezava je lahko neposredna, pri Grampozitivnih bakterijah pa je pogosta povezava preko vmesnega peptidnega mostička. Prečna povezanost omogoča tvorbo peptidoglikanske mreže okrog bakterije (4, 16).

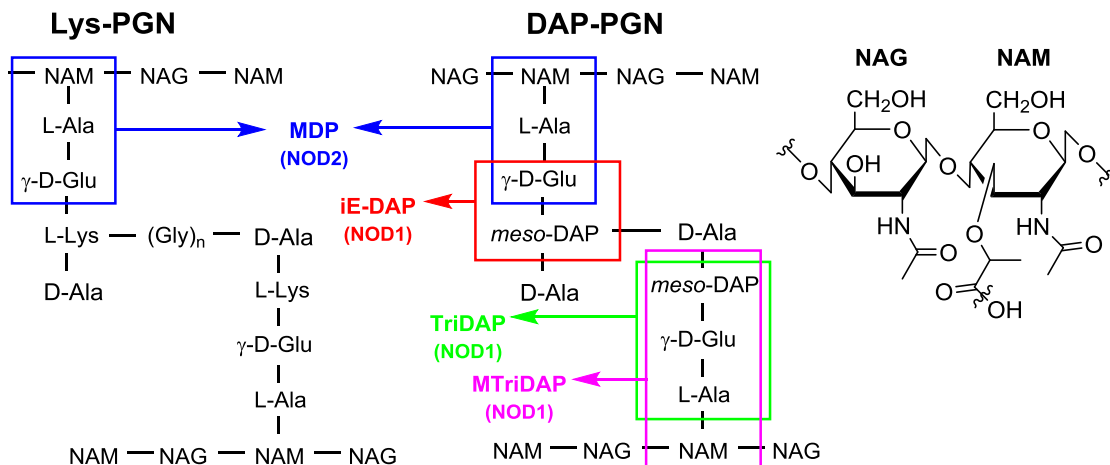
Da bi se bakterije izognile prepoznavi s strani imunskega sistema, spreminjajo svoj PGN. Opazili so dva tipa modifikacij PGN: (i) modifikacije glikanske verige, ki vodijo predvsem v odpornost na katalitično aktivnost lizocimov, in (ii) modifikacije peptidne verige, ki onemogočajo imunsko prepoznavo (4).

### **1.3.1. Muramil dipeptid in receptorska prepoznavna fragmentov peptidoglikana**

Med rastjo, zorenjem in delitvijo celic se PGN delno razgradi, kar povzroči nastanek njegovih krajših fragmentov (muropeptidov), ki se sproščajo v okolico, kjer jih zaznavajo pretežno receptorji NOD (Slika 2) (16). Receptor NOD1 zazna samo fragmente, ki v peptidni verigi vsebujejo *meso*-DAP, torej prepozna samo gramnegativne bakterije in paličaste grampozitivne bakterije – *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium* sp in *Lactobacillus plantarum* (4), medtem ko glikanski del ni nujen za prepoznavo z NOD1. Omenjeni receptor močno aktivira *meso*-DAP vsebujoči tripeptid L-Ala-D-Glu-*meso*-DAP (TriDAP), minimalna struktura, ki je potrebna za aktivacijo, pa je dipeptid  $\gamma$ -D-Glu-*meso*-DAP (iE-DAP) (16).

Receptor NOD2 prepozna PGN preko muramil dipeptida (MDP), minimalnega bioaktivnega motiva PGN, ki je skupen vsem bakterijam. MDP sestoji iz NAM, povezane z dvema aminokislinama: D-Ala in D-iGln (D-izoglutamin) ali D-Glu, torej je fragment, ki

je prisoten v obeh tipih PGN (Lys-PGN in DAP-PGN) (4, 11, 16). *N*-acetil MDP, ki je prisoten v večini bakterij, manj učinkovito aktivira NOD2 kot *N*-glikolil MDP, ki ga najdemo v mikobakterijah in bakterijah iz razreda *Actinomycetes*. NAG je sladkorni del, ki je prisoten tudi v lipopolisaharidih, lipoteihoični in teihoični kislini ter ostalih kompleksnih polisaharidih, zato ta sladkorna enota ni del specifične zaznave PGN preko NOD2 (11).



**Slika 2:** Levo: shematski prikaz strukture peptidoglikana, ki vsebuje L-Lys (Lys-PGN) oziroma *meso*-DAP (DAP-PGN), ter fragmenti, ki jih prepoznajo receptorji NOD; povzeto po (17). Desno: strukturna formula disaharida NAG-NAM; povzeto po (18).

MDP preko vezave na NOD2 aktivira določene tarčne gene in odzive prirojene imunosti (4). Poleg tega MDP vpliva tudi na gostiteljevo fiziologijo. Med drugim inducira povišanje telesne temperature, ki je fiziološki obrambni mehanizem proti okužbam, in povzroča zaspanost (16). Za vezavo na znotrajcelične receptorje NOD2 mora MDP preiti celično membrano. Obstaja več mehanizmov tega prehoda. Celično membrano lahko preide preko membranskih transporterjev, celica gostitelja lahko endocitira MDP ali fagocitira celo bakterijo, MDP pa se lahko sprošča v citozol tudi preko avtolize PGN znotrajceličnih bakterij (11).

## 1.4. Imunoadjuvansi

Cepljenje je najuspešnejši primer uporabe imunoloških načel za ohranjanje zdravja. Antigeni, prisotni v cepivu, spodbudijo razrast specifičnih celic T in B, ki pustijo za seboj populacijo spominskih celic. Te so ključne, da se ob naslednjem srečanju z istim antigenom sproži sekundarni odziv, ki je hitrejši in učinkovitejši od primarnega. Cepiva navadno niso močno imunogena in potrebujejo dodatek adjuvansov. Adjuvans je vsaka

snov, ki vbrizgana z antigenom nespecifično spodbudi ali spremeni imunski odziv na ta antigen (1). Že v prvi polovici 20. stoletja so ugotovili, da nekatere substance, predvsem aluminijeve soli, dodane k antigenu, povečajo proizvodnjo protiteles. Aluminijeve soli so še vedno pogosto uporabljani adjuvansi, a se stremi k razvoju novih, še učinkovitejših (2). Razlogov za tovrstni razvoj je veliko: šibkost antigenov, slabi odzivi na cepiva, možnost zmanjšanja odmerka in toksičnosti antigenov ter dejstvo, da je še vedno veliko infekcijskih bolezni, za katere nimamo učinkovitih cepiv (19). Sicer poznamo številne snovi, ki imajo adjuvantno aktivnost, vendar so le redke primerne za uporabo pri ljudeh, saj so lahko toksične, povzročajo granulome, akutno ali kronično vnetje, citolizo ali pa so pirogene (1). Eden najpomembnejših je Freundov adjuvans, ki ga sestavlja emulzija vode v olju – vodna raztopina antigena je emulgirana v mineralnem olju, kjer so suspendirane mrtve mikobakterije (1, 2). Sestavine mikobakterij, ki imajo adjuvantno aktivnost, so deli celične stene, med katerimi predstavlja *N*-glikolil MDP minimalno učinkovito komponento (1, 20). Veliko bakterijskih komponent, vključno s PGN, sodi med dobre adjuvance, čeprav niso dobri imunogeni (2). Vežejo se namreč na receptorje PRR, ki so del prirojenega imunskega sistema, kar sicer sproži proizvodnjo različnih citokinov in kemokinov ter aktivacijo APC, in tako usmerjajo odzive pridobljene imunosti (19, 21). Minimalne podenote peptidoglikana, ki izkazujejo adjuvantno delovanje, so ligandi receptorjev NOD1 in NOD2. Na žalost ima Freundov adjuvans preveč neželenih učinkov, da bi ga lahko uporabljali pri ljudeh (20). Adjuvansi nove generacije vključujejo sintezne aktivatorje PRR in rekombinantne citokine, kot so IL-12, IL-1 in IFN- $\gamma$  (2).

MDP lahko sam ali v kombinaciji z drugimi spojinami poveča odpornost proti nekaterim virusom, bakterijam, glivam in tumorjem (20). Za razliko od aluminijevih soli, ki spodbujajo samo humoralno imunost, pa MDP inducira tako humoralne kot tudi celično posredovane imunске odzive (21, 22). MDP je sicer šibkejši imunostimulant od večine ligandov TLR, vendar pa deluje z njimi sinergistično. Ta sinergija je fiziološko zelo pomembna. Tako je MDP v bistvu bolj imunomodulator kot imunostimulant, vendar zaradi njegovih slabosti, kot sta pirogenost in artritogenost, ni primeren za uporabo v humani medicini. Poleg tega uporabo spojine omejujeta slaba celična penetracija in hitra eliminacija, zato skušajo razviti derivate z izboljšanimi farmakološkimi lastnostmi, boljšim varnostnim profilom, vendar pa z ohranjenim imunomodulatornim delovanjem. Številni hidrofilni derivati, kot so murabutid, temurtid, nor-MDP in glukozaminil-MDP, so prišli do

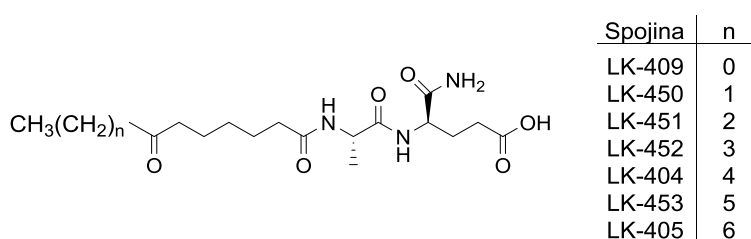
kliničnih študij. Romurtid in muramil tripeptid fosfatidiletanolamin (MTP-PE) sta glavna lipofilna derivata, ki ju je razvila farmacevtska industrija (Priloga IV) (23). Murabutid je varen in apirogen derivat MDP, ki okrepi humoralni odziv in tako poveča imunogenost cepiv. Poleg tega poveča gostiteljevo odpornost proti okužbam, nespecifično odpornost proti tumorjem in indukcijo citokinov, vpletenih v ojačanje imunskega odziva in hematopoeze (npr. CSF). Komercialnega cepiva, ki bi vseboval murabutid kot adjuvans, sicer niso razvili, predstavlja pa nov razred nespecifičnih imunoterapevtikov. Vseeno ima še nekaj slabosti, kot sta hitra eliminacija in slaba biološka uporabnost po peroralni aplikaciji (19, 21).

#### **1.4.1. Dezmuramilpeptidi**

Sinteza derivatov MDP z ohranjenim sladkornim delom je težka, draga in dolgotrajna. Zato je v zadnjem času v ospredju načrtovanje in sinteza dezmuramilpeptidov, derivatov MDP brez ogljikohidratnega dela. Dokazali so, da sladkorna enota NAM ni nujna za aktivacijo NOD2, kot so sprva mislili, zato jo lahko zamenja tudi ustrezna aromatska struktura. Farmakofor L-Ala-D-iGln je ključen za imunostimulatorno delovanje. Za ohranitev tega delovanja so dovoljene le omejene spremembe v tipu aminokislin (npr. zamenjava L-Ala z L-Val (L-valin) ali D-iGln z D-Gln (D-glutamin)) in praktično nobene spremembe konfiguracije, kar kaže na stereoselektivno prepoznavo (22, 24). MDP vstopa v celico med drugim tudi s peptidnimi transporterji, kot je npr. hPepT1. Dezmuramilpeptidi niso substrati tega transporterja, zato vstopajo v celico s pasivnim transportom, pri čemer je zelo pomemben dejavnik lipofilnost molekule. Ker se NOD2 nahaja v citozolu, je smiselno razviti bolj lipofilne dezmuramilpeptide in s tem olajšati njihov pasivni transport preko celične membrane. Prav tako so študije pokazale, da lahko uvedba lipofilnih substituentov v molekulo MDP poveča njeno adjuvantno aktivnost (21). Pomanjkanje podatkov o vezavnem mestu MDP otežuje strukturno podprto načrtovanje novih analogov, zato je preučevanje odnosa med strukturo in delovanjem znanih imunomodulatorjev oziroma načrtovanje na osnovi liganda edini možen način načrtovanja tovrstnih učinkovin (21, 23).

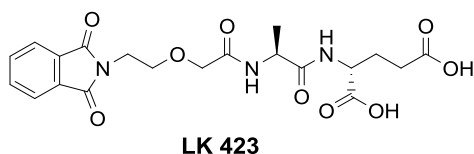
Sollner in sodelavci so proučevali vpliv lipofilnosti spojin na njihovo imunološko aktivnost. Sintetizirali so dezmuramildipeptide, in sicer so dipeptid L-Ala-D-iGln acilirali z različnimi 7-okso maščobnimi kislinami – od 7-oksooktanojske do 7-oksotetradekanojske kisline (Slika 3). Lipofilnost so povečevali s postopnim podaljševanjem njihovega

alkilnega dela, medtem ko pozicije karbonilne skupine (razdalje do dipeptidnega dela) niso spreminjali. Domnevali so, da karbonilna skupina na mestu 7 acilnega dela nadomešča karbonilno skupino *N*-acilne skupine v MDP in da ima pomembno vlogo v procesu prepoznavne in vezave. Lipofilnost ima pomemben vpliv na jakost spojin, saj pripomore k daljšemu delovanju in boljši interakciji z biološkimi membranami (25). Spojina **LK-409** je imela ohranjene imunomodulatorne lastnosti, a je bila apirogena, kar kaže na to, da je za pirogenost MDP odgovoren *N*-acetilmuramilni del (25, 26). Bolj lipofilna spojina **LK-404** je predstavljala najbolj aktivno spojino iz omenjene serije sintetiziranih spojin. Še dodatno večanje lipofilnosti pa je zmanjšalo biološko aktivnost (25).



**Slika 3:** Serija *N*-(7-oksoacil)-L-alanil-D-izoglutaminov; povzeto po (25).

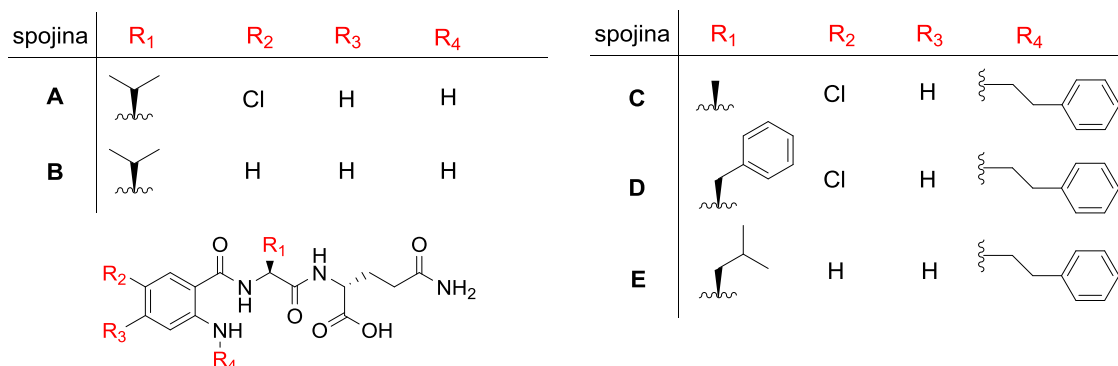
Nekatere spojine, ki vsebujejo ftalimidni fragment, lahko vplivajo na imunski sistem. Gobec in sodelavci so domnevali, da lahko povezava ftalimidnega obroča s ključnim dipeptidnim delom molekule MDP privede do novih imunomodulatorjev z izboljšanimi farmakološkimi lastnostmi. Proučevali so spojine, ki so imele *N*-acetilmuramilni del zamenjan s ftalimidnim fragmentom, vezanim na alkanosko kislino. Kot obetavna se je izkazala spojina **LK 423** (Slika 4), ki je tako postala kandidat za razvoj protivnetnih učinkovin. Sintetizirali so več ftalimido-dezmuramildipeptidov, podobnih **LK 423**, ki so vplivali na proizvodnjo citokinov *in vitro*. Nobena od testiranih spojin ni delovala citotoksično na celično linijo normalnih človeških endotelijskih celic, kar kaže na njihov potencial za uporabo *in vivo* (27).



**Slika 4:** Struktura spojine LK 423; povzeto po (27).

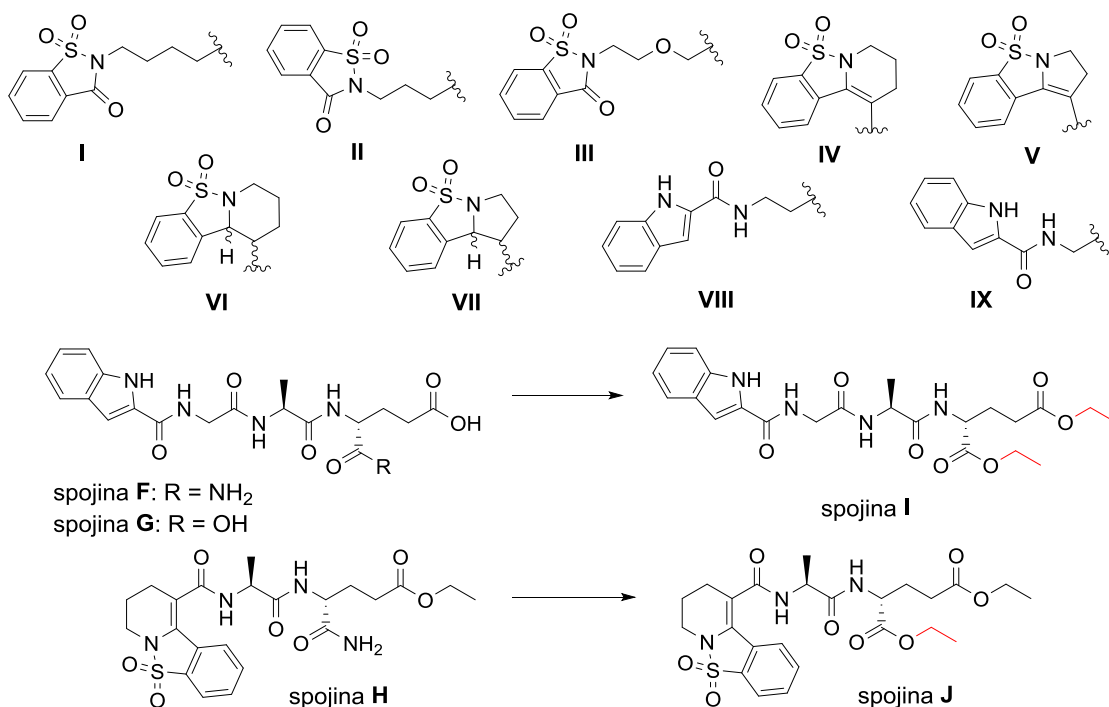
Zhao in sodelavci so sintetizirali serijo dezmuramildipeptidov, pri katerih so sladkorni del zamenjali z aromatsko skupino, aminokislino D-iGln z D-Gln, na njen N-terminalni konec

pa so pripeli razne lipofilne aminokisljine (L-valin, L-alanin, L-fenilalanin, L-levcin in L-izolevcin). Te so skupaj z lipofilno aromatsko skupino imele vlogo povečanja prehoda spojin skozi celično membrano. Z dobro adjuvantno aktivnostjo je izstopalo pet sintetiziranih spojin (A–E), izmed katerih so spojine C, D in E pokazale najmočnejše adjuvantne lastnosti (Slika 5) (22).



Slika 5: Pet sintetiziranih dezmuramildipeptidov (A–E) z aromatsko skupino, ki so izkazali najboljšo adjuvantno aktivnost; povzeto po (22).

Podobno je Jakopin s sodelavci pri sintezi dezmuramildipeptidov nadomestil *N*-acetilmuramilni del z različnimi heteroaromatskimi skupinami (Slika 6).



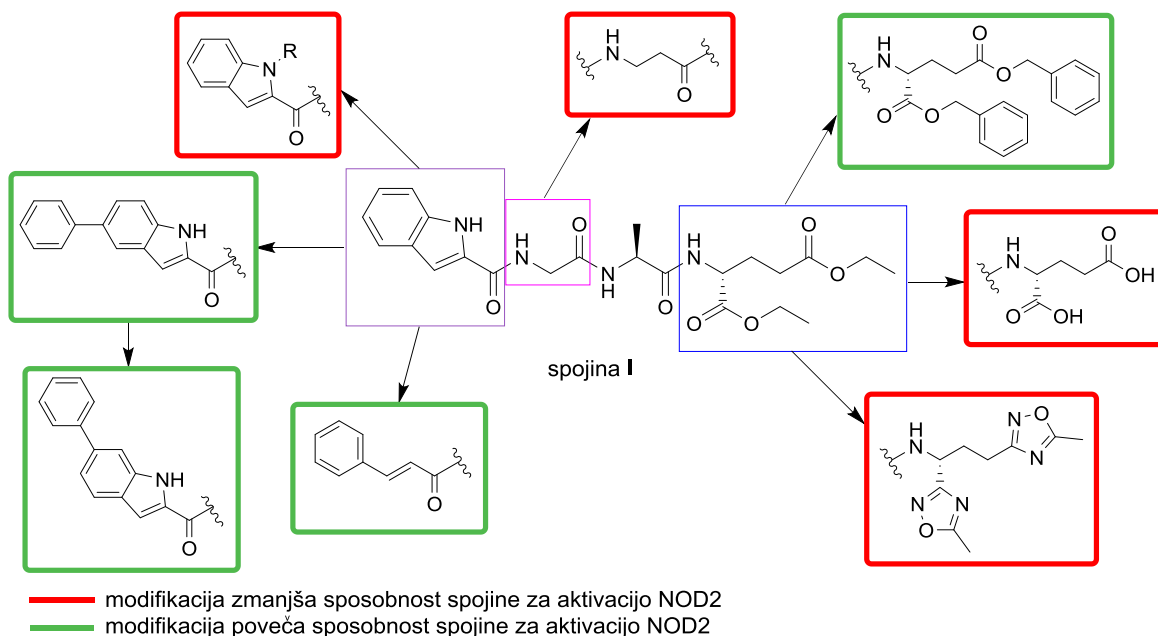
Slika 6: Heteroaromske skupine, ki so jih kot nadomestke *N*-acetilmuramilne skupine vezali na dipeptidni del preko amidne vezi, ter primeri sintetiziranih dezmuramildipeptidov, ki so izkazali dobre imunomodulatorne lastnosti; povzeto po (21, 23).

Uporabili so saharinski obročni sistem, ki so ga vezali na konec alkilne verige različno dolgih alkanojških kislin (**I–III**). S tem so želeli ohraniti specifičen položaj karbonilne skupine *N*-acetilmuramilnega dela MDP, ki naj bi bila ključna za prepoznavo receptorja in vezavo nanj. Alkilno verigo so nato vključili v pirido- oziroma pirolo-kondenziran [1,2]benzotiazolni obročni sistem (**IV–VII**), ki je pripomogel h konformacijski restrikciji saharinskih analogov. Sintetizirali so še analoge, v katerih so na dipeptidni del pripeli indol-2-ilkarboksamidni fragment (**VIII, IX**). Mimetike sladkornega dela so pripeli na oba možna dipeptidna dela (L-Ala-D-iGln in L-Ala-D-Glu) ter na 1,2,4-oksadiazolni dipeptidomimetik. Nekatere sintetizirane spojine so na celice THP-1 delovale, in sicer so šibko povečale izločanje TNF- $\alpha$ , inducirano z lipopolisaharidi. Tako aktivnost so izkazale spojine s substituenti **I, III, IV** in **VI** ter spojini **F** in **G** (Slika 6), pri katerih je indol-2-karboksamidni substituent oddaljen od dipeptida za dva ogljikova atoma (substituent **IX**). Od sintetiziranih spojin je imela največjo aktivnost spojina **F**, vendar ni dosegala učinkovitosti MDP in murabutida. Sklepali so, da odsotnost *N*-acetilmuramilnega dela vpliva na prepoznavo receptorja in vezavno kapaciteto oziroma zmanjša prehodnost spojin v celico (dezmuramildipeptidi niso substrati transportnih proteinov), kar posledično zmanjša njihovo aktivnost. Na človeških perifernih krvnih mononuklearnih celicah (PBMC) so še dodatno ocenili, kakšen vpliv imajo sintetizirane spojine na proizvodnjo vnetnih citokinov. Spojini **F** in **G** sta delovali imunosupresivno, saj sta zmanjšali obseg sinteze citokinov, medtem ko je spojina **H** delovala imunostimulatoro in povečala proizvodnjo številnih vnetnih citokinov, vključno s TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  in IL-8. Nobena od spojin ni bila citotoksična pri najvišji testirani koncentraciji (23).

Spojine, ki so pokazale dobro aktivnost, so nato uporabili v naslednji raziskavi. Za heteroaromske mimetike *N*-acetilmuramilnega dela so uporabili substituent **I, III, IV** in **IX** (Slika 6). Tokrat so proste karboksilne skupine na iGln oziroma Glu zaestrili z etilno skupino in s tem še dodatno povečali lipofilnost spojin. Tiste, ki vsebujejo L-Ala-D-Glu, so bolj lipofilne in so se izkazale za bistveno učinkovitejše od spojin z L-Ala-D-iGln, ki so bile popolnoma neaktivne. Delovanje sintetiziranih spojin so preverili na celicah HEK-Blue, ki prekomerno izražajo receptor NOD2, pozitivno kontrolo pa je predstavljal murabutid. Transkripcijsko aktivnost NF- $\kappa$ B sta poleg murabutida statistično značilno povečali spojini **I** in **J** (Slika 6), saj sta povečali izločanje IL-1 $\beta$  in IL-12p70, medtem ko je spojina **I** povečala tudi izločanje TNF- $\alpha$ . Kot najboljši sta se torej izkazali spojini **I** in **J**, za

najbolj obetavno spojino pa so izbrali spojino **I**, ki kot nadomestek sladkorne enote vsebuje indol-glicinski fragment (21).

V nadaljnji raziskavi so kot vodnico uporabili spojino **I**. Sintetizirane spojine so testirali na celični liniji HEK-Blue NOD2 in opazovali, kako njene majhne strukturne spremembe (Slika 7) vplivajo na povečanje aktivacije NOD2 v primerjavi z netretiranimi celicami in s pozitivno kontrolo MDP (24).



**Slika 7:** Strukturne spremembe spojine **I** in njihov vpliv na sposobnost za aktivacijo NOD2; povzeto po (24).

Spojina **I** je imela 5,20-krat, MDP pa 11,5-krat večjo sposobnost aktivacije NOD2 kot negativna kontrola. Uvedba alkilnega fragmenta na indolni dušik se ni pokazala kot učinkovita. Kot ugodna zamenjava sladkorne enote se je poleg indolnega izkazal še cinaoilni fragment, ki je povečal aktivacijo NOD2 za 7,37-krat. Sintetizirali so še 5-substituirane indolne derivate in ugotovili, da fenilni substituent znatno poveča aktivnost spojine (10,4-krat večja aktivacija NOD2). Kot najmočnejši agonist NOD2 iz serije sintetiziranih spojin pa se je izkazal njegov 6-fenilsubstituiran regioizomer, in sicer z 11,2-krat večjo sposobnostjo aktivacije NOD2. Rezultati kažejo, da je orientacija lipofilnega fenilnega substituenta na indolnem obroču pomemben dejavnik, ki vpliva na aktivnost spojine. Spremembe v peptidnem delu so se izkazale kot neugodne, saj je podaljšanje glicina za eno metilno skupino praktično izničilo agonistično aktivnost spojine. Ustrezna dolžina glicinskega dela je prav tako kritičen dejavnik, ki prispeva k NOD2-agonistični

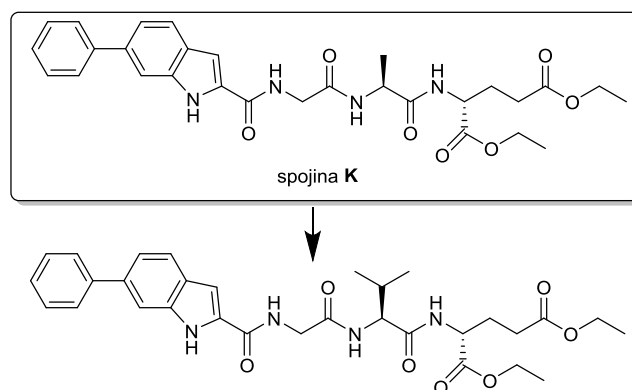


aktivnosti celotne molekule. Na splošno velja, da tvorba estrov kot predzdravil lahko olajša pasivni transport preko celične membrane, zato so testirali še ta aspekt povečanja lipofilnosti. Proste karboksilne skupine na D-Glu so zmanjšale NOD2-agonistično aktivnost, kar potrjuje potrebo po prisotnosti estrske skupine. Kot dober agonist NOD2 se je izkazal analog, ki je imel obe karboksilni skupini zaestreni z benzilnim fragmentom. Analog z na hidrolizo odpornim 1,2,4-oksadiazolnim nadomestkom estra skoraj ni imel agonistične aktivnosti, kar je dodatno potrdilo za domnevo, da so zaestreni derivati praktično predzdravila in da je njihova povečana aktivacija NOD2 verjetno posledica lažjega dostopa do znotrajceličnega receptorja. Sintetizirane spojine niso bile citotoksične (24). Študija je pokazala, da sta dezmuramilpeptida s 6-fenilindolnim in cinamoilnim substituentom zanimiva kandidata za nadaljnje raziskave. Iz teh dveh spojin smo izhajali tudi pri načrtovanju naših dezmuramilpeptidnih derivatov.

## 2. NAČRT ZA DELO

Sintetizirali bomo več dezmuramilpeptidnih analogov, mimetikov muramil dipeptida in potencialnih imunoadjuvansov. Spojine bomo nato fizikalno-kemijsko, spektroskopsko in biološko ovrednotili.

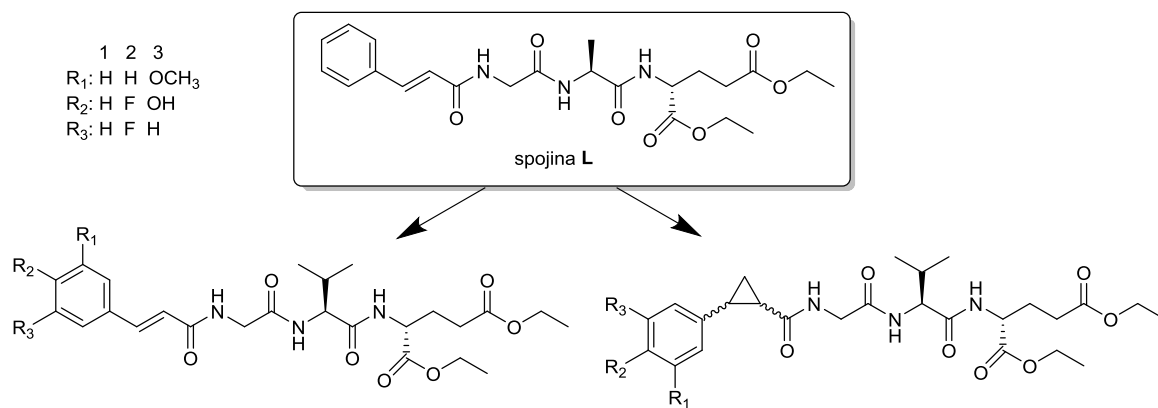
Spojini zadetka (ang. hit), ki delujeta kot agonista receptorjev NOD2, sta med drugim tudi dietil (6-fenil-1*H*-indol-2-karbonil)glicil-L-alanil-D-glutamat (spojina **K**) in dietil cinamoilglicil-L-alanil-D-glutamat (spojina **L**). Navedeni spojini bomo nekoliko modificirali in ju s tem poskušali optimizirati (Sliki 8 in 9). V tripeptidnem zaporedju bomo zamenjali eno aminokislino, in sicer L-alanin z L-valinom, ter s tem nekoliko povečali lipofilnost spojin. Najprej bomo sintetizirali tripeptidni fragment ter nato z njim in z ustrezno karboksilno kislino tvorili amidno vez. Sintetizirali bomo spojini z nespremenjenim 6-fenil-1*H*-indol-2-karbonilnim oziroma cinamoilnim fragmentom in spojine s substituiranim fenilnim obročem cinamoilnega fragmenta. Sintetizirali bomo še strukturno sorodne spojine, v katerih bomo dvojno vez cinamoilnega fragmenta nadomestili s ciklopropanom. Ker imamo konjugiran sistem, se s ciklopropanacijo dvojne vezi namreč lahko izognemo morebitnima nadaljnjima reakcijama, in sicer 1,2-adiciji in Michaelovi (1,4-) adiciji. Ciklopropanacijo *trans*-ferulične kisline bomo z reakcijo Corey-Chaykovsky izvedli sami, medtem ko so ostale uporabljene karboksilne kisline komercialno dostopne.



Slika 8: Modifikacija spojine K.

Katja Peric:

*Načrtovanje in sinteza aciliranih analogov tripeptida Gly-L-Val-D-Glu kot agonistov receptorja NOD2*



**Slika 9: Modifikacija spojine L in raziskovanje kemijskega prostora.**

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1. Materiali

- **Reagenti in topila**

Pri eksperimentalnem laboratorijskem delu smo uporabljali kemikalije naslednjih proizvajalcev: Acros Organics, Carlo Erba, Gram-mol, Fluka, Janssen, Merck, Panreac in Sigma-Aldrich.

- **Laboratorijska oprema**

- tehtnica: Mettler Toledo PG803
- analitska tehtnica: Mettler Toledo AG245
- magnetno mešalo z grelnikom: IKA Labortechnik RCT basic
- rotavapor: Büchi Rotavapor R-114 ter Büchi Waterbath B-480
- UV svetilka: Lamag UV-CABINET II
- žarilna pištola SKILL 1.800 Watt
- sušilnik: Instrumentaria sterimatic ST-11

- **Nomenklatura in risanje spojin**

Za risanje in poimenovanje spojin smo uporabili računalniški program ChemBioDraw Ultra 13.0, ki ga je razvilo podjetje CambridgeSoft.

#### 3.2. Metode

##### 3.2.1. Kromatografske metode

- **Tankoplastna kromatografija (TLC)**

Za izvajanje tankoplastne kromatografije smo uporabljali plošče Silica gel 60 F<sub>245</sub> velikosti 20 x 20 cm z 0,22 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu (proizvajalec: Merck). Spojine smo na kromatografskih ploščah detektirali z UV svetilko pri valovnih dolžinah 254 nm in 366 nm ter z uporabo orositvenega reagenta ninhidrina za detekcijo aminov in karbamatov. S tankoplastno kromatografijo smo spremljali potek reakcij, izolacijo spojin ter njihovo čiščenje s kolonsko kromatografijo.

Za razvijanje kromatogramov smo uporabljali različne mobilne faze:

- diklorometan : metanol = 9 : 1

- diklorometan : metanol = 9 : 1 + 4 kapljice očetne kisline
- acetonitril : metanol : voda = 6 : 1 : 1
- heksan : etilacetat = 1 : 1

#### • **Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)**

Analize HPLC smo izvajali na instrumentu Agilent Technologies HP 1100 z UV-VIS detektorjem G1365B (254 nm), kolono Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm delci) ob uporabi predkolone in pri pretoku 1 mL/min. Kot eluent smo uporabili zmes acetonitrila in 0,1 % vodne raztopine trifluoroocetne kisline, 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 in <sup>13</sup>C NMR spektre smo posneli na spektrometru Bruker AVANCE III. Spektre smo snemali pri 295 K, <sup>1</sup>H spektre pri 400 MHz, <sup>13</sup>C spektre pa pri 100 MHz. Uporabili smo devterirani topili DMSO-d<sub>6</sub> ali CDCl<sub>3</sub> ter tetrametilsilan (TMS) kot interni standard. Dobljene spektre smo računalniško obdelali s programom MestRec 8.4.6. proizvajalca Mestrelab Research.

##### • **Infrardeča spektroskopija (IR)**

IR spektre smo posneli na spektrometru Nexus FT-IR ter jih računalniško obdelali s programom Omnic E.S.P. 5.2.

##### • **Masna spektrometrija (MS)**

Masne spektre in HR-MS spektre so posneli na spektrometru Q-TOF Premier proizvajalca Waters-Micromass s tehniko ESI na Centru za masno spektrometrijo Instituta »Jožef Stefan« 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.

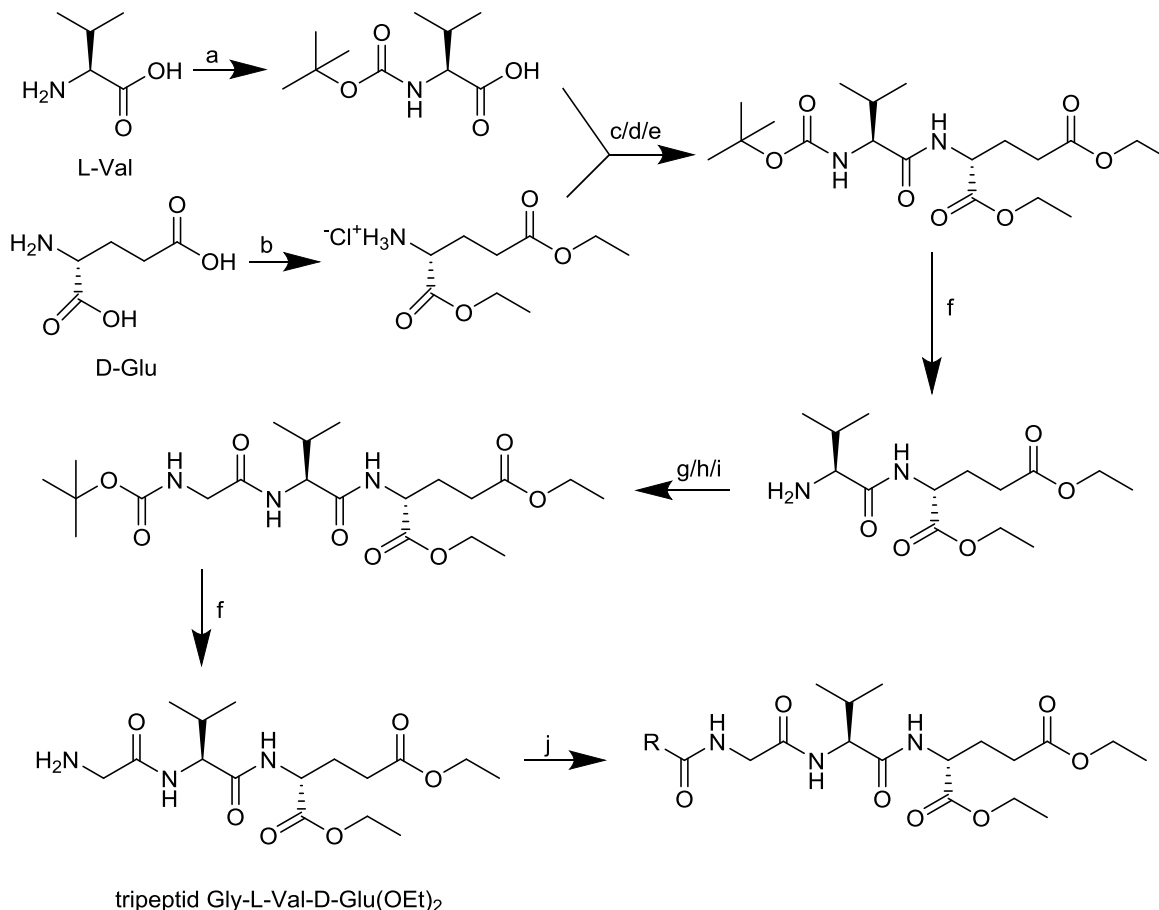
### **3.2.4. Biološko testiranje spojin**

Sintetizirane spojine smo dali biološko ovrednotiti na Katedro za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo 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 (~400.000 celic) so dodali 20 µL 20 µM raztopine sintetiziranih spojin oziroma 20 µM raztopine MDP, pri čemer so kot topilo uporabili gojitveni medij. Testiranje so izvedli v dveh paralelkah (A in B). 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. Sinteza dezmuramilpeptidnih analogov

#### REAKCIJSKA SHEMA



**a:** 1) Boc<sub>2</sub>O, NaOH/H<sub>2</sub>O, dioksan

2) HCl, do pH~2

**b:** SOCl<sub>2</sub>/etanol, 80 °C

**c:** TBTU, DIPEA, DMAP/diklorometan

**d:** DCC, HOBT, DMAP, DIPEA/THF, sobna T → 40 °C

**e:** HOBT, DCC, DIPEA/etilacetat, 0 °C → sobna T

**f:** 1) TFA/diklorometan

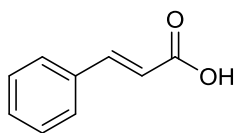
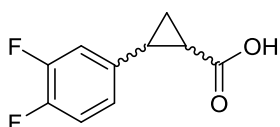
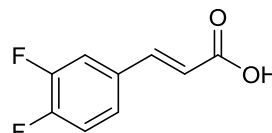
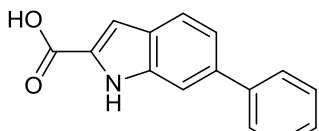
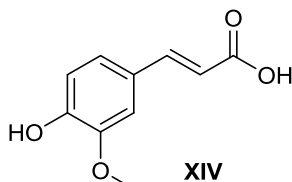
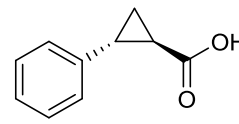
2) DIPEA

**g:** Boc-glicin, TBTU, DIPEA, DMAP/diklorometan

**h:** Boc-glicin, DCC, DIPEA, HOBT, DMAP/diklorometan

**i:** Boc-glicin, HOBT, DCC, DIPEA/etilacetat, 0 °C → sobna T

**j:** R-COOH, EDC×HCl, HOBT, DMAP/diklorometan

**R-COOH:****X****XI****XII****XIII****XIV****XV**

**X:** *trans*-cimetna kislina

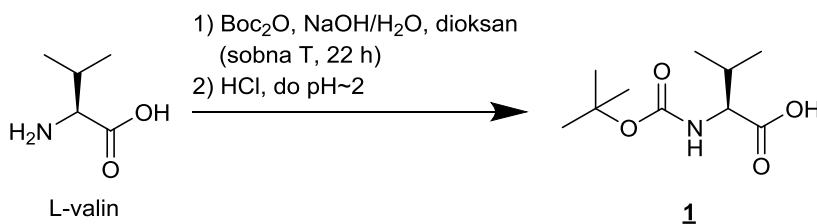
**XI:** 2-(3,4-difluorofenil)ciklopropan-1-karboksilna kislina

**XII:** (*E*)-3-(3,4-difluorofenil)akrilna kislina

**XIII:** 6-fenil-1*H*-indol-2-karboksilna kislina

**XIV:** (*E*)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilna kislina (*trans*-ferulična kislina)

**XV:** *trans*-2-fenilciklopropan-1-karboksilna kislina

**4.1.1. Sinteza (*tert*-butoksikarbonil)-L-valina (**1**)****Reakcija:****Postopek:**

3,512 g (30,0 mmol) L-valina smo raztopili v zmesi 36 mL (1,2 eq; 36,0 mmol) 1M NaOH in 10 mL destilirane vode ter raztopino ohladili na ledeni kopeli. Vanjo smo nato dodali 8,519 g (1,3 eq; 39,0 mmol) di-*tert*-butil dikarbonata, raztopljenega v 30 mL dioksana. Odstranili smo ledeno kopel in mešali pri sobni temperaturi. Po 5 urah mešanja smo v reakcijsko zmes dodali še 5 mL 1 M NaOH, da smo uravnali pH med 9 in 10. Po 22 urah mešanja smo izvedli izolacijo: Reakcijski zmesi smo na rotavaporju odpareli dioksan, ostanek smo prenesli v lij ločnik in ekstrahirali s 30 mL dietil etra. Vodno fazo smo na ledeni kopeli počasi nakisali z 1 M HCl do pH 2–3 in jo nato ekstrahirali s  $3 \times 50$  mL etilacetata. Združene organske faze smo sušili nad natrijevim sulfatom, oddekantirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 6,258 g spojine **1**.



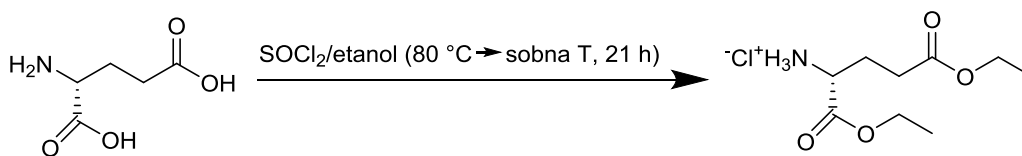
Rezultati	
Izgled	brezbarvna viskozna tekočina
Izkoristek	96,01 % (6,258 g)
M <sub>r</sub> (izračunana)	217,26
Elementna sestava	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>
R <sub>f</sub> (diklorometan : metanol = 9 : 1 + 4 kapljice očetne kisline)	0,60 (orositveni reagent: ninhidrin)

### Referenca za spojino 1:

Thaqi A, McCluskey A, Scott JL: A mild Boc deprotection and the importance of a free carboxylate. Tetrahedron Lett 2008; 49 (49): 6962–6964.

### 4.1.2. Sinteza (*R*)-1,5-dietoksi-1,5-dioksopentan-2-aminijevega klorida (2)

#### Reakcija:



D-glutaminska kislina

**2**

#### Postopek:

V 100 mL bučko smo natehtali 2,942 g (20,0 mmol) D-glutaminske kisline. Raztopili smo jo v 40 mL absolutnega etanola in ohladili na ledeni kopeli. Nato smo ob mešanju počasi dodali 3,20 mL (2,2 eq; 44,0 mmol) tionil klorida. Ko smo vsega dodali, smo odstranili ledeno kopel. Bučko smo prenesli na oljno kopel, jo opremili z vodnim hladilnikom in mešali najprej pri temperaturi 80 °C ter nato pri sobni temperaturi, skupno 21 ur. Produkt (spojino 2) smo izolirali tako, da smo topilo odpareli pod znižanim tlakom. Masa dobljenega produkta je bila 5,207 g.

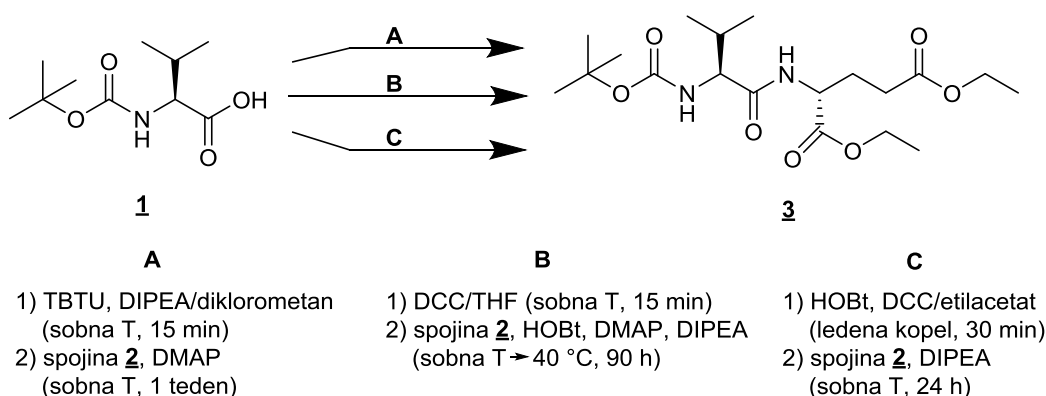
Rezultati	
Izgled	beli kristali
Izkoristek	100 % (5,207 g)
M <sub>r</sub> (izračunana)	239,70
Elementna sestava	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> ClNO <sub>4</sub>
R <sub>f</sub> (acetonitril : metanol : voda = 6 : 1 : 1)	0,64 (orositveni reagent: ninhidrin)

### Referenca za spojino 2:

Tesser GI, Nivard RJF: Synthesis of a completely protected pentapeptide found in bacterial cell walls. Recl Trav Chim Pays-Bas 1964; 84 (1): 53–66.

### 4.1.3. Sinteza dietil (*tert*-butoksikarbonil)-L-valil-D-glutamata (**3**)

#### Reakcija:



#### Postopek A:

V 50 mL bučko smo natehtali 0,986 g (4,54 mmol) spojine **1** in 1,542 g (1,06 eq; 4,80 mmol) TBTU ter ju raztopili v 30 mL diklorometana. Nato smo dodali 2,270 mL (2,87 eq; 13,03 mmol) DIPEA in pustili mešati 15 minut pri sobni temperaturi. V reakcijsko zmes smo nato dodali še 1,044 g (0,96 eq; 4,36 mmol) spojine **2** in katalitično količino DMAP ter pustili mešati pri sobni temperaturi. Po enem tednu mešanja smo izvedli izolacijo. Reakcijski zmesi smo dodali 20 mL diklorometana in jo v liju ločniku spirali z 2 × 20 mL 0,5 M HCl, 1 × 20 mL destilirane vode, 2 × 20 mL nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub>, 1 × 20 mL destilirane vode in 1 × 20 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo nato sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo prefiltrirali in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Dobili smo 0,971 g produkta.

#### Postopek B:

V 50 mL bučko smo natehtali 0,973 g (4,48 mmol) spojine **1** in jo raztopili v 15 mL tetrahydrofurana. Raztopino smo postavili za 10 minut na ledeno kopel, dodali 0,924 g (1,0 eq; 4,48 mmol) DCC, odstranili ledeno kopel in mešali pri sobni temperaturi 15 minut. Nato smo dodali 1,079 g (1,0 eq; 4,50 mmol) spojine **2**, 0,608 g (1,0 eq; 4,50 mmol) HOBt in katalitično količino DMAP. Po 1 uri mešanja pri sobni temperaturi smo reakcijski zmesi dodali še 2,700 mL (3,46 eq; 15,50 mmol) DIPEA ter pustili mešati pri sobni temperaturi še 18 ur. Nato smo bučko prestavili na oljno kopel, jo opremili z vodnim hladilnikom in ob mešanju segrevali pri temperaturi 40 °C še 71 ur ter izvedli izolacijo. Reakcijsko zmes smo najprej prefiltrirali, nato smo z rotavaporjem odpareli tetrahydrofuran in preostanek v bučki raztopili v 20 mL diklorometana. Dobljeno raztopino smo v liju ločniku spirali z 2 × 20

mL 0,5 M HCl, 1 × 20 mL destilirane vode, 2 × 20 mL nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub>, 1 × 20 mL destilirane vode in 1 × 20 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo nato sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo prefiltrirali in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Dobili smo 0,869 g produkta.

### Postopek C:

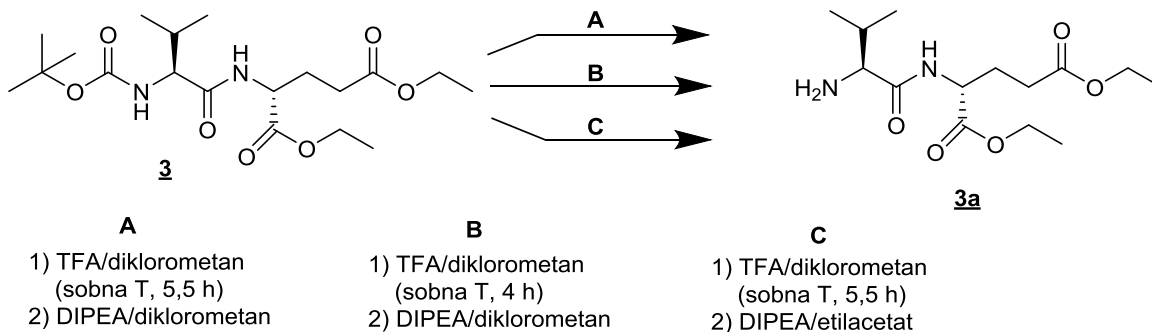
V 100 mL bučko smo natehtali 0,870 g (4,00 mmol) spojine **1** in jo raztopili v 30 mL etilacetata. Raztopini smo dodali 0,540 g (1,0 eq; 4,00 mmol) HOBt in jo ohladili na ledeni kopeli. Dodali smo 0,909 g (1,1 eq; 4,41 mmol) DCC ter pustili mešati 30 minut na ledeni kopeli. Nato smo dodali 0,961 g (1,0 eq; 4,01 mmol) spojine **2**, odstranili ledeno kopel in dodali še 1,395 mL (2,0 eq; 8,01 mmol) DIPEA ter pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 24 urah smo izvedli izolacijo: Reakcijski zmesi smo dodali 15 mL heksana, stresali ter jo postavili za 1 uro v hladilnik. Nato smo jo odnučali in oborino sprali z 2 × 10 mL etilacetata. Matičnico smo v liju ločniku spirali z 2 × 30 mL 1 M HCl, 3 × 25 mL nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub> in 1 × 30 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo nato sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo prefiltrirali in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Dobili smo 1,357 g spojine **3**.

<b>Rezultati</b>	
<b>Izgled</b>	rumenobelo strjeno olje
<b>Izkoristek</b>	A) 55,33 % (0,971 g) B) 48,20 % (0,869 g) C) 84,29 % (1,357 g)
<b>M<sub>r</sub></b> (izračunana)	402,48
<b>Elementna sestava</b>	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
<b>MS (ESI)</b>	m/z = 401,2 [M-H] <sup>-</sup>
<b>HR-MS</b>	401.2280 (izračunana: 401.2288) za C <sub>19</sub> H <sub>33</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
<b>R<sub>f</sub></b> (diklorometan : metanol = 9 : 1)	0,60 (orositveni reagent: ninhidrin)
<b><sup>1</sup>H NMR</b> (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ [ppm] = 0.83–0.86 (m, 6H, 2 × CH <sub>3</sub> -Val), 1.15–1.20 (m, 6H, 2 × CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.39 (s, 9H, Boc), 1.79–2.04 (m, 3H, CH <sub>2</sub> -β-Glu in CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 2.36 (t, 2H, J = 7.6 Hz, CH <sub>2</sub> -γ-Glu), 3.78–3.82 (m, 1H, α-CH), 4.02–4.11 (m, 4H, 2 × CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 4.19–4.25 (m, 1H, α-CH), 6.64 (d, 1H, J = 5.6 Hz, Boc-NH), 8.24 (d, 1H, J = 7.6 Hz, NH-Glu)

#### 4.1.4. Sinteza dietil (*tert*-butoksikarbonil)glicil-L-valil-D-glutamata (**4**)

##### Odstranjevanje Boc zaščite na spojini 3:

##### Reakcija:

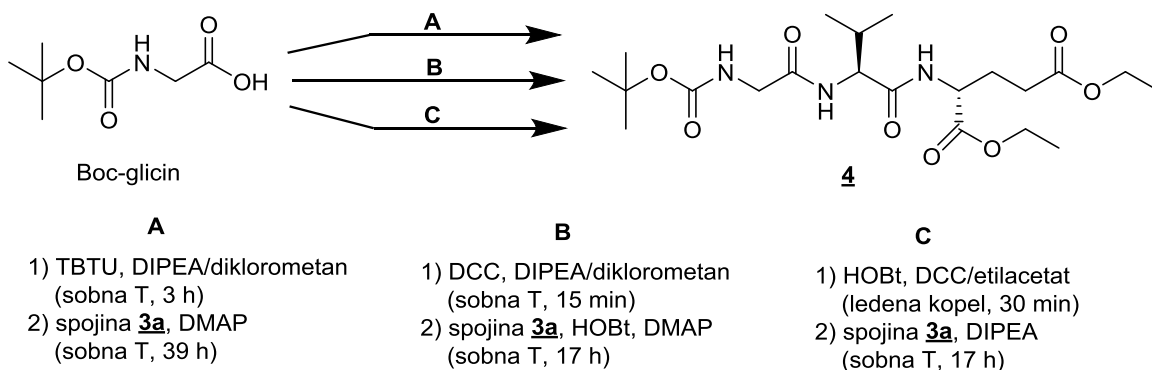


##### Postopek:

Določeno količino spojine **3** (**A**: 0,878 g (0,93 eq; 2,18 mmol); **B**: 0,869 g (1,0 eq; 2,16 mmol); **C**: 1,357 g (1,0 eq; 3,37 mmol)) smo raztopili v 8 mL diklorometana, raztopino prelili v 50 mL bučko in jo ohladili na ledeni kopeli. Nato smo ob mešanju počasi dodali 1,5 mL trifluoroocetne kisline, odstranili ledeno kopel in pustili mešati pri sobni temperaturi. Če smo po 4 urah na TLC-ju še vedno zaznali izhodno spojino, smo po kapljicah dodali še 1 mL trifluoroocetne kisline in pustili mešati še 1,5 ure. Nato smo na rotavaporju odpareli topilo in trifluoroocetno kislino. Dobljeno rumenkasto tekočino smo raztopili v 15 mL dietil etra, ki smo ga nato odpareli pod znižanim tlakom, in to ponovili še dvakrat. Preostanek, ki smo ga dobili po rotavapiranju, smo raztopili v 10 mL topila (diklorometana oziroma etilacetata), dodali 4,0 eq DIPEA (**A**: 1,630 mL (9,36 mmol); **B**: 1,500 mL (8,61 mmol); **C**: 2,350 mL (13,49 mmol)) in raztopino prelili v bučko, kjer smo predhodno aktivirali Boc-glicin.

##### Aktivacija Boc-glicina in sinteza spojine 4:

##### Reakcija:



#### **Postopek A:**

V 100 mL bučko smo natehtali 0,411 g (2,35 mmol) Boc-glicina, ga raztopili v 20 mL diklorometana, dodali 0,825 g (1,1 eq; 2,57 mmol) TBTU in 0,410 mL (1,0 eq; 2,35 mmol) DIPEA ter pustili mešati pri sobni temperaturi 3 ure. V bučko smo nato prilili vsebino bučke s spojino **3a** (odščiteno spojino **3**), dodali katalitično količino DMAP ter ponovno pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 39 urah smo izvedli izolacijo po naslednjem postopku: Reakcijski zmesi smo dodali 20 mL diklorometana in jo v liju ločniku spirali z 2 × 20 mL 0,5 M HCl, 1 × 20 mL destilirane vode, 2 × 20 mL nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub>, 1 × 20 mL destilirane vode in 1 × 20 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo nato sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo prefiltrirali in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Dobljeno rumenkasto viskozno tekočino smo očistili s kolonsko kromatografijo in izolirali 0,338 g spojine **4**.

#### **Postopek B:**

V 100 mL bučko smo natehtali 0,378 g (2,16 mmol) Boc-glicina, ga raztopili v 20 mL diklorometana ter raztopino postavili za 10 minut na ledeno kopel. Nato smo ob mešanju dodali 0,446 g (1,0 eq; 2,16 mmol) DCC in 0,380 mL (1,0 eq; 2,18 mmol) DIPEA ter odstranili ledeno kopel. Pustili smo mešati 15 minut pri sobni temperaturi in nato v bučko prilili vsebino bučke s spojino **3a** (odščiteno spojino **3**). Dodali smo še 0,294 g (1,0 eq; 2,18 mmol) HOBt in katalitično količino DMAP ter ponovno pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 17 urah smo izvedli izolacijo po naslednjem postopku: Reakcijsko zmes smo prefiltrirali, ji dodali 20 mL diklorometana in jo v liju ločniku spirali z 2 × 20 mL 0,5 M HCl, 1 × 20 mL destilirane vode, 2 × 20 mL nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub>, 1 × 20 mL destilirane vode in 1 × 20 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo nato sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo prefiltrirali in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Dobljeno rumeno snov smo očistili s kolonsko kromatografijo in izolirali 0,071 g spojine **4**.

#### **Postopek C:**

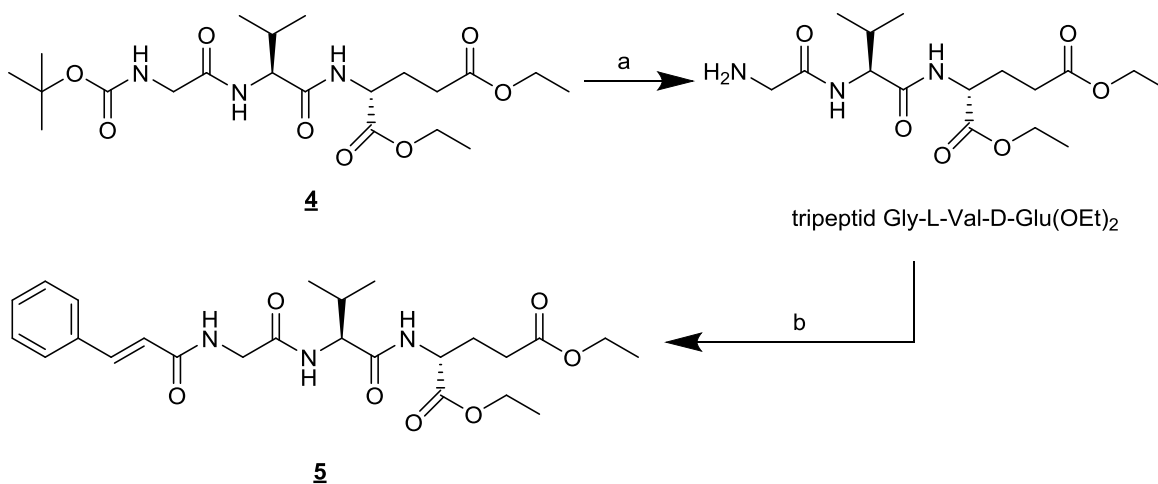
V 100 mL bučko smo natehtali 0,590 g (3,37 mmol) Boc-glicina in ga raztopili v 20 mL etilacetata. Raztopini smo dodali 0,455 g (1,0 eq; 3,37 mmol) HOBt in jo ohladili na ledeni kopeli. Dodali smo 0,765 g (1,1 eq; 3,71 mmol) DCC ter pustili mešati 30 minut na ledeni kopeli. Nato smo ledeno kopel odstranili in v bučko prilili vsebino bučke s spojino **3a** (odščiteno spojino **3**). Dodali smo še 0,590 mL (1,0 eq; 3,39 mmol) DIPEA ter pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 17 urah smo izvedli izolacijo: Reakcijski zmesi smo

dodali 15 mL heksana, stresali in jo postavili za 3,5 ure v hladilnik. Nato smo jo odnučali in oborino sprali z  $2 \times 10$  mL etilacetata. Matičnico smo v liju ločniku spirali z  $2 \times 30$  mL 1 M HCl,  $3 \times 25$  mL nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub> in  $3 \times 30$  mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo nato sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo prefiltrirali in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Dobili smo 1,263 g spojine **4**.

Rezultati	
Izgled	rumenobela amorfna snov
Izkoristek	A) 33,73 % (0,338 g) B) 7,15 % (0,071 g) C) 81,54 % (1,263 g)
M <sub>r</sub> (izračunana)	459,54
Elementna sestava	C <sub>21</sub> H <sub>37</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub>
MS (ESI)	m/z = 458.2 [M-H] <sup>-</sup>
HR-MS	458.2496 (izračunana: 458.2502) za C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub>
R <sub>f</sub> (diklorometan : metanol = 9 : 1)	0,45 (orositveni reagent: ninhidrin)
T <sub>tališča</sub>	75–78 °C
IR	3280, 2976, 1738, 1645, 1517, 1449, 1368, 1331, 1248, 1164, 1022, 858, 670 cm <sup>-1</sup>
<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ [ppm] = 0.81–0.86 (m, 6H, 2 × CH <sub>3</sub> -Val), 1.16–1.20 (m, 6H, 2 × CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.39 (s, 9H, Boc), 1.78–1.87 (m, 1H, CH <sub>2</sub> <sub>A</sub> -β-Glu), 1.92–2.04 (m, 2H, CH <sub>2</sub> <sub>B</sub> -β-Glu in CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 2.36 (t, 2H, J = 7.6 Hz, CH <sub>2</sub> -γ-Glu), 3.58 (d, 2H, J = 6.0 Hz, NHCH <sub>2</sub> ), 4.01–4.11 (m, 4H, 2 × CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 4.23–4.28 (m, 2H, α-CH-Val in α-CH-Glu), 7.03 (t, 1H, J = 5.6 Hz, Boc-NH), 7.58 (d, 1H, J = 8.8 Hz, NH), 8.41 (d, 1H, J = 7.6 Hz, NH)

#### 4.1.5. Sinteza dietil cinamoilglicil-L-valil-D-glutamata (**5**)

##### Reakcija:



**a:** 1) TFA/diklorometan (sobna T, 3 h)

2) DIPEA/diklorometan

**b:** *trans*-cimetna kislina, EDC×HCl, HOBt, DMAP (sobna T, 18,5 h)

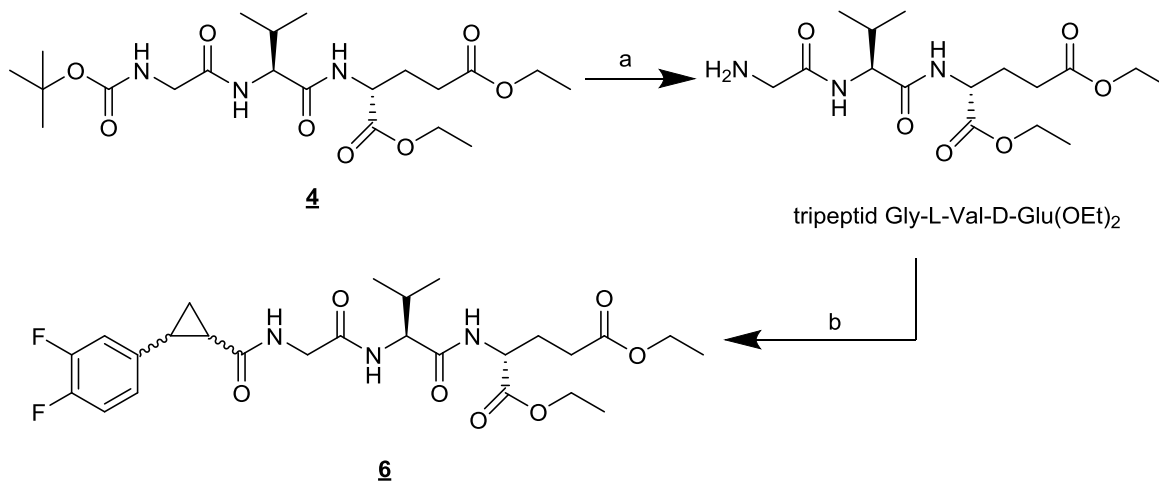
**Postopek (odstranjevanje Boc zaščite na spojini 4 in sinteza spojine 5):**

V 25 mL bučko smo natehtali 90 mg (0,196 mmol) spojine 4, jo raztopili v 2 mL diklorometana in jo ohladili na ledeni kopeli. Nato smo ob mešanju po kapljicah dodali 0,5 mL trifluoroocetne kisline, odstranili ledeno kopel in pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 3 urah smo topilo in trifluoroocetno kislino odpareli pod znižanim tlakom. Ostanek smo trikrat suspendirali v 10 mL dietil etra, ki smo ga ravno tako odpareli pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo raztopili v 5 mL diklorometana, ohladili na ledeni kopeli in dodali 0,170 mL (4,98 eq; 0,976 mmol) DIPEA. Nato smo dodali še 30 mg (1,03 eq; 0,202 mmol) *trans*-cimetne kisline, 40 mg (1,06 eq; 0,209 mmol) EDC×HCl, 27 mg (1,02 eq; 0,200 mmol) HOBt in katalitično količino DMAP, odstranili ledeno kopel ter pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 18,5 urah smo izvedli izolacijo po naslednjem postopku: Reakcijski zmesi smo dodali še 20 mL diklorometana in jo v liju ločniku spirali z 2 × 15 mL 1 M HCl, 1 × 15 mL destilirane vode, 2 × 15 mL nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub>, 1 × 15 mL destilirane vode in 1 × 15 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo nato sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo prefiltrirali in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Dobili smo 58 mg spojine 5.

<b>Rezultati</b>	
<b>Izgled</b>	bela amorfna snov
<b>Izkoristek</b>	60,42 % (58 mg)
<b>M<sub>r</sub></b> (izračunana)	489,57
<b>Elementna sestava</b>	C <sub>25</sub> H <sub>35</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>
<b>MS (ESI)</b>	m/z = 488.2 [M-H] <sup>-</sup>
<b>HR-MS</b>	488.2393 (izračunana: 488.2397) za C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>
<b>R<sub>f</sub></b> (diklorometan : metanol = 9 : 1)	0,35 (orositveni reagent: ninhidrin)
<b>HPLC</b> (254 nm)	100,00 % (t <sub>R</sub> = 12,68 min)
<b>T<sub>tališča</sub></b>	157–160 °C
<b>IR</b>	3266, 3069, 2965, 1730, 1689, 1640, 1612, 1528, 1448, 1392, 1213, 1162, 1110, 1022, 977, 861, 766, 733, 694, 664 cm <sup>-1</sup>
<b><sup>1</sup>H NMR</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ [ppm] = 0.94–0.99 (m, 6H, 2 × CH <sub>3</sub> -Val), 1.18–1.24 (m, 6H, 2 × CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.99–2.08 (m, 1H, CH <sub>2</sub> <sub>A</sub> -β-Glu), 2.14–2.23 (m, 2H, CH <sub>2</sub> <sub>B</sub> -β-Glu in CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 2.33–2.47 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -γ-Glu), 4.04–4.32 (m, 6H, NHCH <sub>2</sub> in 2 × CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 4.53–4.62 (m, 2H, α-CH-Val in α-CH-Glu), 6.63 (d, 1H, J = 15.6 Hz, CH=CHCO), 7.32–7.34 (m, 4H, 3 × H-Ar in NHCH <sub>2</sub> ), 7.45 (d, 1H, J = 8.8 Hz, NH), 7.49–7.51 (m, 2H, 2 × H-Ar), 7.62–7.66 (m, 2H, CH=CHCO in NH)
<b><sup>13</sup>C NMR</b> (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ [ppm] = 14.11, 14.14, 17.95, 19.33, 26.90, 30.40, 31.23, 43.63, 51.86, 58.50, 60.74, 61.59, 120.22, 127.92, 128.81, 129.76, 134.82, 141.55, 166.61, 169.44, 171.32, 171.59, 172.79

#### 4.1.6. Sinteza dietil (2-(3,4-difluorofenil)ciklopropan-1-karbonil)glicil-L-valil-D-glutamata (**6**)

##### Reakcija:



**a:** 1) TFA/diklorometan (sobna T, 3,5 h)

2) DIPEA/diklorometan

**b:** 2-(3,4-difluorofenil)ciklopropan-1-karboksilna kislina, EDC×HCl, HOBt, DMAP

(sobna T, 16 h)

##### Postopek (odstranjanje Boc zaščite na spojini **4** in sinteza spojine **6**):

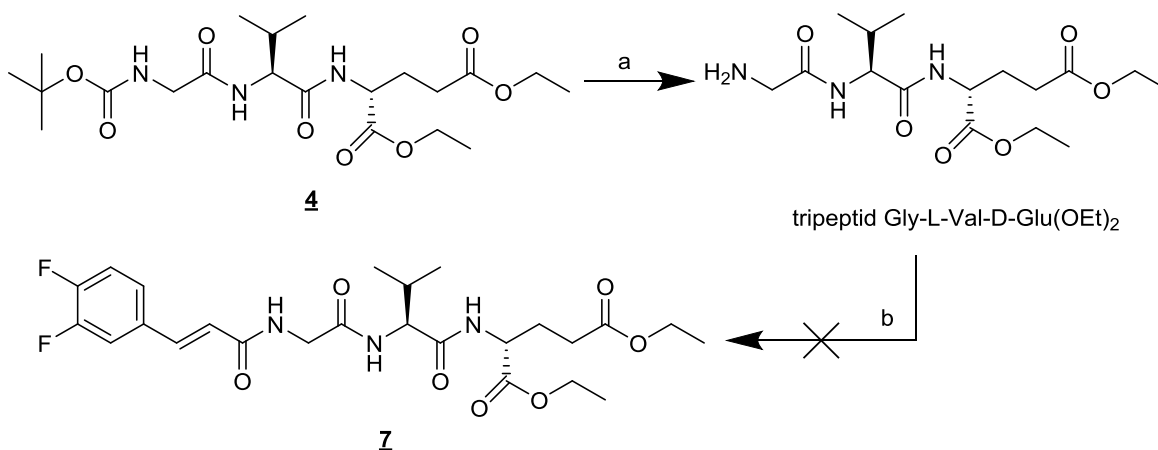
V 25 mL bučko smo natehtali 87 mg (0,189 mmol) spojine **4** in jo raztopili v 3 mL diklorometana. Raztopino smo ohladili na ledeni kopeli in ob mešanju po kapljicah dodali 0,5 mL trifluoroocetne kisline. Odstranili smo ledeno kopel in pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 3,5 urah smo topilo in trifluoroocetno kislino odpareli pod znižanim tlakom. Ostanek smo trikrat suspendirali v 10 mL dietil etra, ki smo ga ravno tako odpareli pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo raztopili v 8 mL diklorometana, ohladili na ledeni kopeli in dodali 0,165 mL (5,01 eq; 0,947 mmol) DIPEA. Nato smo dodali še 37 mg (0,99 eq; 0,187 mmol) 2-(3,4-difluorofenil)ciklopropan-1-karboksilne kisline, 36 mg (0,99 eq; 0,188 mmol) EDC×HCl, 26 mg (1,02 eq; 0,192 mmol) HOBt in katalitično količino DMAP, odstranili ledeno kopel ter pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 16 urah smo izvedli izolacijo po naslednjem postopku: Reakcijski zmesi smo dodali še 20 mL diklorometana in jo v liju ločniku spirali z 2 × 15 mL 1 M HCl, 1 × 15 mL destilirane vode, 2 × 15 mL nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub>, 1 × 15 mL destilirane vode in 1 × 15 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo nato sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo prefiltrirali in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Dobili smo 62 mg spojine **6**.



Rezultati	
Izgled	bela amorfna snov
Izkoristek	60,78 % (62 mg)
$M_r$ (izračunana)	539,57
Elementna sestava	$C_{26}H_{35}F_2N_3O_7$
MS (ESI)	$m/z = 538.2 [M-H]^-$
HR-MS	538.2353 (izračunana: 538.2365) za $C_{26}H_{34}F_2N_3O_7$
$R_f$ (diklorometan : metanol = 9 : 1)	0,38 (orositveni reagent: ninhidrin)
HPLC (254 nm)	18,06 % ( $t_R = 14,46$ min), 56,27 % ( $t_R = 15,80$ min), 23,25 % ( $t_R = 16,46$ min); skupaj: 97,58 % (prisotni 4 diastereoizomeri)
$T_{taliska}$	164–167 °C
IR	3280, 2923, 1732, 1631, 1546, 1522, 1454, 1381, 1268, 1219, 1165, 1116, 1064, 1023, 910, 862, 812, 771, 715, 668, 613 $cm^{-1}$
$^1H$ NMR (400 MHz, $CDCl_3$ )	$\delta$ [ppm] = 0.91–0.94 (m, 6H, $2 \times CH_3$ -Val), 1.20–1.25 (m, 7H, $2 \times CH_2CH_3$ in $PhCHCH_2CH$ ), 1.53–1.58 (m, 1H, $PhCHCH_2CH$ ), 1.82–1.84 (m, 1H, $PhCHCH_2CH$ ), 1.95–2.00 (m, 1H, $CH_2\alpha$ - $\beta$ -Glu), 2.11–2.17 (m, 2H, $CH_2\beta$ - $\beta$ -Glu in $CH(CH_3)_2$ ), 2.26–2.49 (m, 3H, $CH_2$ - $\gamma$ -Glu in $PhCHCH_2CH$ ), 4.03–4.21 (m, 6H, $NHCH_2$ in $2 \times CH_2CH_3$ ), 4.50–4.51 (m, 2H, $\alpha$ - $CH$ -Val in $\alpha$ - $CH$ -Glu), 6.82–6.91 (m, 2H, $2 \times H$ -Ar), 7.00–7.07 (m, 1H, $H$ -Ar), 7.26–7.29 (m, 2H, $2 \times NH$ ), 7.53–7.54 (m, 1H, NH)
$^{13}C$ NMR (100 MHz, $CDCl_3$ )	$\delta$ [ppm] = 14.07, 14.14, 16.02, 17.88, 17.91, 19.21, 24.35, 25.90, 26.90, 26.94, 30.35, 31.28, 43.61, 51.80, 51.83, 58.28, 60.82, 61.63, 114.91, 114.95, 115.08, 115.13, 117.02, 117.19, 117.22, 122.38, 137.82, 169.20, 171.12, 171.58, 172.28, 172.81 *podvajanje signalov je posledica diastereoizomerov in sklopitev C-F

#### 4.1.7. Poskus sinteze dietil ((*E*)-3-(3,4-difluorofenil)akriloil)glicil-L-valil-D-glutamata (**7**)

##### Reakcija:



a: 1) TFA/diklorometan (sobna T, 3 h)

2) DIPEA/diklorometan

b: (*E*)-3-(3,4-difluorofenil)akrilna kislina, EDC×HCl, HOBt, DMAP (sobna T, 92 h)

**Postopek (odstranjevanje Boc zaščite na spojini 4 in poskus sinteze spojine 7):**

V 25 mL bučki smo raztopili 71 mg (0,155 mmol) spojine 4 v 2 mL diklorometana. Raztopino smo ohladili na ledeni kopeli in ob mešanju po kapljicah dodali 0,5 mL trifluoroocetne kisline. Odstranili smo ledeno kopel in pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 3 urah smo topilo in trifluoroocetno kislino odpareli pod znižanim tlakom. Ostanek smo trikrat raztopili v 10 mL dietil etra, ki smo ga ravno tako odpareli pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo raztopili v 5 mL diklorometana, ohladili na ledeni kopeli in dodali 0,135 mL (5,00 eq; 0,775 mmol) DIPEA. Nato smo dodali še 30 mg (1,05 eq; 0,163 mmol) (*E*)-3-(3,4-difluorofenil)akrilne kisline, 30 mg (1,01 eq; 0,156 mmol) EDC×HCl, 22 mg (1,05 eq; 0,163 mmol) HOBt in katalitično količino DMAP, odstranili ledeno kopel ter pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 92 urah smo izvedli izolacijo po naslednjem postopku: Reakcijski zmesi smo dodali še 20 mL diklorometana in jo v liju ločniku spirali z 2 × 15 mL 1 M HCl, 1 × 15 mL destilirane vode, 2 × 15 mL nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub>, 1 × 15 mL destilirane vode in 1 × 15 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo nato sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo prefiltrirali in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Dobljeno suho snov smo očistili s kolonsko kromatografijo in izolirali 21 mg bele amorfne snovi.

<b>Rezultati</b>	
<b>Izgled</b>	bela amorfna snov
<b>Izkoristek</b>	25,93 % (21 mg)
<b>M<sub>r</sub></b> (izračunana)	525,55
<b>Elementna sestava</b>	C <sub>25</sub> H <sub>33</sub> F <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>
<b>MS (ESI)</b>	m/z = 581.2 [M-H] <sup>-</sup>
<b>R<sub>f</sub></b> (diklorometan : metanol = 9 : 1)	0,24 (orositveni reagent: ninhidrin)
<b>HPLC</b> (254 nm)	95,97 % (t <sub>R</sub> = 12,41 min)
<b>T<sub>tališča</sub></b>	163–166 °C
<b>IR</b>	3287, 2930, 1735, 1636, 1515, 1376, 1275, 1202, 1113, 1023, 970, 855, 818, 774, 669 cm <sup>-1</sup>
<b><sup>1</sup>H NMR</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ [ppm] = 1.02–1.07 (m, 6H, 2 × CH <sub>3</sub> -Val), 1.19–1.23 (m, 6H, 2 × CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 2.12–2.24 (m, 3H, CH <sub>2</sub> -β-Glu in CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 2.45 (t, 2H, J = 7.6 Hz, CH <sub>2</sub> -γ-Glu), 4.06–4.17 (m, 4H, 2 × CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 4.30–4.34 (m, 1H, NH-CH <sub>2</sub> Δ), 4.51 (s, 2H, ?*), 4.56–4.60 (m, 1H, NH-CH <sub>2</sub> B), 4.68 (q, 1H, J = 6.0 Hz, α-CH-Glu), 4.94 (s, 1H, α-CH-Val), 6.85 (d, 1H, J = 15.6 Hz, CH=CH), 7.19–7.23 (m, 1H, H-Ar), 7.33–7.34 (m, 1H, ?*), 7.41–7.46 (m, 1H, H-Ar), 7.58 (d, 1H, J = 15.2 Hz, CH=CH), 8.11 (s, 1H, ?*), 8.42–8.44 (m, 1H, NH), 8.63 (s, 1H, ?*), 8.72–8.74 (m, 1H, NH) *ne moremo določiti, kateremu protonu pripada
<b><sup>13</sup>C NMR</b> (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ [ppm] = 14.06, 14.09, 18.64, 19.22, 27.10, 30.49, 32.54, 43.53, 43.84, 51.77, 58.21, 60.69, 61.47, 116.39, 116.56, 117.60, 117.77, 124.28, 124.30, 124.36, 132.60, 138.88, 149.33, 166.11, 168.44, 169.21, 171.25, 171.61, 172.45 *podvajanje signalov je posledica sklopitev C-F

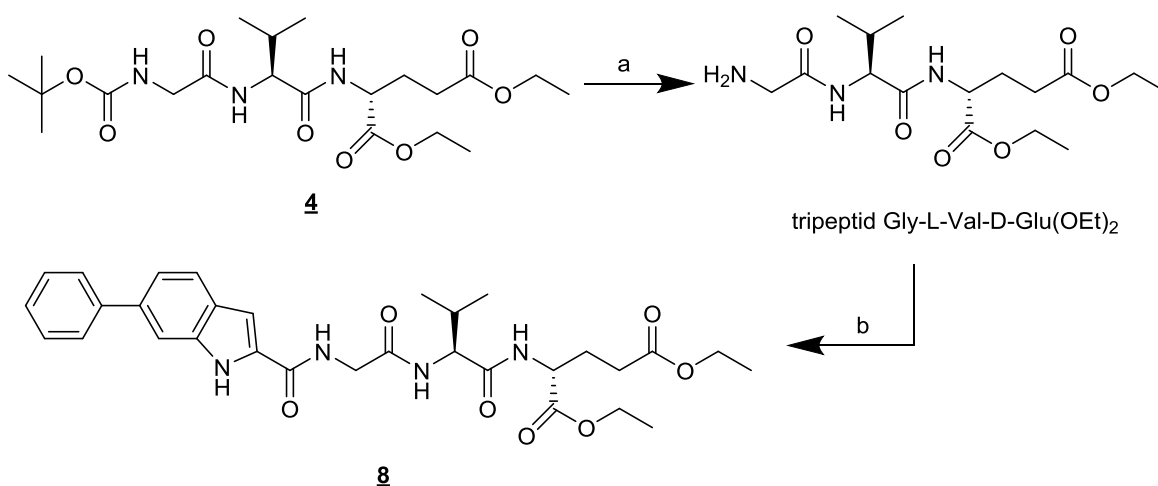
Iz analiz nismo uspeli razbrati, katera spojina je pri sintezi nastala, lahko pa trdimo, da dobljena spojina ne ustreza pričakovani.

Ugotovitve:

- MS (ESI) je pokazala za 56 večjo molekulsko maso od pričakovane
- iz  $^1\text{H}$  NMR spektra razberemo dodaten singlet za 2H pri 4.51 ppm in dodaten singlet v aromatskem področju
- v  $^{13}\text{C}$  NMR spektru opazimo en signal preveč za C=O skupino, manjka pa en signal za sklopitev C-F

#### 4.1.8. Sinteza dietil (6-fenil-1*H*-indol-2-karbonil)glicil-L-valil-D-glutamata (8)

Reakcija:



**a:** 1) TFA/diklorometan (sobna T, 4 h)

2) DIPEA/diklorometan

**b:** 6-fenil-1*H*-indol-2-karboksilna kislina, EDC×HCl, HOBt, DMAP (sobna T, 17,5 h)

**Postopek (odstranjanje Boc zaščite na spojini 4 in sinteza spojine 8):**

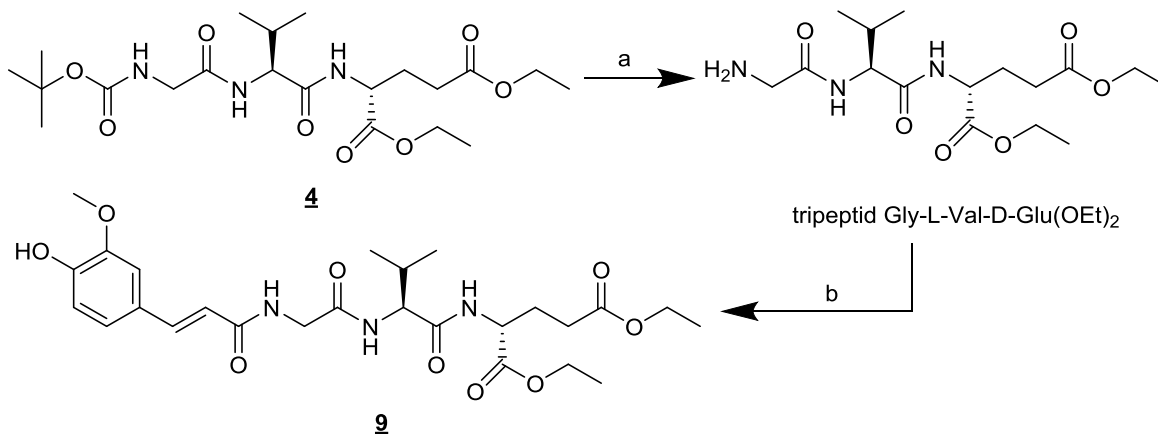
V 25 mL bučki smo raztopili 97 mg (0,211 mmol) spojine **4** v 2 mL diklorometana. Raztopino smo ohladili na ledeni kopeli in ob mešanju po kapljicah dodali 0,5 mL trifluoroocetne kisline. Odstranili smo ledeno kopel in pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 4 urah smo odpareli topilo in trifluoroocetno kislino pod znižanim tlakom. Ostanek smo trikrat suspendirali v 10 mL dietil etra, ki smo ga ravno tako odpareli pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo raztopili v 5 mL diklorometana, ohladili na ledeni kopeli in dodali 0,185 mL (5,03 eq; 1,062 mmol) DIPEA. Nato smo dodali še 50 mg (1,00 eq; 0,211 mmol) 6-fenil-1*H*-indol-2-karboksilne kisline, 40 mg (0,99 eq; 0,209 mmol) EDC×HCl, 29 mg (1,02 eq; 0,215 mmol) HOBt in katalitično količino DMAP, odstranili ledeno kopel ter

pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 17,5 urah smo izvedli izolacijo po naslednjem postopku: Reakcijski zmesi smo dodali še 20 mL diklorometana in jo v liju ločniku spirali z  $2 \times 15$  mL 1 M HCl,  $1 \times 15$  mL destilirane vode,  $2 \times 15$  mL nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub>,  $1 \times 15$  mL destilirane vode in  $1 \times 15$  mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo nato sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo prefiltrirali in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Dobili smo 46 mg spojine **8**.

<b>Rezultati</b>	
<b>Izgled</b>	rumenobela amorfna snov
<b>Izkoristek</b>	37,70 % (46 mg)
<b>M<sub>r</sub></b> (izračunana)	578,66
<b>Elementna sestava</b>	C <sub>31</sub> H <sub>38</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub>
<b>MS (ESI)</b>	m/z = 577.2 [M-H] <sup>-</sup>
<b>HR-MS</b>	577.2664 (izračunana: 577.2662) za C <sub>31</sub> H <sub>37</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub>
<b>R<sub>f</sub></b> (diklorometan : metanol = 9 : 1)	0,37 (orositveni reagent: ninhidrin)
<b>HPLC</b> (254 nm)	100,00 % (t <sub>R</sub> = 19,64 min)
<b>T<sub>tališča</sub></b>	150–153 °C
<b>IR</b>	3262, 2961, 1714, 1675, 1633, 1547, 1373, 1332, 1285, 1204, 1113, 1019, 825, 741, 693 cm <sup>-1</sup>
<b><sup>1</sup>H NMR</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ [ppm] = 1.17 (d, 3H, J = 6.8 Hz, CH <sub>3</sub> -Val), 1.20 (d, 3H, J = 6.8 Hz, CH <sub>3</sub> -Val), 1.32–1.40 (m, 6H, 2 x CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 2.31–2.38 (m, 1H, CH <sub>2</sub> Δ-β-Glu), 2.43–2.51 (m, 2H, CH <sub>2</sub> B-β-Glu in CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 2.58–2.67 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -γ-Glu), 4.19–4.37 (m, 4H, 2 x CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 4.47–4.52 (m, 1H, NHCH <sub>2</sub> Δ), 4.76–4.81 (m, 1H, NHCH <sub>2</sub> B), 4.85–4.93 (m, 2H, α-CH-Val in α-CH-Glu), 7.26 (s, 1H, H-Ar), 7.50–7.61 (m, 4H, 4 x H-Ar), 7.81–7.85 (m, 4H, 4 x H-Ar), 8.02 (d, 1H, J = 7.2 Hz, NH), 8.23 (s, 1H, NHCH <sub>2</sub> ), 8.51 (d, 1H, J = 9.2 Hz, NH), 10.76 (s, 1H, indol-NH)
<b><sup>13</sup>C NMR</b> (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ [ppm] = 14.08, 17.97, 19.35, 26.95, 30.48, 31.39, 43.79, 52.29, 58.50, 60.93, 61.79, 103.45, 110.63, 120.26, 122.17, 126.86, 126.92, 127.28, 128.73, 130.70, 137.48, 141.95, 162.39, 169.82, 171.67, 171.97, 173.03

### 4.1.9. Sinteza dietil ((*E*)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akriloil)glicil-L-valil-D-glutamata (**9**)

#### Reakcija:



**a:** 1) TFA/diklorometan (sobna T, 3,5 h)

2) DIPEA/diklorometan

**b:** (*E*)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilna kislina, EDC×HCl, HOBt, DMAP

(sobna T, 18 h)

#### Postopek (odstranjevanje Boc zaščite na spojini **4** in sinteza spojine **9**):

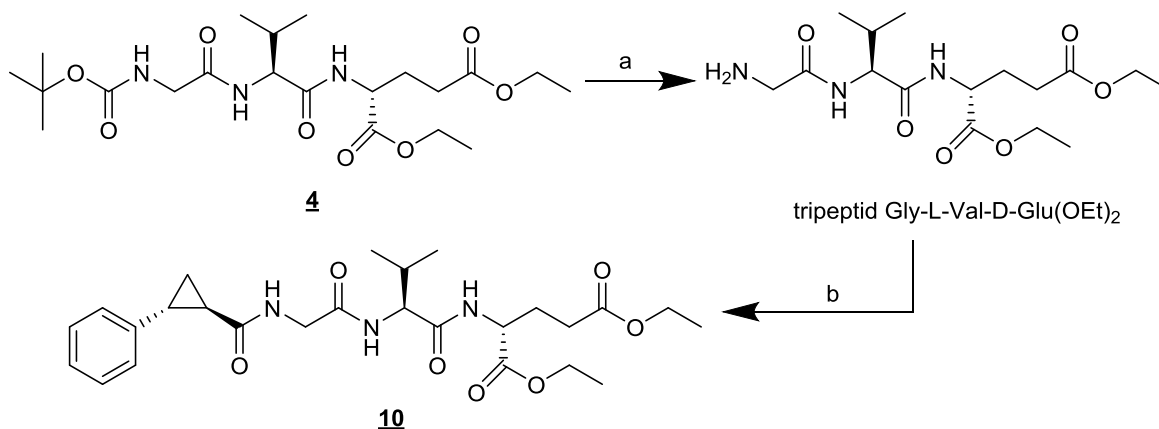
V 25 mL bučko smo natehtali 104 mg (0,226 mmol) spojine **4** in jo raztopili v 2 mL diklorometana. Raztopino smo ohladili na ledeni kopeli in ob mešanju po kapljicah dodali 0,5 mL trifluoroocetne kisline. Odstranili smo ledeno kopel in pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 3,5 urah smo topilo in trifluoroocetno kislino odpareli pod znižanim tlakom. Ostanek smo trikrat suspendirali v 10 mL dietil etra, ki smo ga ravno tako odpareli pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo raztopili v 5 mL diklorometana, ohladili na ledeni kopeli in dodali 0,195 mL (4,96 eq; 1,120 mmol) DIPEA. Nato smo dodali še 44 mg (1,00 eq; 0,227 mmol) (*E*)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilne kisline, 44 mg (1,02 eq; 0,230 mmol) EDC×HCl, 31 mg (1,01 eq; 0,229 mmol) HOBt in katalitično količino DMAP, odstranili ledeno kopel ter pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 18 urah smo izvedli izolacijo po naslednjem postopku: Reakcijski zmesi smo dodali še 20 mL diklorometana in jo v liju ločniku spirali z 2 × 15 mL 1 M HCl, 1 × 15 mL destilirane vode, 2 × 15 mL nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub>, 1 × 15 mL destilirane vode in 1 × 15 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo nato sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo prefiltrirali in

topilo odpareli pod znižanim tlakom. Dobili smo rumenkasto amorfno snov, ki smo jo očistili s kolonsko kromatografijo in izolirali 44 mg spojine **9**.

Rezultati	
Izgled	brezbarvna amorfna snov
Izkoristek	36,36 % (44 mg)
M <sub>r</sub> (izračunana)	535,59
Elementna sestava	C <sub>26</sub> H <sub>37</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub>
MS (ESI)	m/z = 534.2 [M-H] <sup>-</sup>
HR-MS	534.2458 (izračunana: 534.2452) za C <sub>26</sub> H <sub>36</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub>
R <sub>f</sub> (diklorometan : metanol = 9 : 1)	0,38 (orositveni reagent: ninhidrin)
HPLC (254 nm)	95,47 % (t <sub>R</sub> = 8,34 min)
Tališča	117–120 °C
IR	3287, 2963, 1725, 1635, 1513, 1452, 1374, 1265, 1192, 1122, 1025, 976, 844, 814, 680 cm <sup>-1</sup>
<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ [ppm] = 0.93 (d, 3H, J = 6.8 Hz, CH <sub>3</sub> -Val), 0.95 (d, 3H, J = 6.8 Hz, CH <sub>3</sub> -Val), 1.17–1.23 (m, 6H, 2 x CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1.97–2.07 (m, 1H, CH <sub>2</sub> Δ-β-Glu), 2.14–2.22 (m, 2H, CH <sub>2</sub> β-β-Glu in CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 2.32–2.45 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -γ-Glu), 3.85 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 4.02–4.20 (m, 6H, 2 x CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> in NHCH <sub>2</sub> ), 4.46–4.50 (m, 1H, α-CH), 4.53–4.58 (m, 1H, α-CH), 6.30 (br s, 1H, OH), 6.40 (d, 1H, J = 15.6 Hz, CH=CHCO), 6.85 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H-Ar), 6.98–7.03 (m, 2H, 2 x H-Ar), 7.21 (t, 1H, J = 4.4 Hz, NHCH <sub>2</sub> ), 7.44 (d, 1H, J = 8.8 Hz, NH), 7.52 (d, 1H, J = 15.6 Hz, CH=CHCO), 7.58 (d, 1H, J = 8.0 Hz, NH)
<sup>13</sup> C NMR (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ [ppm] = 14.09, 14.14, 17.87, 19.34, 26.81, 30.42, 30.92, 43.61, 51.90, 55.93, 58.58, 60.76, 61.62, 110.09, 114.82, 117.54, 122.14, 127.23, 141.68, 146.83, 147.58, 167.04, 169.76, 171.45, 171.73, 172.84

#### 4.1.10. Sinteza dietil (*trans*-2-fenilciklopropan-1-karbonil)glicil-L-valil-D-glutamata (**10**)

##### Reakcija:



**a:** 1) TFA/diklorometan (sobna T, 3,5 h)

2) DIPEA/diklorometan

**b:** *trans*-2-fenilciklopropan-1-karboksilna kislina, EDC×HCl, HOBT, DMAP

(sobna T, 19 h)

**Postopek (odstranjevanje Boc zaščite na spojini 4 in sinteza spojine 10):**

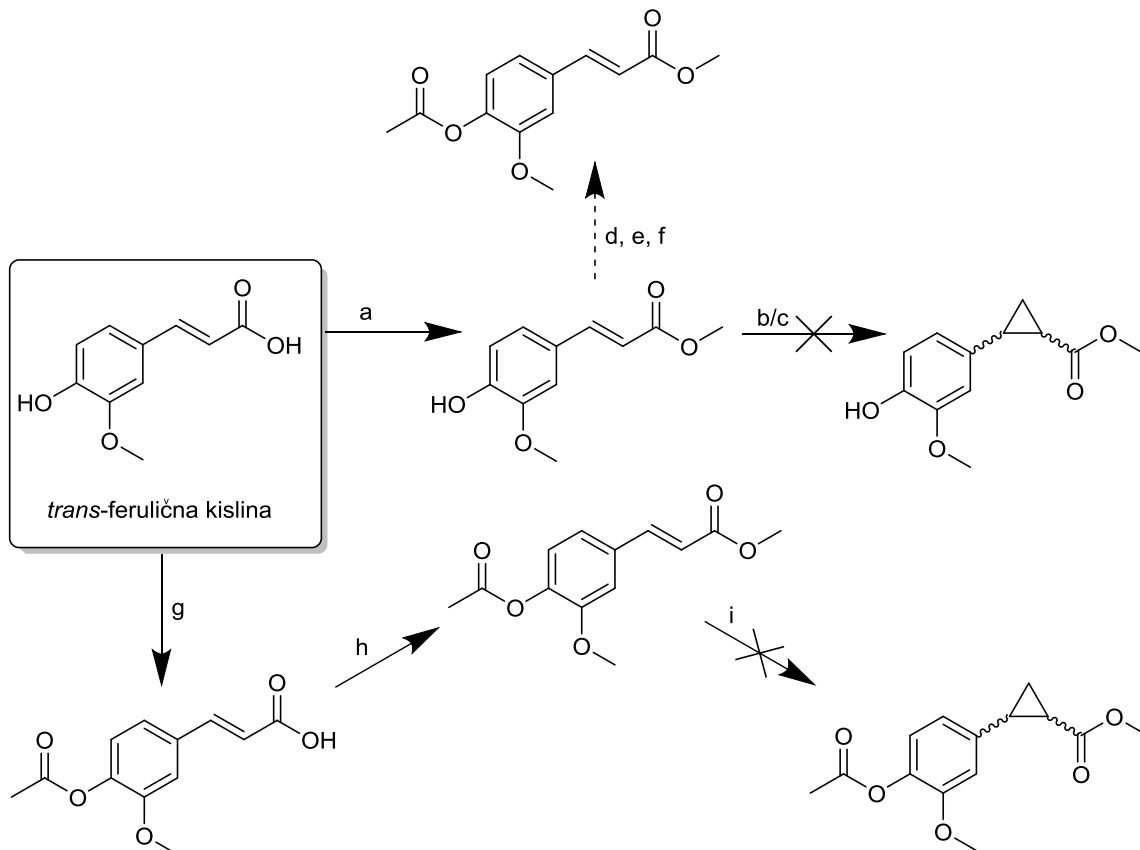
V 25 mL bučko smo natehtali 99 mg (0.215 mmol) spojine 4 in jo raztopili v 2 mL diklorometana. Raztopino smo ohladili na ledeni kopeli in ob mešanju po kapljicah dodali 0,5 mL trifluoroocetne kisline. Odstranili smo ledeno kopel in pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 3,5 urah smo topilo in trifluoroocetno kislino odpareli pod znižanim tlakom. Ostanek smo trikrat suspendirali v 10 mL dietil etra, ki smo ga ravno tako odpareli pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo raztopili v 5 mL diklorometana, ohladili na ledeni kopeli in dodali 0,185 mL (4,94 eq; 1,062 mmol) DIPEA. Nato smo dodali še 36 mg (1,03 eq; 0,222 mmol) *trans*-2-fenilciklopropan-1-karboksilne kisline, 42 mg (1,02 eq; 0,219 mmol) EDC×HCl, 30 mg (1,03 eq; 0,222 mmol) HOBt in katalitično količino DMAP, odstranili ledeno kopel ter pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 19 urah smo izvedli izolacijo po naslednjem postopku: Reakcijski zmesi smo dodali še 18 mL diklorometana in jo v liju ločniku spirali z 2 × 15 mL 1 M HCl, 1 × 15 mL destilirane vode, 2 × 15 mL nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub>, 1 × 15 mL destilirane vode in 1 × 15 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo nato sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo prefiltrirali in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Dobili smo 72 mg spojine 10.

<b>Rezultati</b>	
<b>Izgled</b>	bela amorfna snov
<b>Izkoristek</b>	66,67 % (72 mg)
<b>M<sub>r</sub></b> (izračunana)	503,59
<b>Elementna sestava</b>	C <sub>26</sub> H <sub>37</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>
<b>MS (ESI)</b>	m/z = 502.2 [M-H] <sup>-</sup>
<b>HR-MS</b>	502.2555 (izračunana: 502.2553) za C <sub>26</sub> H <sub>36</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>
<b>R<sub>f</sub></b> (diklorometan : metanol = 9 : 1)	0,42 (orositveni reagent: ninhidrin)
<b>HPLC</b> (254 nm)	58,02 % (t <sub>R</sub> = 13,95 min), 41,98 % (t <sub>R</sub> = 14,21 min); skupaj: 100,00 % (prisotna 2 diastereoizomera)
<b>T<sub>tališča</sub></b>	159–162 °C
<b>IR</b>	3271, 2965, 1734, 1624, 1530, 1446, 1374, 1262, 1207, 1176, 1094, 1023, 935, 857, 757, 696 cm <sup>-1</sup>
<b><sup>1</sup>H NMR</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ [ppm] = 0.90–0.94 (m, 6H, 2 × CH <sub>3</sub> -Val), 1.19–1.24 (m, 7H, 2 × CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> in PhCHCH <sub>2</sub> CH), 1.54–1.59 (m, 1H, PhCHCH <sub>2</sub> CH), 1.84–1.89 (m, 1H, PhCHCH <sub>2</sub> CH), 1.93–2.02 (m, 1H, CH <sub>2</sub> Δ-β-Glu), 2.08–2.18 (m, 2H, CH <sub>2</sub> B-β-Glu in CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 2.31–2.36 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -γ-Glu), 2.44–2.48 (m, 1H, PhCHCH <sub>2</sub> CH), 4.00–4.23 (m, 6H, 2 × CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> in NHCH <sub>2</sub> ), 4.47–4.54 (m, 2H, α-CH-Val in α-CH-Glu), 7.06–7.08 (m, 2H, 2 × H-Ar), 7.13–7.18 (m, 1H, H-Ar), 7.22–7.33 (m, 4H, 2 × H-Ar in NHCH <sub>2</sub> in NH), 7.53–7.58 (m, 1H, NH)
<b><sup>13</sup>C NMR</b> (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ [ppm] = 14.11, 14.16, 16.06, 17.88, 17.94, 19.22, 25.30, 25.90, 25.97, 26.94, 30.39, 31.22, 31.29, 43.62, 43.72, 51.76, 51.80, 58.26, 60.76, 61.57, 126.11, 126.14, 126.25, 126.28, 128.41, 128.43, 140.68, 169.33, 171.19, 171.58, 171.61, 172.81, 172.84 *podvajanje signalov je posledica zmesi dveh diastereoizomerov

## 4.2. Poskus ciklopropanacije dvojne vezi na *trans*-ferulični kislini

*trans*-ferulična kislina = (*E*)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilna kislina

### REAKCIJSKA SCHEMA



- > reakcija je potekla
- > reakcija ni potekla do konca
- > reakcija ni potekla

**a:** SOCl<sub>2</sub>/metanol, 70 °C

**b:** trimetilsulfoksonijev jodid, NaOH/DMSO

**c:** trimetilsulfoksonijev jodid, NaOH/DMSO, 50 °C → 55 °C

**d:** acetanhidrid, DMAP/piridin, 30 °C

**e:** acetanhidrid, DMAP/piridin, 80 °C

**f:** piridin, acetilklorid/THF, sobna T → 80 °C

**g:** acetanhidrid, DMAP/piridin

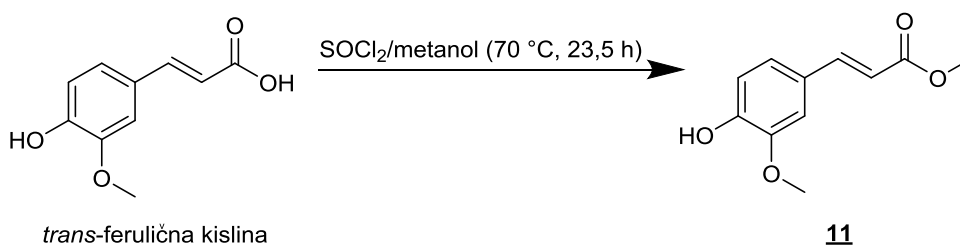
**h:** K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>I/acetonitril

**i:** trimetilsulfoksonijev jodid, NaOH/DMSO, 50 °C



### 4.2.1. Sinteza metil (*E*)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilata (**11**)

#### Reakcija:



#### Postopek:

V 50 mL bučko smo natehtali 1,943 g (10,0 mmol) *trans*-ferulične kisline in jo raztopili v 25 mL metanola. Raztopino smo ohladili na ledeni kopeli in ob mešanju po kapljicah dodali 0,800 mL (1,1 eq; 11,0 mmol) tionil klorida. Nato smo odstranili ledeno kopel, bučko prenesli na oljno kopel, jo opremili z vodnim hladilnikom in ob mešanju segrevali pri temperaturi 70 °C. Po 23,5 urah smo izvedli izolacijo: metanol smo odpareli pod znižanim tlakom in ostanek po rotavapiranju štirikrat suspendirali v 10 mL dietil etra, ki smo ga ravno tako odpareli pod znižanim tlakom. Masa dobljenega produkta je bila 2,284 g.

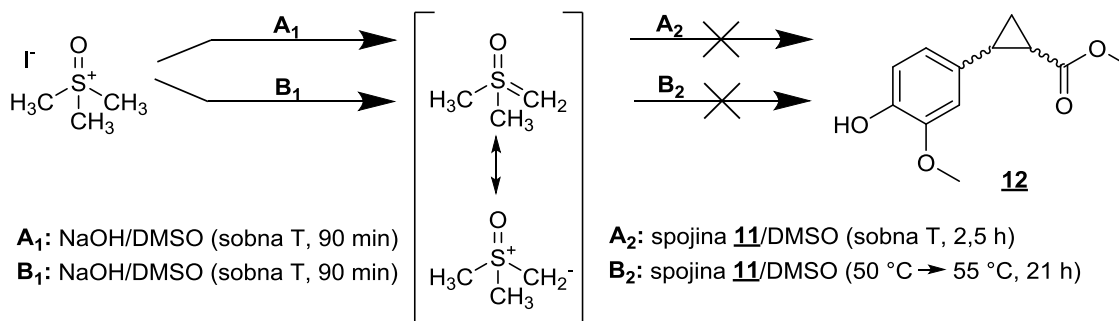
Rezultati	
Izgled	rjava viskozna tekočina
Izkoristek	100 % (2,284 g)
M <sub>r</sub> (izračunana)	208,21
Elementna sestava	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>
R <sub>f</sub> (heksan : etilacetat = 1 : 1)	0,55

#### Referenca za spojino **11**:

Panteli EK, Voutsas EK: Solubilities of cinnamic acid esters in ionic liquids. J Chem Eng Data 2009; 54 (3): 812–818.

#### 4.2.2. Poskus sinteze metil 2-(4-hidroksi-3-metoksifenil)ciklopropan-1-karboksilata (**12**)

##### Reakcija:



##### Postopek A:

Natrijev hidroksid smo prvo fino uprašili, nato pa smo 0,228 g (1,14 eq; 5,70 mmol) prahu natehtali v 50 mL bučko in ga koevaporirali s toluenom. Nato smo dodali 1,165 g (1,06 eq; 5,29 mmol) trimetilsulfoksonijevega jodida in vse skupaj raztopili v 15 mL DMSO. Mešali smo 90 minut pri sobni temperaturi in nato po kapljicah dodali raztopino 1,044 g (5,01 mmol) spojine **11** v 10 mL DMSO. Ponovno smo mešali pri sobni temperaturi in po 2,5 urah po dodatku spojine **11** izvedli izolacijo. Reakcijski zmesi smo dodali 100 mL etilacetata in raztopino v liju ločniku spirali s 3 × 50 mL destilirane vode, 1 × 30 mL nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub> in 1 × 30 mL nasičene raztopine NaCl. Ker se je veliko spojine ekstrahiralo v vodno fazo, smo naredili še reekstrakcijo združenih vodnih faz (destilirana voda) s 3 × 40 mL etilacetata. Združene organske faze smo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jih prefiltrirali in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Reakcija ni potekla, saj je spojina **11** ostala nespremenjena.

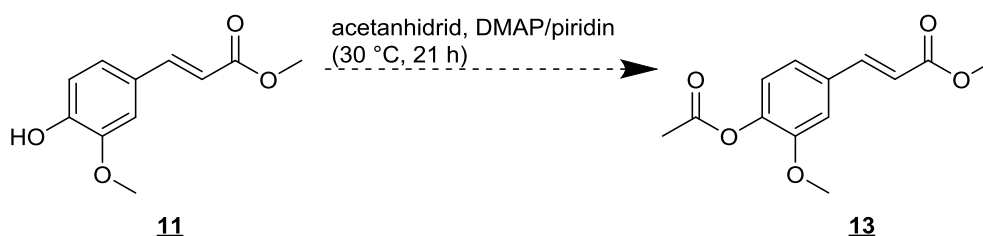
##### Postopek B:

Natrijev hidroksid smo fino uprašili, nato pa smo 0,256 g (1,12 eq; 6,40 mmol) prahu natehtali v 50 mL bučko in ga koevaporirali s toluenom. Nato smo dodali 1,331 g (1,06 eq; 6,05 mmol) trimetilsulfoksonijevega jodida in 5 mL DMSO ter mešali pri sobni temperaturi. Naknadno smo dodali še dvakrat po 2 mL DMSO. Po 90 minutah mešanja smo po kapljicah dodali raztopino 1,189 g (5,71 mmol) spojine **11** v 3 mL DMSO. Bučko smo opremili z vodnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko ter mešali na oljni kopeli pri 50 °C. Po 1,5 uri smo zvišali temperaturo kopeli na 55 °C ter pustili reakcijo potekati čez noč. Po 21 urah reakcije smo izvedli izolacijo: Reakcijski zmesi smo dodali 50 mL etilacetata in

raztopino v liju ločniku spirali s  $3 \times 50$  mL destilirane vode in  $1 \times 30$  mL nasičene raztopine  $\text{NaHCO}_3$ . Nato smo naredili reekstrakcijo združenih vodnih faz (destilirana voda) z  $2 \times 50$  mL etilacetata. Združene organske faze smo spirali še z  $1 \times 50$  mL nasičene raztopine  $\text{NaCl}$ , jih sušili nad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , prefiltrirali in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Tudi z uporabo tega postopka reakcija ni potekla in spojina **11** je ostala nespremenjena.

#### 4.2.3. Poskus sinteze metil (*E*)-3-(4-acetoksi-3-metoksifenil)akrilata (**13**)

##### Reakcija A:

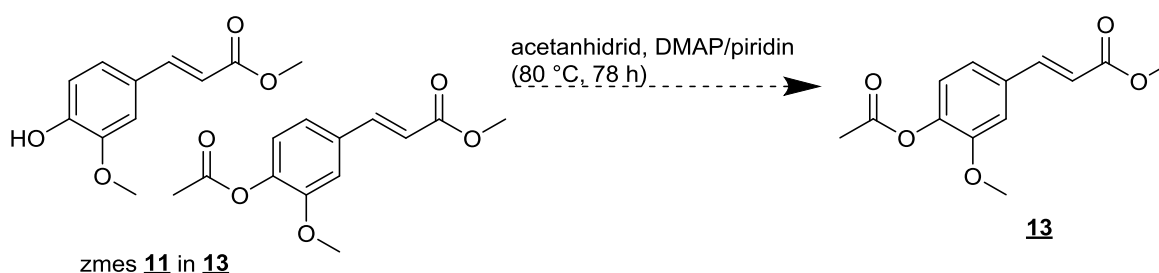


##### Postopek A:

1,573 g (7,55 mmol) spojine **11** smo v 50 mL bučki raztopili v 6 mL piridina. Ob mešanju smo dodali 5 mL (7,0 eq; 52,9 mmol) acetanhidrida in katalitično količino DMAP ter bučko postavili na oljno kopel. Mešali smo 21 ur pri 30 °C in nato izvedli izolacijo: Reakcijski zmesi smo dodali 80 mL diklorometana in v liju ločniku spirali s  $3 \times 50$  mL 1 M HCl,  $1 \times 20$  mL destilirane vode in  $1 \times 30$  mL nasičene raztopine  $\text{NaHCO}_3$ . Organsko fazo smo sušili nad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , jo prefiltrirali in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Dobili smo blede oranžno amorfno snov, ki smo jo očistili s kolonsko kromatografijo. Posneli smo NMR in ugotovili, da reakcija ni potekla do konca (dobili smo zmes produkta in reaktanta).

Da bi zreagirala vsa spojina **11**, smo z dobljeno zmesjo spojin **11** in **13** iz prejšnje reakcije še enkrat nastavili enako reakcijo, le da smo segrevali pri 80 °C:

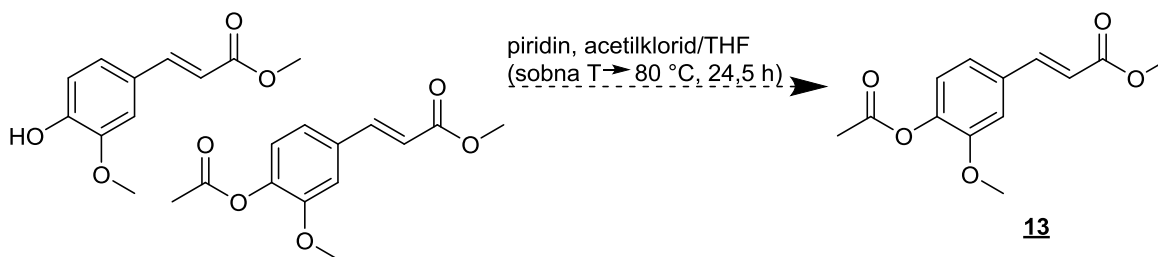
##### Reakcija B:



**Postopek B:**

1,395 g zmesi spojin **11** in **13** smo raztopili v 6 mL piridina in raztopino prenesli v 50 mL bučko. Ob mešanju smo dodali 5 mL (52,9 mmol) acetanhidrida in katalitično količino DMAP, bučko opremili z vodnim hladilnikom in klorcalcijevo cevko ter jo postavili na oljno kopel. Reakcijo smo 78 ur pustili teči pri temperaturi 80 °C in nato izvedli izolacijo po naslednjem postopku: Reakcijsko zmes smo zlili v čašo z ledom, postavili na mešalo ter jo nakisali s 3 M HCl do pH 1–2. Nakisano zmes smo ekstrahirali s 3 × 60 mL etilacetata, združene organske faze spirali z 2 × 50 mL nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub>, 1 × 30 mL nasičene raztopine NaCl, jih sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in jih prefiltrirali. Filtratu smo odpareli topilo pod znižanim tlakom. Posneli smo NMR dobljene suhe snovi in ugotovili, da reakcija spet ni potekla do konca. Dobili smo namreč zmes acetilirane in neacetilirane spojine v množinskem razmerju produkt : reaktant = 59 : 41, kar pomeni, da je zreagiralo skupno v obeh reakcijah le 59 % spojine **11** (izračunano iz razmerja signalov na NMR spektru).

Z zmesjo spojin **11** in **13** smo nastavili reakcijo acetiliranja še z drugačnimi reagenti:

**Reakcija C:**

zmes **11** (41 %) in **13** (59 %)

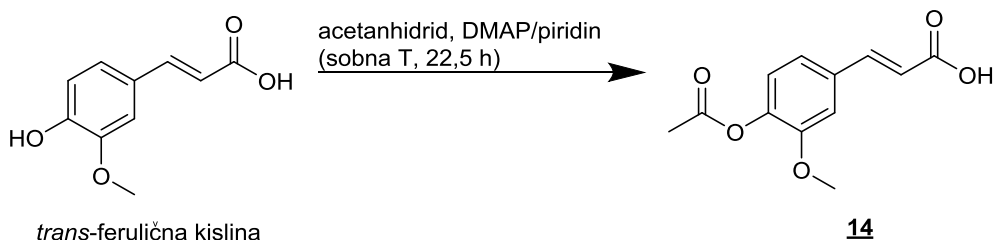
**Postopek C:**

0,882 g zmesi (1,552 mmol spojine **11** in 2,233 mmol spojine **13**, skupaj 3,785 mmol = 1,0 eq) smo raztopili v 5 mL tetrahidrofurana in raztopino prenesli v 50 mL bučko. Dodali smo 0,645 mL (2,12 eq; 8,01 mmol) piridina, bučko dali na ledeno kopel in po kapljicah ob mešanju dodali še 0,285 mL (1,06 eq; 4,01 mmol) acetilklorida. Mešali smo pri sobni temperaturi 1,5 ure in nato 23 ur pri temperaturi 80 °C (bučko smo opremili z vodim hladilnikom in klorcalcijevo cevko). Nato smo izvedli izolacijo po naslednjem postopku: Reakcijsko zmes smo zlili v čašo z ledom, postavili na mešalo, jo nakisali s 3 M HCl do pH 1 ter nakisano zmes ekstrahirali s 3 × 60 mL etilacetata. Združene organske faze smo spirali s 3 × 50 mL nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub> in 1 × 30 mL nasičene raztopine NaCl, jih

sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, oddekantirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Ostanek po rotavapiranju smo dali sušiti v sušilnik. Posneli smo NMR suhe snovi in ugotovili, da reakcija ni potekla, saj je množinsko razmerje med acetilirano in neacetilirano spojino ostalo nespremenjeno.

#### 4.2.4. Sinteza (*E*)-3-(4-acetoksi-3-metoksifenil)akrilne kisline (**14**)

##### Reakcija:



##### Postopek:

V 50 mL bučko smo natehtali 1,457 g (7,50 mmol) *trans*-ferulične kisline in jo raztopili v 6 mL piridina. Ob mešanju smo dodali 5 mL (7,05 eq; 52,9 mmol) acetanhidrida in katalitično količino DMAP. Mešali smo 22,5 ur pri sobni temperaturi in nato izvedli izolacijo po naslednjem postopku: Reakcijsko zmes smo zlili v čašo z ledom, postavili na mešalo ter jo nakisali s 3 M HCl do pH 1. Nakisano zmes smo ekstrahirali z 1 × 60 mL etilacetata. Iz etilacetatne faze je izpadla oborina, ki smo jo odnučali. Nakisano vodno fazo smo ekstrahirali še z 2 × 60 mL etilacetata in združene organske faze spirali z 1 × 30 mL nasičene raztopine NaCl. Nato smo jih sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, oddekantirali in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Ostanek po rotavapiranju in oborino smo združili in dali sušiti v sušilnik ter dobili 1,479 g spojine **14**.

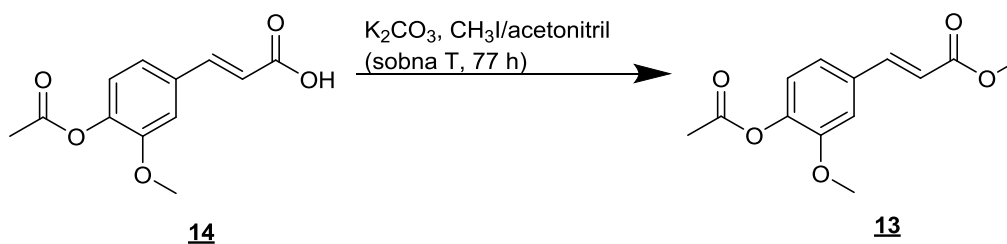
Rezultati	
Izgled	bela amorfna snov
Izkoristek	83,47 % (1,479 g)
M <sub>r</sub> (izračunana)	236,22
Elementna sestava	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>
R <sub>f</sub> (diklorometan : metanol = 9 : 1 + 4 kapljice očetne kisline)	0,73
T <sub>tališča</sub>	156–159 °C
<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ [ppm] = 2.33 (s, 3H, COCH <sub>3</sub> ), 3.88 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 6.40 (d, 1H, J = 16.0 Hz, CH=CHCO), 7.07–7.17 (m, 3H, 3 × H-Ar), 7.74 (d, 1H, J = 16.0 Hz, CH=CHCO)

##### Referenca za spojino **14**:

Ashnagar A, Naseri NG, Nematollahi M: Synthesis of dopamine hydrochloride from Vanillin. Orient J Chem 2007; 23 (2): 455-460.

#### 4.2.5. Sinteza metil (*E*)-3-(4-acetoksi-3-metoksifenil)akrilata (**13**)

##### Reakcija:



##### Postopek:

1,459 g (6,18 mmol) spojine **14** smo raztopili v 30 mL acetonitrila in raztopino prelili v 50 mL bučko. Dodali smo 1,280 g (1,5 eq; 9,26 mmol) kalijevega karbonata in mešali 15 minut pri sobni temperaturi. Potem smo po kapljicah dodali še 0,460 mL (1,2 eq; 7,39 mmol) metil jodida in pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 77 urah smo bučko odstavili z mešala in izvedli izolacijo: Acetonitril smo odpareli pod znižanim tlakom, ostanek po rotavapiranju raztopili v 40 mL etilacetata, raztopino prelili v lij ločnik in bučko sprali še z malo destilirane vode (v etilacetatu se ni vse raztopilo). Organsko fazo smo spirali s 3 × 30 mL 1 M HCl, 1 × 30 mL destilirane vode, 3 × 30 mL nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub>, 1 × 30 mL destilirane vode in 1 × 30 mL nasičene raztopine NaCl. Nato smo jo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo prefiltrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 0,938 g spojine **13**.

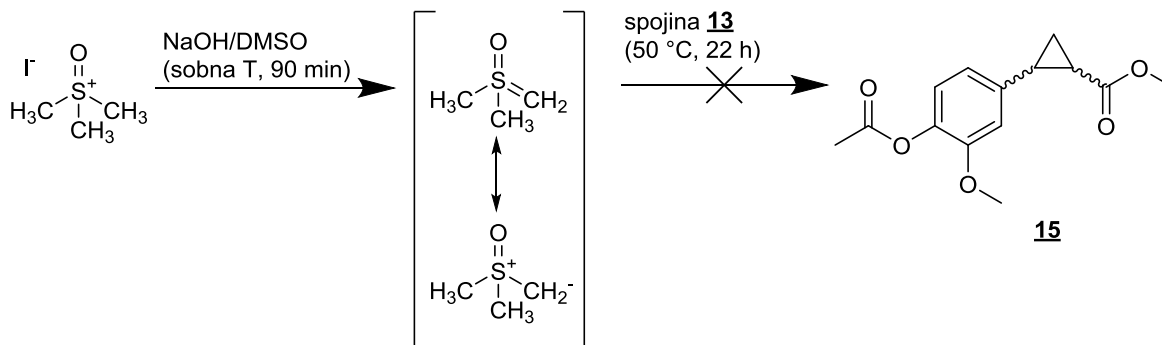
Rezultati	
Izgled	bela amorfna snov
Izkoristek	60,63 % (0,938 g)
M <sub>r</sub> (izračunana)	250,25
Elementna sestava	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>
R <sub>f</sub> (heksan : etilacetat = 1 : 1)	0,53
T <sub>tališča</sub>	118–120 °C
<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ [ppm] = 2.33 (s, 3H, COCH <sub>3</sub> ), 3.81 (s, 3H, COOCH <sub>3</sub> ), 3.86 (s, 3H, ArOCH <sub>3</sub> ), 6.39 (d, 1H, <i>J</i> = 16.0 Hz, CH=CHCO), 7.05 (d, 1H, <i>J</i> = 8.0 Hz, H-Ar), 7.10–7.14 (m, 2H, 2 × H-Ar), 7.65 (d, 1H, <i>J</i> = 16.0 Hz, CH=CHCO)

##### Referenca za spojino **13**:

Ohta G, Shimizu M: Constituents of rice bran oil. II. Structure of oryzanol-A. Pharm Bull 1957; 5: 40-44.

#### 4.2.6. Poskus sinteze metil 2-(4-acetoksi-3-metoksifenil)ciklopropan-1-karboksilata (**15**)

##### Reakcija:



##### Postopek:

Natrijev hidroksid smo fino uprašili, nato pa smo 0,084 g (1,12 eq; 2,10 mmol) prahu natehtali v 50 mL bučko in ga koevaporirali s toluenom (azeotrop z vodo destilira). Nato smo dodali 0,415 g (1,01 eq; 1,89 mmol) trimetilsulfoksonijevega jodida in približno 5 mL DMSO, raztopino prepihali z argonom ter pustili mešati pri sobni temperaturi 90 minut. Nato smo dodali 0,470 g (1,88 mmol) spojine **13**, bučko postavili na oljno kopel ter mešali pri temperaturi 50 °C (brez uporabe vodnega hladilnika). 22 ur po dodatku spojine **13** smo izvedli izolacijo: Reakcijski zmesi smo dodali 60 mL etilacetata in raztopino v liju ločniku spirali s 3 × 30 mL destilirane vode, 1 × 30 mL nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub> in 1 × 30 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, oddekantirali in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Dobili smo zmes dveh spojin, ki je predstavljala približno 70 % mase izhodne spojine. Spojini smo ločili s kolonsko kromatografijo in ugotovili, da je bila ena od njiju nezreagirana izhodna spojina, druga pa tudi ni predstavljala načrtovanega produkta.

## 5. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1. Sintezni postopki

V razpravi bomo opisali in komentirali uporabljene sintezne postopke ter razložili njihove mehanizme.

#### 5.1.1. Tvorba amidne vezi

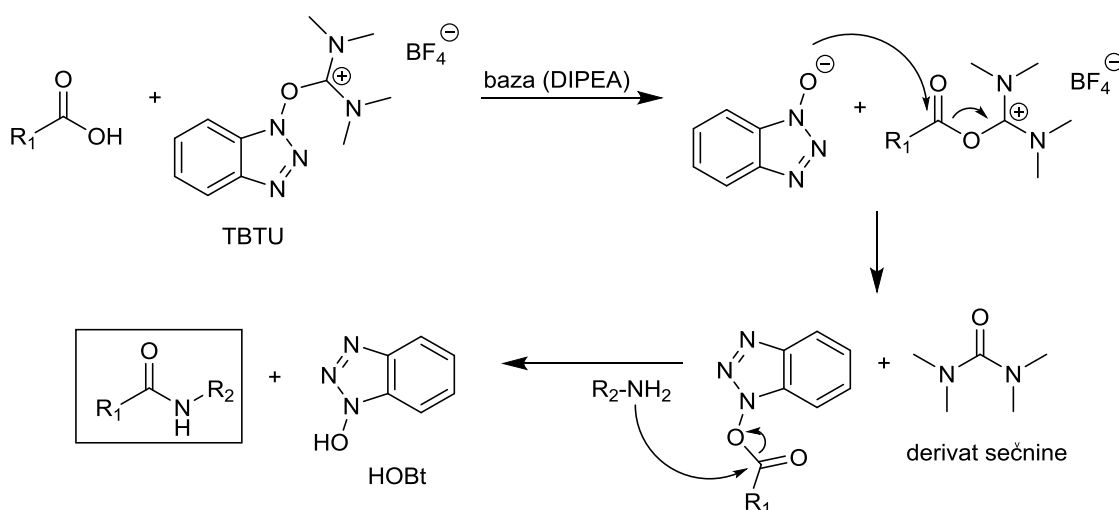
Amidno vez smo tvorili med aminokislinami pri sintezi tripeptida (spojini **3** in **4**) ter med tripeptidom in karboksilnimi kislinami pri sintezi končnih spojin (spojine **5**, **6**, **7**, **8**, **9** in **10**). Tako je tvorba amidne vezi predstavljala najpogosteje izvajano reakcijo v sklopu našega eksperimentalnega dela.

Tvorba amidne vezi vključuje napad amino skupine na predhodno aktiviran karbonilni ogljikov atom druge spojine. Aktivacija se doseže z uvedbo elektron-privlačne skupine na karbonilno skupino, s čimer se pretvori karboksilno skupino v bolj reaktivno funkcionalno skupino (acil halid, acil azid, anhidrid ali aktiviran ester). Za *in situ* aktivacijo karbonilne skupine uporabljamo sklopitvene reagente, ki dajejo ob povezavi s karboksilnimi kislinami aktivirane intermediate. Pri tem poteče nukleofilna adicija karboksilata na elektrofilen ogljikov atom sklopitvenega reagenta, čemur sledi nukleofilna substitucija (napad aminske skupine in odcepitev izstopajoče skupine). Med takšne sklopitvene reagente prištevamo karbodiimide ter nekatere fosfonijeve in uronijeve/aminijeve soli (28, 29). Sklapljanje se običajno izvaja v inertnih suhih topilih ob prisotnosti nenukleofilnih terciarnih aminov (baz), saj prisotnost le-teh olajša tvorbo aktiviranega estera. Te reakcije se lahko pospeši in izboljša njihovo učinkovitost z dodatkom pomožnih nukleofilov oziroma katalizatorjev (29, 30).

Spojini **3** in **4** smo sintetizirali po treh različnih postopkih (Preglednica 4). Uporabili smo dva različna sklopitvena reagentna (*O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronijev tetrafluoroborat (TBTU) in *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimid (DCC)), dva različna katalizatorja (1-hidroksibenzotriazol (HOBt) in 4-dimetilaminopiridin (DMAP)) ter različna topila (diklorometan, tetrahidrofuran (THF) in etilacetat). Kot bazo smo v vseh primerih uporabili *N,N*-diizopropiletilamin (DIPEA).

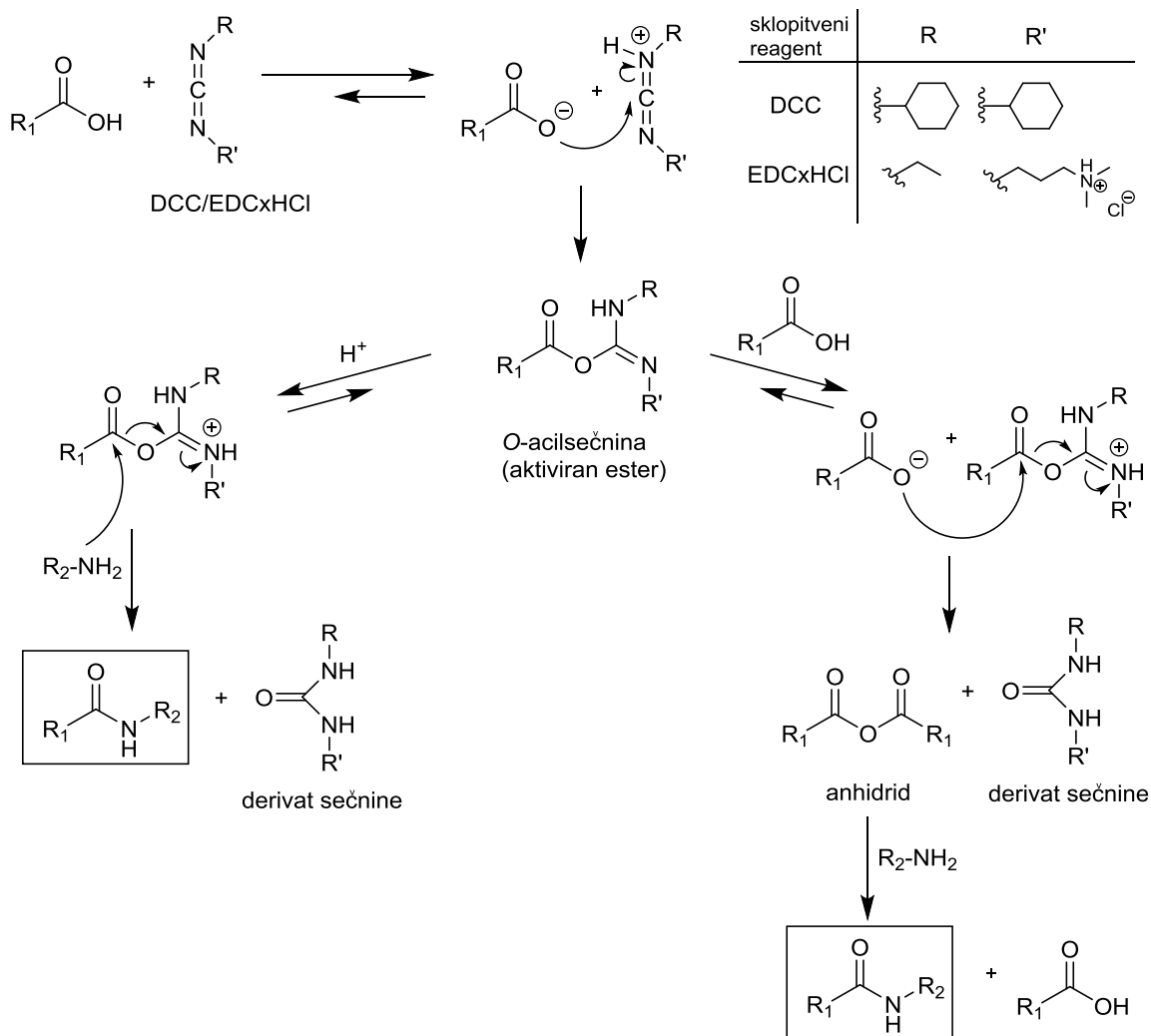


Pri postopku A smo uporabili TBTU, ki je uronijeva sol in učinkovit sklopitveni reagent. S karboksilno kislino tvori aktiviran ester, ki nato zreagira z aminom (Slika 10). Pri reakciji nastaja kot stranski produkt derivat sečnine (tetrametilsečnina). Stranska reakcija pri uporabi uronijevih soli je tvorba gvanidinskega derivata, ki nastane pri reakciji med sklopitvenim reagentom in aminom. Reakcija je počasna in njen obseg lahko zmanjšamo s hlajenjem reakcijske zmesi, kasnejšim dodatkom amina ter z dodatkom pomožnih nukleofilov, kot sta HOBt in DMAP (30). HOBt nastaja kot stranski produkt tudi pri sami reakciji. TBTU in HOBt sta topna v vodi, zato njuna odstranitev ni težavna. Pri reakciji karboksilne kisline z uronijevo soljo je potreben vsaj en ekvivalent baze (28).



**Slika 10:** Potek sklopitvene reakcije ob prisotnosti TBTU; povzeto po (28, 30).

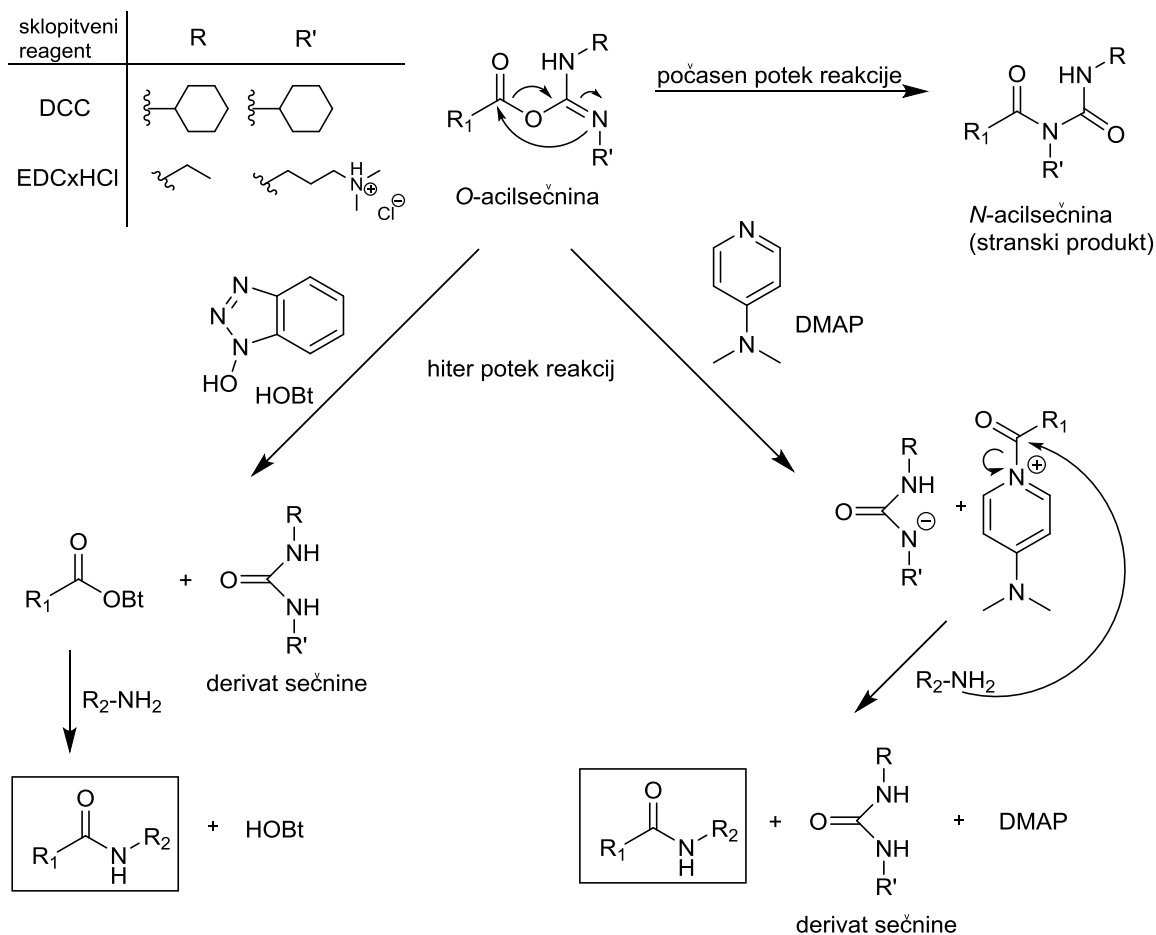
Pri postopkih B in C smo uporabili karbodiimid DCC, ki predstavlja najbolj tradicionalen sklopitveni reagent za tvorbo amidne vezi. Ogljik, ki se v karbodiimidu nahaja med dvema dušikovima atomoma, predstavlja elektrofil, katerega napade karboksilat, pri tem pa nastane *O*-acilsečnina (Slika 11). Le-ta je ena najreaktivnejših aktiviranih zvrsti, ki hitro zreagira z aaminsko komponento, pri čemer se tvori amidna vez. Ob presežku karboksilne kisline je *O*-acilsečnina podvržena napadu še druge molekule kisline, pri čemer nastane simetrični anhidrid, ki nato zreagira z aminom. Tretja možnost je, da nekaj *O*-acilsečnine ciklizira do oksazolona, ki pri reakciji z aminom prav tako tvori amidno vez. Oksazolon je manj reaktiven od drugih derivatov in lahko vodi do racemizacije (29). Pri uporabi DCC se izloči ekvivalentna količina *N,N'*-dicikloheksilsečnine. Le-ta je precej netopna, zato jo v večjem deležu lahko odstranimo s filtracijo, vendar je njene sledove težko odstraniti celo z uporabo kolonske kromatografije (29, 30). Pri uporabi karbodiimidov poteka podobno kot pri uronijevih solih stranska reakcija, pri kateri nastane gvanidinski derivat (31).



Slika 11: Tvorba amidne vezi ob prisotnosti DCC/EDC×HCl: nastanek *O*-acilsečnine ter njena reakcija z aminom (direktna in preko anhidrida); povzeto po (30, 31).

Slabosti teh reakcij sta pogosta racemizacija in prenos acilne skupine ter tvorba nereaktivne *N*-acilsečnine kot stranski produkt (Slika 12). Reakcija je ireverzibilna, saj se porabi kislina, ne da bi pri tem nastala amidna vez. Njena hitrost je med drugim odvisna od temperature in vrste topila (29). Obseg te stranske reakcije se lahko znatno zmanjša z reakcijo kisline in sklopitvenega reagenta pri 0 °C pred dodatkom amina ter z dodatkom pomožnega nukleofila. Le-ta reagira hitreje, kot poteka prenos acilne skupine na dušik sečnine, in tvori intermediat, ki je še vedno dovolj aktiviran, da omogoči sklopitev z aminom. Takšna pomožna nukleofila sta med drugimi DMAP in HOBt, ki smo ju uporabili tudi pri sintezi naših spojin (Slika 12) (30). Aktiviran ester, ki nastane s povezavo kisline s pomožnim nukleofilom, je manj reaktiven od *O*-acilsečnine in manj dovzeten za racemizacijo (32). Z dodatkom pomožnega nukleofila tako skrajšamo reakcijski čas,

zmanjšamo racemizacijo izhodnih substratov in omejimo tvorbo stranskih produktov, povezanih z uporabo sklopitvenih reagentov (31).



Slika 12: Tvorba stranskega produkta *N*-acilsečnina in zmanjšanje njenega nastajanja ob uporabi pomožnih nukleofilov HOBT in DMAP; povzeto po (30, 31).

Preglednica 4: Razlike v postopkih A, B in C pri sintezi spojin **3** in **4** ter izkoristek vsakega postopka.

Postopek	Sinteza spojine <b>3</b>			Sinteza spojine <b>4</b>		
	A	B	C	A	B	C
Sklopitveni reagent	TBTU	DCC	DCC	TBTU	DCC	DCC
Katalizator	DMAP	HOBT, DMAP	HOBT	DMAP	HOBT, DMAP	HOBT
Topilo	diklorometan	THF	etilacetat	diklorometan	diklorometan	etilacetat
Čas in T aktivacije	15 min, sobna T	15 min, sobna T	30 min, ledena kopel	3h, sobna T	15 min, sobna T	30 min, ledena kopel
Izkoristek	55,33 %	48,20 %	84,29 %	*33,73 %	*7,15 %	*81,54 %

\*Izkoristki sintez spojine **4** predstavljajo skupne izkoristke dveh zaporednih reakcij – odstranitve zaščitne skupine na dipeptidu in njegove sklopitve z Boc-Gly. Postopek odščitne je bil pri vseh treh postopkih (A, B in C) enak, zato ta ne bi smel bistveno vplivati na razlike v končnih izkoristkih.

Pri sintezi spojine **3** smo tvorili amidno vez med karboksilno skupino Boc-L-valina (spojina **1**) in aaminsko skupino D-glutaminske kisline z zaestrenimi karboksilnimi skupinami (spojina **2**). Nato smo na odščiteno aaminsko skupino dobljenega dipeptida pripeli Boc-glicin in tako dobili tripeptid Boc-Gly-L-Val-D-Glu(OEt)<sub>2</sub> (spojina **4**). S primerjavo izkoristkov ugotovimo, da je postopek C bistveno boljši od postopkov A in B ter da je postopek B od vseh treh najslabši. K dobremu izkoristku postopka C so najverjetneje doprinesli pogoji aktivacije karboksilne kisline – potek celotne aktivacije na ledeni kopeli in daljši čas aktivacije (30 minut). Pri postopku A ledene kopeli nismo uporabili, pri postopku B pa smo reakcijsko zmes pred dodatkom DCC postavili za 10 minut na ledeno kopel, vendar smo kopel nato odstranili, tako da je aktivacija potekala pri sobni temperaturi. Predolg čas aktivacije tudi ne daje dobrih rezultatov. Pri postopku A sinteze spojine **4** je bil čas aktivacije zelo dolg (3 ure), vendar se je izkoristek zmanjšal v primerjavi s postopkom A pri sintezi spojine **3**, kjer je potekala aktivacija 15 minut. Tretja razlika, ki je domnevno vplivala na učinkovitost reakcije je ta, da smo pri postopku C dodali pomožni nukleofil (HOBt) že pred dodatkom DCC, saj pozitivno vpliva na potek reakcije že med aktivacijo kisline. Pri postopkih A in B smo dodali pomožni nukleofil po aktivaciji skupaj z aminom. Pri postopku B smo uporabili dva pomožna nukleofila (HOBt in DMAP), vendar to verjetno ni vplivalo na izkoristek reakcije. Nekaj vpliva na izkoristek pa sta zagotovo imela celoten postopek izolacije, ki se je med postopki A, B in C nekoliko razlikoval, ter čiščenje spojin s kolonsko kromatografijo (pri spojini **4**, ki smo jo dobili po postopkih A in B). Poleg zgoraj naštetega ima pri sklopitvenih reakcijah veliko vlogo zagotovo tudi vrsta topila. Mogoče bi pri postopku A dobili boljše izkoristke, če bi namesto diklorometana uporabili npr. etilacetat. Tega so uporabili v študiji (28) pri izvajanju sklopitvenih reakcij s TBTU pri sobni temperaturi in dobili relativno dobre rezultate (izkoristek je bil vedno nad 50 %). Zanimivo je, da se je izkazala reakcija z DCC za boljšo, saj je sklapljanje z uronijevimi reagenti, kot je TBTU, ob prisotnosti baze dokazano bolj učinkovito od sklapljanja s karbodiimidom ob prisotnosti HOBt (32).

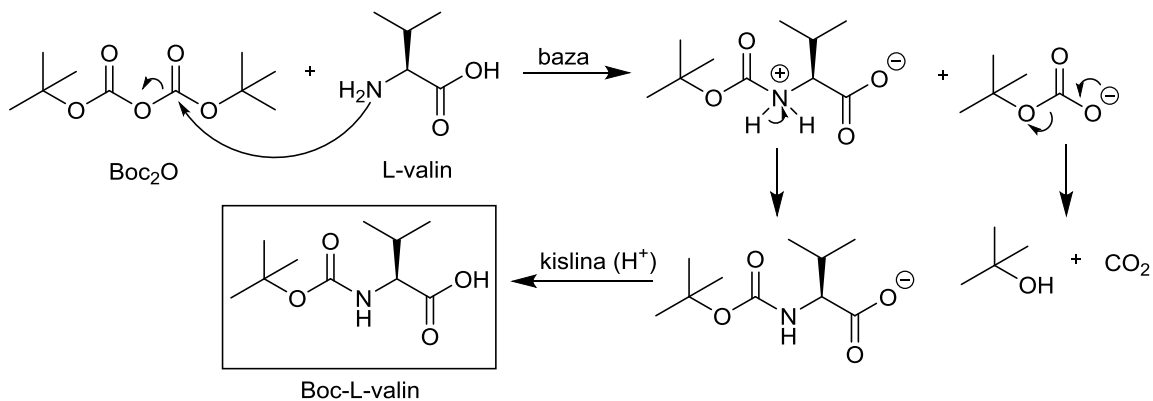
Zadnji korak pri sintezi končnih spojin (**5**, **6**, **7**, **8**, **9**, **10**) je bila tvorba amidne vezi med tripeptidom Gly-L-Val-D-Glu(OEt)<sub>2</sub> in ustrezno karboksilno kislino. Pri teh sklopitvah smo uporabljali *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilkarbodiimid hidroklorid (EDC×HCl), ki spada tako kot DCC v skupino karbodiimidnih sklopitvenih reagentov. Mehanizmi reakcije, tvorba stranskih produktov in potreba po pomožnih nukleofilih so enaki kot pri

DCC (Sliki 11 in 12). Ima pa EDC×HCl to prednost, da sta tako reagent kot *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilsečnina, ki nastane kot stranski produkt, topna v vodi, kar pripomore k njuni enostavni odstranitvi iz reakcijske mešanice (s spiranjem s kislno vodno raztopino) in lažji izolaciji produktov (29, 30).

Pri vseh šestih končnih spojinah smo tvorili amidno vez po istem postopku: tripeptid, kateremu smo predhodno odstranili Boc zaščito na amski skupini glicina, smo raztopili v diklorometanu, raztopino ohladili na ledeni kopeli, dodali prebitek baze DIPEA, ustrezno kislino, EDC×HCl in pomožna nukleofila (HOBt in DMAP), odstranili ledeno kopel ter pustili mešati pri sobni temperaturi. Reakcija je potekala 16–19 ur, le pri spojini **7** smo reakcijsko zmes pustili mešati 92 ur, vendar reakcija ni dala želenega produkta. Iz analiz nismo uspeli razbrati, katera spojina je pri sintezi nastala, prav tako ne moremo določiti razloga, zakaj reakcija ni potekla po načrtih, a dolg reakcijski čas na to ne bi smel vplivati. Izkoristki sintez spojin **5**, **6** in **10** znašajo okrog 60 %, pri spojinah **8** in **9** pa sta izkoristka nekoliko nižja (okrog 37 %), vendar še vedno zadovoljiva (to so izkoristki dveh zaporednih reakcij – odstranitve zaščitne skupine na tripeptidu in njegove sklopitve s kislino). Do izgub je zagotovo prišlo pri izolaciji produktov in najverjetneje se kljub dodatku HOBt in DMAP nismo popolnoma izognili stranskim reakcijam, poleg tega je možno, da odstranitev zaščitne skupine na tripeptidu ni bila popolna. Verjetno bi večjo učinkovitost reakcij in večji izkoristek dosegli s tem, da bi predčasno na ledeni kopeli ob prisotnosti sklopitvenega reagenta in pomožnih nukleofilov aktivirali kislino in šele nato dodali odščiten tripeptid. Čistost vseh končnih spojin je bila dobra (več kot 95 %), kar lahko razberemo iz kromatogramov HPLC. Spojini **6** in **10**, ki vsebujeta ciklopropan namesto dvojne vezi, imata dva dodatna stereogena centra, zato so pri teh dveh spojinah prisotni diastereoizomeri. 2-(3,4-difluorofenil)ciklopropan-1-karboksilna kislina, ki smo jo uporabili pri sintezi spojine **6**, je bila racemat dveh *cis* in dveh *trans* oblik, zato smo pri sintezi končne spojine dobili štiri diastereoizomere. *Trans*-2-fenilciklopropan-1-karboksilna kislina, ki smo jo uporabili pri sintezi spojine **10**, pa je bila zmes dveh enantiomerov ((1*R*,2*R*) in (1*S*,2*S*)), zato smo dobili dva diastereoizomera spojine **10**.

### 5.1.2. Uvedba in odstranitev *tert*-butilkarbamatne (Boc) zaščite na amski skupini

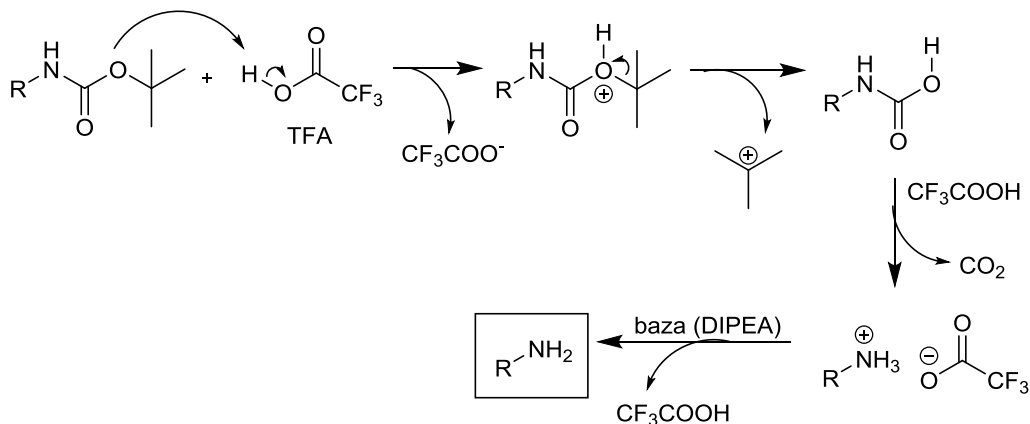
Aminokislina imajo dva reaktivna centra – amsko in karboksilno skupino. Naš cilj pri sklapljanju je, da omejimo reaktivnost na samo en center, saj bi v nasprotnem primeru dobili zmes različnih produktov. To dosežemo z zaščito skupin, za katere nočemo, da bi zreagirale. Ena od učinkovitih in pogosto uporabljenih zaščit amske skupine je *tert*-butilkarbamatna (Boc) zaščita. Uvedemo jo z reakcijo med di-*tert*-butil dikarbonatom ( $\text{Boc}_2\text{O}$ ) in amsko skupino ob prisotnosti baze, pri čemer se tvori karbamat. V našem eksperimentalnem delu smo Boc zaščito uvajali na amsko skupino L-valina (sinteza spojine **1**), pri čemer smo dobili Boc-L-valin (spojina **1**). S tem smo dosegli, da je v naslednjem koraku reakcija njegovega sklapljanja z D-Glu(OEt)<sub>2</sub> (spojina **2**) potekla le na karboksilni skupini L-valina. Natančnejši mehanizem uvedbe Boc zaščite na L-valin je prikazan na Sliki 13. Pri reakciji smo kot bazo uporabili NaOH, kot topilo pa zmes dioksana in vode. Reakcija je potekla s 96 % izkoristkom. Izolacija je vsebovala tudi nakisanje vodne faze, s čimer smo produkt pretvorili v neionizirano obliko. Pri tem koraku smo morali biti pazljivi, da je nismo nakisali preveč (samo do pH = 2–3), saj so karbamati v kislem nestabilni in bi se zaščitna skupina v tem primeru odcepila.



Slika 13: Uvedba Boc zaščite na amsko skupino L-valina; povzeto po (33).

Pri reakciji spojine **4** smo z enakim namenom, da bi zagotovili selektivno reakcijo na karboksilni skupini glicina, uporabili Boc-glicin z zaščiteno amsko skupino (vendar le-tega nismo sintetizirali sami). Pripeli smo ga na dipeptid L-Val-D-Glu(OEt)<sub>2</sub>, pri čemer je bila amska skupina L-valina želeno reaktivno mesto, zato je bilo potrebno pred reakcijo sklopitve na njej odstraniti Boc zaščito. Le-to se odstranjuje z acidolizo, za kar smo uporabili trifluoroocetno kislino (TFA) (Slika 14). Prav tako je bila v naslednjih reakcijah potrebna odstranitev Boc zaščite na tripeptidu Boc-Gly-L-Val-D-Glu(OEt)<sub>2</sub> (spojina **4**), s

čimer smo pridobili prosto amsko skupino na glicinu. Tja smo pripenjali različne karboksilne kisline in s tem tvorili končne spojine **5**, **6**, (**7**), **8**, **9** in **10**. Reakcije odščite so potekale v diklorometanu, 3–5,5 ur pri sobni temperaturi. TFA smo dodajali po kapljicah ob mešanju v ohlajeno raztopino Boc-zaščiteneh spojin. Za nevtralizacijo kisline in pretvorbo amske skupine v neprotonirano obliko smo uporabili bazo DIPEA.

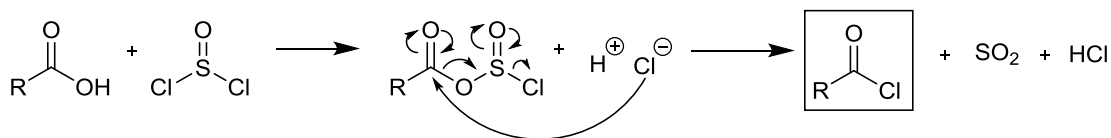


Slika 14: Odstranitev Boc zaščite s trifluoroocetno kislino; povzeto po (34).

### 5.1.3. Tvorba estrske vezi

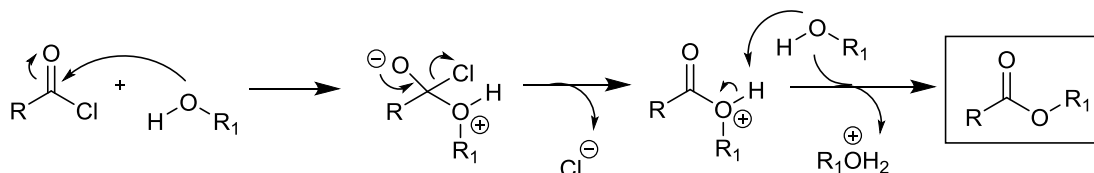
Naš eksperimentalni del je vseboval tudi več sintez estrske vezi. V večini primerov smo tvorili ester med karboksilno kislino in alkoholom. Pri tem sta podobno kot pri tvorbi amidne vezi pomembni aktivacija kisline in pritrnitev izstopajoče skupine na njen karboksilni karbonilni ogljik, kar omogoči napad hidroksilne skupine, pri čemer poteče nukleofilna substitucija (30).

Pri sintezi spojine **2** smo tvorili etilni ester na obeh karboksilnih skupinah D-glutaminske kisline. Primarni namen te reakcije je bil povečanje lipofilnosti končnih spojin, saj so predhodne študije pokazale, da je zaestritev prostih karboksilnih skupin na glutaminski kislini dezmuramilpeptidov vplivala na povečanje njihove aktivnosti. Poleg tega je etilni ester imel tudi vlogo zaščitne skupine pri sklopitvenih reakcijah. Alkilni estri se namreč ne štejejo med aktivirane vrste in se pogosto uporabljajo kot zaščitne skupine pri sintezi peptidov (30). Omenjeno reakcijo smo izvedli v etanolu z dodatkom tionil klorida (SOCl<sub>2</sub>). Etanol je služil istočasno kot nukleofilni reagent in kot topilo, s tionil kloridom pa smo pretvorili karboksilno skupino v bolj reaktiven acil klorid. Mehanizem te pretvorbe vključuje začetno nukleofilno substitucijo, pri čemer se tvori ustrezen aktiviran ester in kloridni anion. Naslednji korak je nukleofilni napad kloridnega aniona na aktiviran ester, s čimer se tvori ustrezen acil klorid (Slika 15) (30).



Slika 15: Reakcija pretvorbe karboksilne skupine v acil klorid ob prisotnosti tionil klorida; povzeto po (30).

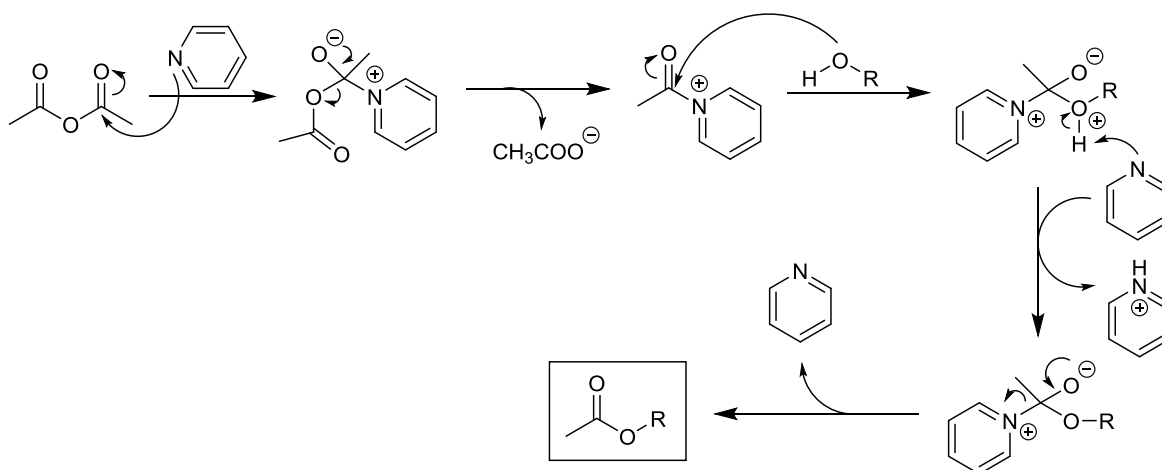
Aktivaciji kisline sledi nukleofilni napad etanola na njen karbonilni ogljik in izstop kloridnega aniona (Slika 16).



Slika 16: Napad hidroksilne skupine alkohola na acil klorid in tvorba estrske vezi; povzeto po (35).

Enak princip esterifikacije smo ubrali pri tvorbi metilnega estra na karboksilni skupini *trans*-ferulične kisline (sinteza spojine **11**), le da smo namesto etanola uporabili metanol. Obe esterifikaciji sta potekali pri povišani temperaturi (80 °C/70 °C), in sicer 21 oziroma 23,5 ur. Izkoristek je bil v obeh primerih 100 % (izračunana izkoristka sta bila sicer večja od teoretično možnega – verjetno z rotavapiranjem nismo odstranili popolnoma vsega topila in zato produkta nista bila popolnoma suha).

Dobljeni spojini **11** smo želeli zaestriti še aromatsko hidroksilno skupino (sinteza spojine **13** iz spojine **11**). Acetilacijo smo poskusili izvesti z acetanhidridom v piridinu ob prisotnosti DMAP.

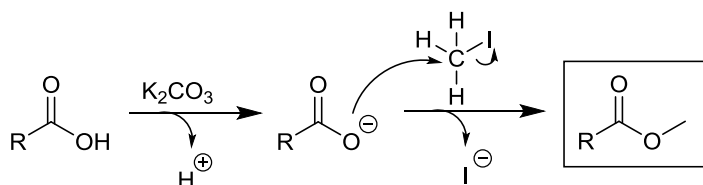


Slika 17: Piridin kot pomožni nukleofil pri reakciji tvorbe estrske vezi; povzeto po (35).



Anhidrid je podobno kot acil halid aktivirana zvrst, ki reagira z različnimi nukleofili, tudi alkoholi. Mehanizem reakcije je enak kot pri acil kloridih (Slika 16), le da je izstopajoča skupina namesto kloridnega iona acetatni ion. DMAP ima podobno kot pri sklopitvenih reakcijah z amini vlogo pomožnega nukleofila oziroma katalizatorja. Enako vlogo ima tudi piridin (Slika 17), ki je poleg tega še topilo in baza, ki nevtralizira pri reakciji nastalo očetno kislino. Reakcija je potekala 21 ur pri 30 °C, vendar ni potekla na celotni količini substrata. Z dobljeno zmesjo acetilirane in neacetilirane spojine smo ponovili reakcijo z enakimi reagenti, le da smo tokrat segrevali pri 80 °C, a reakcija spet ni potekla v celoti. Iz razmerja signalov na NMR spektru smo izračunali, da je bil delež acetilirane spojine 59 %. Z dobljeno zmesjo smo ponovno nastavili reakcijo esterifikacije in poskusili zaestrili še preostanek nezreagirane spojine. Pri tem smo uporabili acetilklorid, ki je močnejše acetilirno sredstvo od acetanhidrida. Reakcijo smo izvajali v tetrahidrofuranu ob prisotnosti piridina pri temperaturi 80 °C, vendar tvorba estra ni potekla, kar nam je potrdilo nespremenjeno razmerje med acetilirano in neacetilirano spojino. Razloga, zakaj reakcije niso potekle oziroma so potekle samo do določenega razmerja, nismo našli. Odločili smo se, da bomo spremenili vrstni red v reakcijski sekvenci, in sicer da bomo najprej zaestrili hidroksilno skupino in šele nato karboksilno skupino *trans*-ferulične kisline. Reakcijo acetilacije smo torej ponovili na hidroksilni skupini *trans*-ferulične kisline (s prosto karboksilno skupino), pri čemer smo ponovno uporabili acetanhidrid in DMAP v piridinu (sobna temperatura, 22,5 ur). Tokrat je reakcija potekla kvantitativno, s 83 % izkoristkom (sinteza spojine **14**).

Nastali spojini **14** smo nato zaestrili še karboksilno skupino (sinteza spojine **13** iz spojine **14**). Kot reagent smo uporabili metil jodid ob prisotnosti baze ( $K_2CO_3$ ). Baza na kislini odstrani proton in nastali karboksilatni ion predstavlja nukleofil, ki napade metil jodid, torej gre tudi v tem primeru za nukleofilno substitucijo (Slika 18) (36). Reakcija je potekla v acetonitrilu pri sobni temperaturi s 60,6 % izkoristkom.

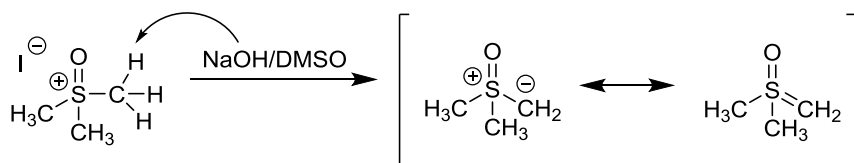


Slika 18: Tvorba metilnega estra z metil jodidom ob prisotnosti baze.

Estre na obeh funkcionalnih skupinah *trans*-ferulične kisline smo tvorili z namenom uvedbe zaščitnih skupin. Dvojno vez smo namreč želeli spremeniti v ciklopropan s pomočjo reakcije Corey-Chaykovsky in tako pridobiti še en obetaven mimetik sladkornega dela MDP, ki bi ga pripeli na naš sintetiziran tripeptid.

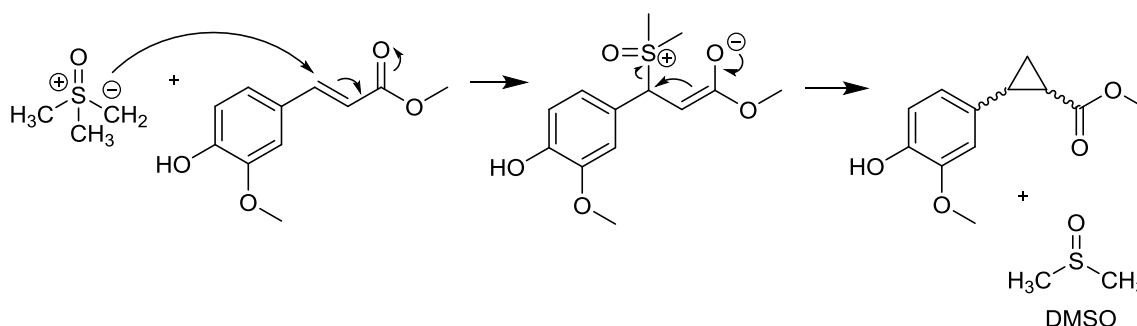
#### 5.1.4. Reakcija Corey-Chaykovsky

Ciklopropanski obroč je ciklični sistem, ki se večkrat uporablja za rigidizacijo in izboljšanje aktivnosti biološko aktivnih spojin. Substrati za ciklopropanacijo so običajno alkeni. Z reakcijo Corey-Chaykovsky se tvori derivate ciklopropana iz  $\alpha,\beta$ -nenasičenih ketonov/estrov. Pri tem se uporablja trimetilsulfoksonijev jodid, ki se ga ob prisotnosti močne baze *in situ* z deprotonacijo pretvori v dimetilsulfoksonijev metilid oziroma Corey-jev reagent (Slika 19). (37)



**Slika 19:** Prva stopnja reakcije: pretvorba trimetilsulfoksonijevega jodida v dimetilsulfoksonijev metilid ob prisotnosti močne baze; povzeto po (38).

Naslednja stopnja je nukleofilna 1,4-adicija nastalega Corey-jevega reagenta na  $\alpha,\beta$ -nenasičen keton/ester, čemur sledi zaprtje obroča in nastanek ciklopropana (Slika 20). Ta korak običajno zahteva segrevanje pri 50 °C. Pri reakciji nastaja kot stranski produkt dimetilsulfoksid (DMSO), le-tega pa uporabljamo tudi kot medij za izvedbo reakcije (37).



**Slika 20:** Druga stopnja reakcije: adicija Corey-jevega reagenta na  $\alpha,\beta$ -nenasičeno spojino in nastanek ciklopropanskega obroča; povzeto po (38).

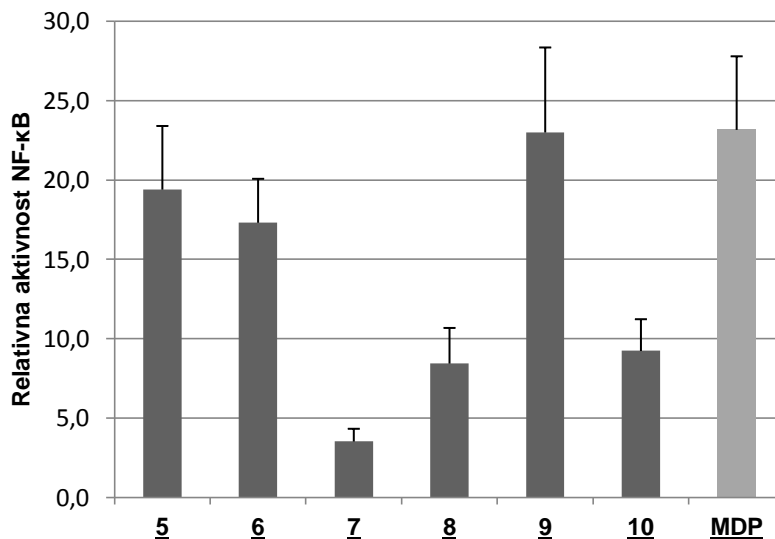
Prvotno smo želeli izvesti ciklopropanacijo na spojini **11** – *trans*-ferulični kislini z zaščiteno karboksilno skupino, ki predstavlja  $\alpha,\beta$ -nenasičen ester (sinteza spojine **12**). Kot

bazo smo uporabili brezvodni natrijev hidroksid (NaOH). Le-tega smo dobili tako, da smo uprašen NaOH koevaporirali s toluenom, saj azeotrop toluen-voda destilira. Reakcijo pretvorbe reagenta (trimetilsulfoksonijev jodid v dimetilsulfoksonijev metilid) smo izvajali 90 minut pri sobni temperaturi in nato 2,5 uri prav tako pri sobni temperaturi reakcijo tvorbe ciklopropana na spojini **11**. Reakcija ni potekla, zato smo jo ponovili s to razliko, da smo uporabili manjšo količino topila (DMSO) in drugo stopnjo reakcije izvajali pri 50–55 °C 21 ur. Tvorba ciklopropana tudi tokrat ni bila uspešna. Predvidevali smo, da potek reakcije moti prosta hidroksilna skupina na *para* mestu fenilnega obroča spojine **11**, zato smo v nadaljnjih reakcijah načrtovali njeno zaščito in sledečo izvedbo ciklopropanacije (sinteza spojine **15**) na spojini z zaščiteno hidroksilno skupino (spojina **13**). Reakcijo smo izvajali pod enakimi pogoji kot poskus ciklopropanacije na spojini **11**, le da smo uporabili še manj topila, reakcijsko zmes smo pred začetkom prve stopnje reakcije prepihali z argonom ter drugo stopnjo izvajali 22 ur pri 50 °C. Tudi v tretjem poskusu, ob zaščiteni hidroksilni skupini, nismo dobili zelenega produkta. Tehtnega razloga za to nismo našli, saj pogoji naših reakcij ustrezajo standardnim pogojem za ciklopropanacijo Corey-Chaykovsky, ki jih navaja literatura (37). Pretvorba trimetilsulfoksonijevega jodida v dimetilsulfoksonijev metilid običajno poteka v DMSO ob prisotnosti natrijevega hidrida (NaH) in traja 20 minut do 2 uri. Temu sledi dodatek  $\alpha,\beta$ -nenasičene spojine, ki pri 50 °C daje zelen derivat ciklopropana že po dvournem mešanju. Lahko bi poskusili izpeljati reakcijo z uporabo močnejše baze (NaH) in argonove atmosfere, vendar najverjetneje je razlog za neuspele reakcije v substratu in ne v postopku sinteze.

## **5.2. Biološko testiranje končnih sintetiziranih spojin**

Vseh šest sintetiziranih dezmuramilpeptidov smo ovrednotili glede na njihovo agonistično aktivnost na receptorje NOD2 z uporabo celične linije HEK-Blue<sup>TM</sup> hNOD2. Omenjene celice izdelajo s sočasnim vnosom človeškega gena NOD2 in optimiziranega poročevalskega gena za izločeno zarodno alkalno fosfatazo (SEAP) v celice HEK293. Stimulacija celic z agonistom NOD2 aktivira NF- $\kappa$ B in AP1, kar povzroči proizvodnjo encima SEAP (39). Količino izločenega encima SEAP v supernatantih celičnih kultur določimo z reagentom QUANTI-Blue<sup>TM</sup>, ki omogoča izvedbo hitrega in enostavnega kolorimetričnega encimskega testa, s katerim določimo aktivnost alkalnih fosfataz. V prisotnosti SEAP se barva reagenta QUANTI-Blue<sup>TM</sup> spremeni iz rožnate v vijolično/modro. Intenzivnost modrega odtenka odraža aktivnost alkalne fosfataze. Na

prisotnost SEAP kaže že sprememba barve, kvantitativno pa jo lahko določimo z merjenjem absorbance pri 620–655 nm (40). Rezultati biološkega testiranja naših spojin so prikazani na Grafu I. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili MDP. Spojine pri testiranih koncentracijah niso delovale citotoksično.



**Graf I: Rezultati biološkega testiranja – relativne aktivnosti NF-κB (glede na netretirane celice negativne kontrole) v celicah HEK-Blue™ hNOD2 po dodatku sintetiziranih dezmuramilpeptidov in MDP v končni koncentraciji 2 μM.**

Vse sintetizirane spojine imajo namesto sladkorne enote na tripeptidni del Gly-L-Val-D-Glu(OEt)<sub>2</sub> preko amidne vezi pripeto karboksilno kislino, ki ima v svoji strukturi fenilni obroč. Ta je od tripeptida oddaljen s strukturno različnimi distančniki in nekatere spojine imajo na fenilnem obroču vezane substituentne (Preglednica 5).

**Preglednica 5: Strukture skupin, pripetih na tripeptid Gly-L-Val-D-Glu(OEt)<sub>2</sub>, pri določenih spojinah.**

Strukturni fragment, prisoten med fenilnim obročem in tripeptidom		
akrilolni fragment	ciklopropankarbonilni fragment	1H-indol-2-karbonilni fragment
 5	 6	 8
 9	 10	
 načrtovana spojina 7		

Od vseh sintetiziranih spojin je pri biološkem testiranju najbolj izstopala spojina **9** s *trans*-feruličnim glikomimetikom ((*E*)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrioloilnim fragmentom), saj je imela največjo NOD2-agonistično aktivnost, in sicer 23,0-krat večjo glede na netretirane celice, kar je primerljivo z NOD2-agonistično aktivnostjo MDP (23,2-krat večjo). Nekoliko slabšo vendar še vedno dobro agonistično aktivnost (19,4-krat večjo) je pokazala spojina **5** s *trans*-cimetno kislino, pripeto na tripeptid, ki je po strukturi podobna spojini **9**, le da na fenilni obroč nima vezanih hidroksi in metoksi substituentov. Sklepamo, da navedena substituenta doprineseta k agonistični aktivnosti spojine. Prisotnost substituentov lahko vpliva na lipofilnost molekul, od katere so odvisni njihov prehod preko celičnih membran, dostopnost do receptorja NOD2 in posledična aktivnost. V našem primeru je bolj aktivna spojina **9** manj lipofilna (ClogP = 1,89) od spojine **5** (ClogP = 2,71), torej sprememba lipofilnosti ni razlog za povečano agonistično aktivnost, h kateri doprineseta hidroksi in metoksi substituenta, ampak imata verjetno pomembno vlogo pri prepoznavi in vezavi na receptor. Zavedati pa se moramo, da so omenjene vrednosti ClogP izračunane in ne izmerjene, ki bi edine lahko podale verodostojno razmerje med lipofilnostjo in agonistično aktivnostjo. Poleg tega večanje lipofilnosti molekule samo do neke meje pripomore k povečani prehodnosti membran. Obstaja namreč optimalna lipofilnost, ki maksimizira prehodnost molekul preko bioloških membran. Podobno aktivnost kot spojina **5** je pokazala tudi spojina **6** (17,3-krat večjo od negativne kontrole), ki ima *N*-acetilmuramilni del nadomeščen z 2-(3,4-difluorofenil)ciklopropan-1-karboksilno kislino. Med pripetima kislinama v spojinah **5** in **6** je torej razlika v dveh fluorovih atomih, vezanih na fenilni obroč, in v prisotnosti ciklopropanskega distančnika namesto dvojne vezi v spojini **6**. Spojina **10** je strukturno sorodna s spojino **5**, saj je edina razlika v nadomestitvi dvojne vezi s ciklopropanom. S ciklopropanacijo dvojne vezi smo se želeli izogniti morebitni neželeni Michaelovi adiciji z biološkimi nukleofili. Izkazalo se je, da je zamenjava dvojne vezi za ciklopropanski obroč aktivnost spojine prepolovila (aktivacija NOD2 glede na netretirane celice je bila pri spojini **10** 9,2-krat večja). Glede na to, da sta pri spojini **10** prisotna dva diastereoizomera, je možno, da je en diastereoizomer izrazito manj aktiven od drugega oziroma da je aktiven le eden od njiju. Spojino **10** lahko po strukturi primerjamo tudi s spojino **6**. Razlikujeta se v vezanih fluorovih atomih na mestih 3 in 4 fenilnega obroča pri spojini **6** in v konfiguraciji na ogljikovih atomih ciklopropanskega obroča, pri čemer je pri spojini **10** usmeritev substituentov na ciklopropanu (1*R*,2*R*) oziroma (1*S*,2*S*), medtem ko je spojina **6** racemat obeh *cis* in *trans*

oblik (4 diastereoizomeri). Na fenilni obroč pripeta fluora sicer v teoriji malenkostno doprineseta k lipofilnosti molekule (ClogP (**10**) = 2,31; ClogP (**6**) = 2,53), kar lahko nekoliko vpliva na izboljšano aktivnost spojine **6**, vendar pa je glavni razlog za takšno razliko v aktivnosti verjetno v konformacijskih razlikah. Na aktivnost spojin zagotovo vpliva konformacija fenilciklopropanskega fragmenta, saj ta vpliva na usmerjenost lipofilnega fenilnega obroča, ta pa na vezavo spojine na receptor. Tovrstni vpliv bi potrdili, če bi pri biološkem testiranju uporabili raztopine čistih diastereoizomerov in tako testirali aktivnost vsakega posebej. Primerljivo aktivnost s spojino **10** je imela spojina **8** (8,4-krat večjo od negativne kontrole) s 6-fenil-1*H*-indol-2-karbonilnim fragmentom, vendar se je v primerjavi z drugimi boljšimi sintetiziranimi spojinami izkazala kot nezanimiv kandidat, saj jo je sintezno težje modificirati. S spektroskopskimi metodami smo potrdili, da se struktura sintetizirane spojine **7** ne ujema z načrtovano, kar odražajo tudi rezultati biološkega testiranja, saj je NOD2-agonistična aktivnost spojine zelo nizka (3,5-krat večja od negativne kontrole). Glede na to, da je struktura načrtovane spojine **7** podobna strukturi spojine **5** (načrtovana spojina **7** ima na mestih 3 in 4 fenilnega obroča cinamoilnega fragmenta vezana še fluora), bi lahko pričakovali, da bo njena aktivnost vsaj tako visoka kot pri spojini **5** oziroma lahko še višja. Zato je smiselno v nadaljnje raziskave agonistov NOD2 vključiti tudi našo načrtovano spojino **7**, torej na tripeptidno osnovo vezati (*E*)-3-(3,4-difluorofenil)akrilno kislino. Glede na to, da je spojina **9** izkazala tako dobro agonistično delovanje in jo lahko označimo za najbolj obetavno spojino iz naše serije sintetiziranih agonistov, bi bilo zanimivo preveriti še aktivnost derivata, kjer bi dvojno vez nadomestili s ciklopropanom. To smo tudi želeli storiti, vendar nam ciklopropanacija dvojne vezi na *trans*-ferulični kislini ni uspela. Iz primerjave spojin **5** in **10** sicer lahko sklepamo, da ciklopropanski derivat ne bi imel boljše agonistične aktivnosti od spojine **9**, vendar ga je vseeno smiselno vključiti v nadaljnje raziskave, saj je prednost takšne spojine v tem, da ne predstavlja Michaelovega substrata.

Naši rezultati so pokazali, da je ustrezno substituiran cinamoilni fragment bolj ugoden za NOD2-agonistično delovanje dezmuramilpeptidnega tipa spojin kot 6-fenil-1*H*-indol-2-karbonilni fragment. Fluoro, hidroksi in metoksi substituenti na fenilnem obroču so doprinesli k povečani aktivnosti. Nadomestitev dvojne vezi s ciklopropanom pa se v našem primeru ni pokazala kot učinkovita, vendar bi bilo potrebno preveriti, ali je to posledica različnih aktivnosti diastereoizomerov.

## 6. SKLEPI

- Sintetizirali smo pet novih dezmuramilpeptidov, in sicer aciliranih derivatov tripeptida Gly-L-Val-D-Glu(OEt)<sub>2</sub> kot mimetikov MDP, in ovrednotili njihovo NOD2-agonistično aktivnost z uporabo celične linije HEK-Blue<sup>TM</sup> hNOD2.
- Kot mimetike sladkornega dela MDP smo na tripeptid pripenjali ustrezne karboksilne kisline, in sicer smo na osnovi rezultatov iz prejšnjih raziskav uporabili 6-fenil-1*H*-indol-2-karbonilni oziroma cinamoilni fragment ter njune strukturno sorodne derivate.
- Največjo NOD2-agonistično aktivnost, ki je primerljiva z MDP, je izkazala spojina **9** (dietil ((*E*)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)akrilolil)glicil-L-valil-D-glutamat), pri kateri smo na tripeptid vezali *trans*-ferulično kislino.
- Dobro agonistično aktivnost sta izkazali tudi spojini **5** (dietil cinamoilglicil-L-valil-D-glutamat) in **6** ((2-(3,4-difluorofenil)ciklopropan-1-karbonil)glicil-L-valil-D-glutamat).
- Substituiran cinamoilni fragment se je izkazal kot boljši mimetik sladkorne enote MDP od 6-fenil-1*H*-indol-2-karbonilnega fragmenta. K povečani aktivnosti so doprinesli fluoro, hidroksi in metoksi substituenti na cinamoilnem fenilnem obroču. Nadomestitev dvojne vezi s ciklopropanom pa se ni izkazala za učinkovito.
- Reakcija ciklopropanacije dvojne vezi na zaščiteni *trans*-ferulični kislini nam ni uspela.
- Spojina **9** predstavlja dobro osnovo za nadaljnje raziskave in optimizacijo dezmuramilpeptidov kot potencialnih imunoadjuvansov. V nadaljnje raziskave agonistov NOD2 bi bilo smiselno vključiti še: (i) (*E*)-3-(3,4-difluorofenil)akrilolilni fragment, s katerim smo načrtovali sintezo spojine **7**, (ii) 2-(4-hidroksi-3-metoksifenil)ciklopropan-1-karbonilni fragment, ki ga dobimo s ciklopropanacijo dvojne vezi na *trans*-ferulični kislini, ter (iii) testiranje aktivnosti posameznih diastereoizomerov ciklopropanskih derivatov.

## 7. LITERATURA

1. Vozelj M: Temelji imunologije, 1. izd., DZS, Ljubljana, 2000: 2–14, 77–79, 379–382, 435, 448.
2. Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I: Immunology, 7th ed., Elsevier Mosby, Edinburgh, 2006: 6–10, 20, 127, 262, 330–331.
3. Abbas AK, Lichtman AH: Cellular and Molecular Immunology, 5th updated ed., Elsevier Saunders, Philadelphia, 2005: 243, 275–278, 294.
4. Sukhithasri V, Nisha N, Biswas L, Anil Kumar V, Biswas R: Innate immune recognition of microbial cell wall components and microbial strategies to evade such recognitions. *Microbiol Res* 2013; 168 (7): 396–406.
5. Sultan Chaudhry: Introduction to Immunology. <http://www.pathophys.org/immunology/> (dostop: 31. 1. 2016)
6. Fakulteta za medicino in kirurgijo Univerze v Pavii: Evolution of Immunity. [http://nfs.unipv.it/nfs/minf/dispense/immunology/lectures/files/evolution\\_immunity.html](http://nfs.unipv.it/nfs/minf/dispense/immunology/lectures/files/evolution_immunity.html) (dostop: 31. 1. 2016)
7. Krishnaswamy JK, Chu T, Eisenbarth SC: Beyond pattern recognition: NOD-like receptors in dendritic cells. *Trends Immunol* 2013; 34 (5): 224–233.
8. Van Gorp H, Kuchmiy A, Van Hauwermeiren F, Lamkanfi M: NOD-like receptors interfacing the immune and reproductive systems. *FEBS J* 2014; 281 (20): 4568–4582.
9. Kersse K, Bertrand MJ, Lamkanfi M, Vandenabeele P: NOD-like receptors and the innate immune system: coping with danger, damage and death. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011; 22 (5–6): 257–276.
10. Franchi L, Warner N, Viani K, Nuñez G: Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev* 2009; 227 (1): 106–128.
11. Salem M, Seidelin JB, Rogler G, Nielsen OH: Muramyl dipeptide responsive pathways in Crohn's disease: from NOD2 and beyond. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70 (18): 3391–3404.
12. Antosz H, Osiak M: NOD1 and NOD2 receptors: integral members of the innate and adaptive immunity system. *Acta Biochim Pol* 2013; 60 (3): 351–360.
13. Boyle JP, Parkhouse R, Monie TP: Insights into the molecular basis of the NOD2 signalling pathway. *Open Biol* 2014; 4 (12).



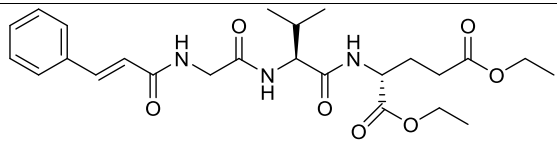
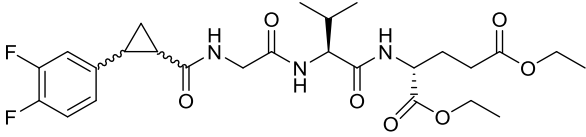
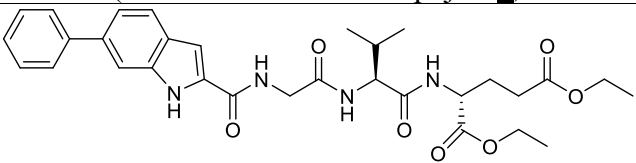
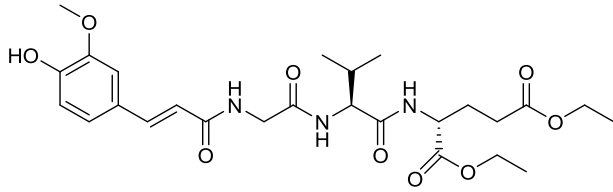
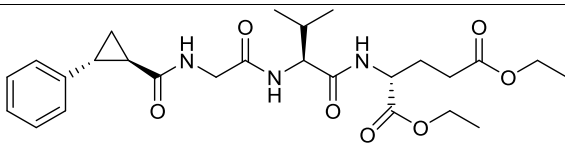
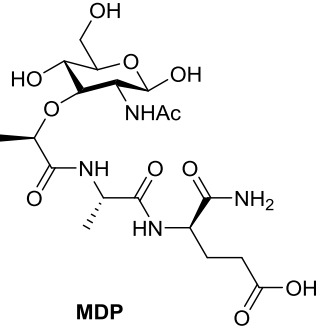
14. Jakopin Ž: Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) inhibitors: a rational approach toward inhibition of NOD signaling pathway. *J Med Chem* 2014; 57 (16): 6897–6918.
15. Sorbara MT, Philpott DJ: Peptidoglycan: a critical activator of the mammalian immune system during infection and homeostasis. *Immunol Rev* 2011; 243 (1): 40–60.
16. Wheeler R, Chevalier G, Eberl G, Gomperts Boneca I: The biology of bacterial peptidoglycans and their impact on host immunity and physiology. *Cell Microbiol* 2014; 16 (7): 1014–1023.
17. InvivoGen: Nod-Like Receptors – Review. <http://www.invivogen.com/review-nlr> (dostop: 20. 4. 2016)
18. Midlands Technical College: Functional Anatomy Of Prokaryotic And Eukaryotic Cells, The Cell Wall. <http://classes.midlandstech.edu/carterp/courses/bio225/chap04/lecture4.htm> (dostop: 24. 4. 2016)
19. Jakopin Ž: Murabutide revisited: a review of its pleiotropic biological effects. *Curr Med Chem* 2013; 20 (16): 2068–2079.
20. Geddes K, Magalhães JG, and Girardin SE: Unleashing the therapeutic potential of NOD-like receptors. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8 (6): 465–479.
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. 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.
23. 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.
24. 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.

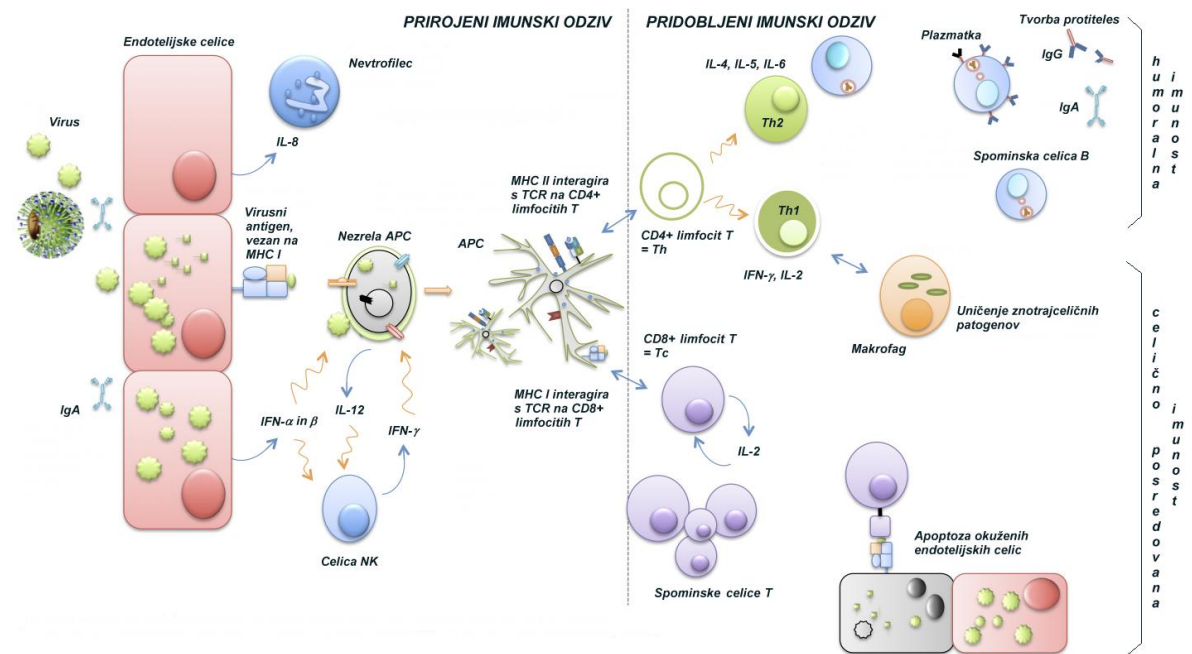
25. Sollner M, Pečar S, Štalc A: The influence of the lipophilicity of 7-oxoacyl-L-alanyl-D-isoglutamines on their immunorestitution activity in vivo. *Eur J Med Chem* 1996; 31: 927–933.
26. Sollner M, Kotnik V, Pečar, Štalc A, Simčič S, Povšič L, Herzog-Wraber B, Klampfer L, Ihan A, Grosman P: Apyrogenic synthetic desmuramyldipeptide, LK-409, with immunomodulatory properties. *Agents Actions* 1993; 38 (3–4): 273–280.
27. Gobec S, Sollner-Dolenc M, Urleb U, Wraber B, Simčič S, Filipič M: Modulation of cytokine production by some phthalimido-desmuramyl dipeptides and their cytotoxicity. *Farmaco* 2004; 59 (5): 345–352.
28. Balalaie S, Mahdidoust M, Eshaghi-Najafabadi R: 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate as an efficient coupling reagent for the amidation and phenylhydrazination of carboxylic acids at room temperature. *J Iran Chem Soc* 2007; 4 (3): 364–369.
29. El-Faham A, Albericio F: Peptide coupling reagents, more than a letter soup. *Chem Rev* 2011; 111 (11): 6557–6602.
30. Montalbetti CAGN, Falque V: Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* 2005; 61 (46): 10827–10852.
31. Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, Pečar S: Farmacevtska kemija III: vaje in seminarji, UL-FFA, Ljubljana, 2010: 7, 8.
32. Albericio F: Developments in peptide and amide synthesis. *Curr Opin Chem Biol* 2004; 8 (3): 211–221.
33. Common Organic Chemistry: Boc Protection (Boc<sub>2</sub>O + Base): Mechanism. [http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn\\_Pages/Boc\\_Protection/Boc\\_Protection\\_Boc2O\\_Base\\_Mech.htm](http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_Boc2O_Base_Mech.htm) (dostop: 21. 7. 2016)
34. Common Organic Chemistry: Boc Deprotection (TFA): Mechanism. [http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn\\_Pages/Boc\\_Protection/Boc\\_Protection\\_TFA\\_Mech.htm](http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_TFA_Mech.htm) (dostop: 21. 7. 2016)
35. Wepplo P: *The Language of Organic Chemistry: A Guide to Organic Chemistry Mechanisms*, Curved Arrow Press, Princeton NJ, 2006: 41. Dostop (21. 7. 2016): [http://curvedarrowpress.com/contact/register\\_assets/TLOCD60108.pdf](http://curvedarrowpress.com/contact/register_assets/TLOCD60108.pdf)
36. Avila-Zárraga JG, Martínez R: Efficient methylation of carboxylic acids with potassium hydroxide/methyl sulfoxide and iodomethane. *Synthetic Communications* 2001; 31 (14): 2177–2183.

37. Ciaccio JA, Aman CE: »Instant methylide« modification of the Corey-Chaykovsky cyclopropanation reaction. *Synthetic Communications* 2006; 36 (10): 1333–1341.
38. Organic Chemistry Portal: Corey-Chaykovsky Reaction. <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/corey-chaykovsky-reaction.shtm> (dostop: 21. 7. 2016)
39. InvivoGen: HEK-Blue™ hNOD2. <http://www.invivogen.com/hek-blue-hnod2> (dostop: 21. 7. 2016)
40. InvivoGen: QUANTI-Blue™. <http://www.invivogen.com/quant-blue> (dostop: 21. 7. 2016)

## PRILOGA

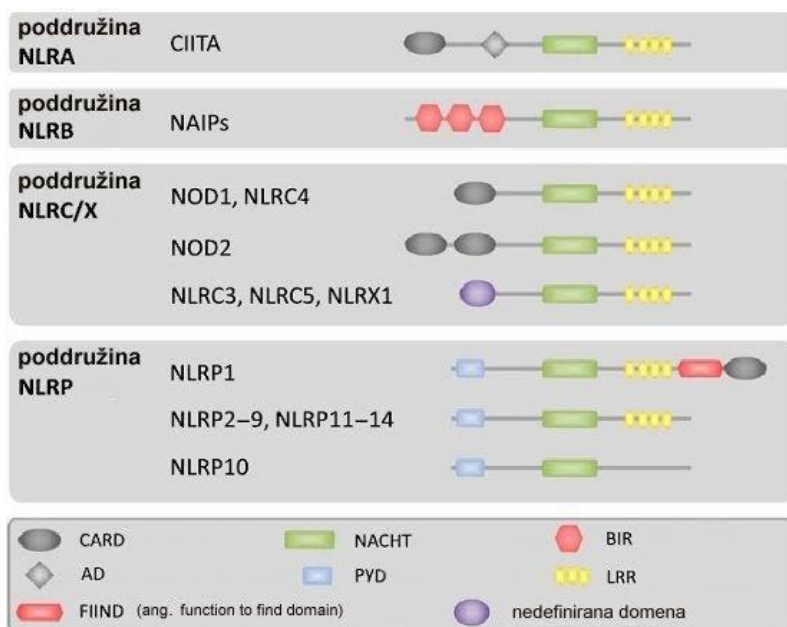
Priloga I: Rezultati biološkega testiranja sintetiziranih dezmuramilpeptidov na celični liniji HEK-Blue™ hNOD2.

Spojina	Relativna aktivnost NF-κB		
	Test A	Test B	Povprečna vrednost ± SD
 <p style="text-align: center;"><b>5</b></p>	16,6	22,2	19,4 ± 4,0
 <p style="text-align: center;"><b>6</b></p>	15,4	19,3	17,3 ± 2,8
<p style="text-align: center;">produkt, ki je nastal pri sintezi spojine <b>7</b> (ne ustreza načrtovani spojini <b>7</b>)</p>	3,0	4,1	3,5 ± 0,8
 <p style="text-align: center;"><b>8</b></p>	6,9	10,0	8,4 ± 2,2
 <p style="text-align: center;"><b>9</b></p>	19,2	26,8	23,0 ± 5,4
 <p style="text-align: center;"><b>10</b></p>	7,8	10,7	9,2 ± 2,0
 <p style="text-align: center;"><b>MDP</b></p>	19,9	26,4	23,2 ± 4,6



**Priloga II: Imunski odziv v primeru okužbe z virusom; prirejeno po (5).**

Po okužbi endotelijske celice in makrofagi sproščajo TNF- $\alpha$  in IL-1, ki sta glavna mediatorja vnetja, IFN- $\alpha$  in  $\beta$ , ki vplivata na aktivacijo APC in celic NK, ter kemokine (npr. IL-8), ki privabljajo nevtrofilce in druge imunske celice. Aktivirajo se APC, ki na svoji površini izražajo molekule MHC z vezanimi virusnimi peptidi. Fagociti izločajo IL-12 in IL-18, ki stimulirata celice NK, te pa nato z izločanjem IFN- $\gamma$  aktivirajo makrofage. Aktivirane APC potujejo do bezgavk, kjer predstavijo antigene nezrelim limfocitom T preko interakcij med molekulami MHC (razreda I in II) s T-celičnimi receptorji (TCR). To, skupaj s kostimulatornimi signali, privede do aktivacije in proliferacije limfocitov T. Aktivirani CD8<sup>+</sup> citotoksični limfociti T potujejo na mesto okužbe, kjer prepoznajo okužene endotelijske celice in jih uničijo (apoptoza). Aktivirani CD4<sup>+</sup> limfociti T diferencirajo v dve skupini celic. Celice pomagalke Th1 aktivirajo fagocite in s tem uničenju znotrajceličnih patogenov, celice pomagalke Th2 pa se vežejo z nezrelimi limfociti B in inducirajo tvorbo plazmatk ter spominskih celic B, kar vodi v humoralno imunost oziroma tvorbo protiteles. Legenda: Th – celica T pomagalke, Tc – celica T ubijalka (citotoksična celica), CD – označevalec pripadnosti, Ig – imunoglobulin; (5, 2).



Priloga III: Shematski prikaz proteinov NLR in njihovih domen; prirejeno po (8).

V skupino NLRA spada CIITA, skupina NLRB pa tudi vsebuje samo en receptor – NAIP. Skupina NLRC vsebuje 6 receptorjev (NOD1, NOD2, NLRC3, NLRC4 (IPAF), NLRC5 in NLRX1), skupina NLRP pa 14 (NLRP1–NLRP14). NLRP1 je edini receptor, ki ima dodatno domeno CARD na C-terminalnem koncu. Skupina NLRC je nekoliko bolj kompleksna. Receptorja NLRC3 in NLRC5 vsebujeta efektorsko domeno, za katero pa še ni potrjeno, da je domena CARD. Receptor NLRX1 sodi v skupino NLRC, ker ima nedefinirano domeno »X«, ki je podobna domeni CARD (9). Nekateri pa ga uvrščajo v dodatno, peto poddružino (10).

Skupina NLRC je nekoliko bolj kompleksna. Receptorja NLRC3 in NLRC5 vsebujeta efektorsko domeno, za katero pa še ni potrjeno, da je domena CARD. Receptor NLRX1 sodi v skupino NLRC, ker ima nedefinirano domeno »X«, ki je podobna domeni CARD (9). Nekateri pa ga uvrščajo v dodatno, peto poddružino (10).

Priloga IV: Strukturne formule MDP in aktivnih derivatov MDP z ohranjenim *N*-acetilmuramilnim delom in povečano lipofilnostjo; prirejeno po (24).

