

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JAKA KODELA

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA *N,N*-DIALKILNIH ANALOGO
DIPEPTIDA D-Glu-*meso*-DAP S POTENCIALNIM
IMUNOMODULATORNIM DELOVANJEM**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF *N,N*-DIALKYL D-Glu-*meso*-DAP
ANALOGS WITH POTENTIAL IMMUNOMODULATORY EFFECT**

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljal na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Žige Jakopina, mag. farm. Spektroskopske meritve in ostale analize so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo, Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo in na Institutu »Jožef Stefan«. Biološko vrednotenje končnih spojin je opravila dr. Martina Gobec, mag. farm. na Fakulteti za farmacijo.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem doc. dr. Žigi Jakopinu za odlično mentorstvo ter tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko kemijo, ki so me sprejeli kot svojega člana, ustvarili odlično delovno okolje in mi bili vedno pripravljene pomagati.

Hvala Toniju za pomoč v laboratoriju in Biljani, Davidu, Mihi ter vsem ostalim kolegom, ki so kakorkoli pripomogli k nastajanju te diplomske naloge.

Posebna zahvala gre tudi dr. Martini Gobec, ki je izvedla biološka testiranja sintetiziranih spojin.

Na koncu bi se rad zahvalil še svoji družini, ki mi je vedno stala ob strani.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelal pod vodstvom mentorja doc. dr. Žige Jakopina, mag. farm.

Jaka Kodela

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

Član diplomske komisije: asist. dr. Ilija Ilić, mag. farm.

VSEBINA

I. POVZETEK	V
II. ABSTRACT	VI
III. SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1. UVOD.....	1
1.1 IMUNSKI SISTEM.....	1
1.1.1 Prirojeni imunski sistem.....	1
1.1.2 Pridobljeni imunski sistem	1
1.1.3 Medcelična komunikacija in detekcija telesu tujih snovi.....	2
1.2 RECEPTORJI ZA PREPOZNAVO VZORCEV (PRR).....	5
1.2.1 Toll-u podobni receptorji.....	6
1.2.2 Receptorji podobni RIG-I.....	9
1.2.2 NOD-u podobni receptorji	10
1.3 RECEPTORJI NOD1	13
1.3.1 Mehanizem delovanja receptorjev NOD1	14
1.3.2 Odnos med strukturo in delovanjem (SAR) agonistov NOD1	16
1.3.3 Potencial agonistov in antagonistov receptorjev NOD1	20
2. NAMEN DELA.....	23
3. MATERIALI IN METODE.....	28
4. EKSPERIMENTALNI DEL.....	31
4.1 SINTEZA (2 <i>R</i>)-1-METOKSI-4-(METILTIO)-1-OKSO-2-BUTANAMINIJEVEGA KLORIDA (1)	31
4.2 SINTEZA (2 <i>S</i>)-1-METOKSI-4-(METILTIO)-1-OKSO-2-BUTANAMINIJEVEGA KLORIDA (2)	32
4.3 SINTEZA METIL (2 <i>R</i>)-2-{[(BENZILOKSI)KARBONIL]AMINO}-4-(METILTIO)BUTANOATA (3).....	33
4.4 SINTEZA METIL (2 <i>S</i>)-2-{[(BENZILOKSI)KARBONIL]AMINO}-4-(METILTIO)BUTANOATA (4).....	34
4.5 SINTEZA METIL (2 <i>R</i>)-2-{[(BENZILOKSI)KARBONIL]AMINO}-4-(METILSULFINIL)BUTANOATA (5)	35
4.6 SINTEZA METIL (2 <i>S</i>)-2-{[(BENZILOKSI)KARBONIL]AMINO}-4-(METILSULFINIL)BUTANOATA (6)	36
4.7 SINTEZA METIL (2 <i>R</i>)-2-{[(BENZILOKSI)KARBONIL]AMINO}-3-BUTENOATA (7).....	37

4.8	SINTEZA METIL (2 <i>S</i>)-2-[[<i>(BENZILOKSI)KARBONIL</i>]AMINO]-3-BUTENOATA (8)	38
4.9	SINTEZA (1 <i>R</i>)-1-KARBOKSI-2-PROPEN-1-AMINIJEVEGA KLOORIDA (9)	39
4.10	SINTEZA (1 <i>S</i>)-1-KARBOKSI-2-PROPEN-1-AMINIJEVEGA KLOORIDA (10)	40
4.11	SINTEZA (2 <i>R</i>)-2-[[<i>(TERC-BUTOKSIKARBONIL)AMINO</i>]-3-BUTENOJSKE KISLINE (11).....	41
4.12	SINTEZA <i>TERC</i> -BUTIL (2 <i>R</i>)-2-[[<i>(TERC-BUTOKSIKARBONIL)AMINO</i>]-3-BUTENOATA (12)	42
4.13	SINTEZA (2 <i>S</i>)-2-[[<i>(9H-FLUOREN-9-ILMETOKSI)KARBONIL</i>]AMINO]-3-BUTENOJSKE KISLINE (13)	43
4.14	SINTEZA <i>TERC</i> -BUTIL (2 <i>S</i>)-2-[[<i>(9H-FLUOREN-9-ILMETOKSI)KARBONIL</i>]AMINO]-3-BUTENOATA (14).....	44
4.15	SINTEZA (2 <i>R</i>)-2-[[<i>(TERC-BUTOKSIKARBONIL)AMINO</i>]-4-PENTENOJSKE KISLINE (15).....	45
4.16	SINTEZA <i>TERC</i> -BUTIL (2 <i>R</i>)-2-[[<i>(TERC-BUTOKSIKARBONIL)AMINO</i>]-4-PENTENOATA (16)	46
4.17	SINTEZA (2 <i>S</i>)-2-[[<i>(9H-FLUOREN-9-ILMETOKSI)KARBONIL</i>]AMINO]-4-PENTENOJSKE KISLINE (17).....	47
4.18	SINTEZA <i>TERC</i> -BUTIL (2 <i>S</i>)-2-[[<i>(9H-FLUOREN-9-ILMETOKSI)KARBONILAMINO</i>]-4-PENTENOATA (18).....	48
4.19	SINTEZA DI- <i>(TERC-BUTIL)</i> (2 <i>S</i> ,3 <i>E</i> ,6 <i>R</i>)-6-[[<i>(TERC-BUTOKSIKARBONIL)AMINO</i>]-2-[[<i>(9H-FLUOREN-9-ILMETOKSI)KARBONIL</i>]AMINO]-3-HEPTENDIOATA (19)	50
4.20	SINTEZA DI- <i>(TERC-BUTIL)</i> (2 <i>R</i> ,3 <i>E</i> ,6 <i>S</i> ,)-2-[[<i>(TERC-BUTOKSIKARBONIL)AMINO</i>]-6-[[<i>(9H-FLUOREN-9-ILMETOKSI)KARBONIL</i>]AMINO]-3-HEPTENDIOATA (20)	51
4.21	SINTEZA (4 <i>R</i>)-4-AMINO-5- <i>TERC</i> -BUTOKSI-5-OKSOPENTANOJSKE KISLINE (21).....	53
4.22	SINTEZA (4 <i>R</i>)-5- <i>TERC</i> -BUTOKSI-4-(DIDODECILAMINO)-5-OKSOPENTANOJSKE KISLINE (22).....	54
4.23	SINTEZA TRI- <i>TERC</i> -BUTIL (6 <i>R</i> ,8 <i>E</i> ,10 <i>S</i> ,15 <i>R</i>)-16-DODECIL-2,2-DIMETIL-4,12-DIOKSO-3-OKSA-5,11,16-TRIAZA-8-OKTAKOZEN-6,10,15-TRIKARBOKSILATA (23)	55
4.24	SINTEZA <i>N</i> -{(1 <i>R</i>)-4-[(1 <i>S</i> ,2 <i>E</i> ,5 <i>R</i>)-5-AMONIO-1,5-DIKARBOKSI-2-PENTENILAMINO]-1-KARBOKSI-4-OKSOBUTIL}- <i>N</i> -DODECILDODEKAN-1-AMINIJEVEGA DI-2,2,2-TRIFLUOROACETATA (24)	56
4.25	SINTEZA TRI- <i>TERC</i> -BUTIL (6 <i>R</i> ,7 <i>E</i> ,10 <i>S</i> ,15 <i>R</i>)-16-DODECIL-2,2-DIMETIL-4,12-DIOKSO-3-OKSA-5,11,16-TRIAZA-7-OKTAKOZEN-6,10,15-TRIKARBOKSILATA (25)	58

4.26	SINTEZA <i>N</i> -{(1 <i>R</i>)-4-[(1 <i>S</i> ,3 <i>E</i> ,5 <i>R</i>)-5-AMONIO-1,5-DIKARBOKSI-3-PENTENILAMINO]-1-KARBOKSI-4-OKSOBUTIL}- <i>N</i> -DODECILDODEKAN-1-AMINIJEVEGA DI-2,2,2-TRIFLUOROACETATA (26)	59
5.	REZULTATI IN RAZPRAVA	61
5.1	TVORBA METILNEGA ESTRA (SINTEZA SPOJIN 1 IN 2)	61
5.2	UVEDBA BENZIL KARBAMATNE ZAŠČITNE SKUPINE (SINTEZA SPOJIN 3 IN 4)	61
5.3	OKSIDACIJA SULFIDA V SULFOKSID (SINTEZA SPOJIN 5 IN 6)	62
5.4	DEHIDROSULFENILACIJA SULFOKSIDA (SINTEZA SPOJIN 7 IN 8)	62
5.5	ODSTRANITEV METILNEGA ESTRA IN BENZIL KARBAMATA (SINTEZA SPOJIN 9 IN 10)	64
5.6	ZAŠČITA FUNKCIONALNIH SKUPIN VINIL IN ALILGLICINOV (SINTEZA SPOJIN 11–18)	64
5.7	OLEFINSKA METATEZA (SINTEZA SPOJIN 19 IN 20)	64
5.8	ODSTRANITEV ZAŠČITNE SKUPINE Fmoc (SINTEZA SPOJINE 21)	67
5.9	REDUKTIVNO AMINIRANJE (SINTEZA SPOJINE 22)	68
5.10	ODSTRANITEV Fmoc IN TVORBA PEPTIDNE VEZI (SINTEZA SPOJIN 23 IN 25)	69
5.11	ODSTRANITEV <i>TERC</i> -BUTILNIH ESTROV IN ZAŠČITNE SKUPINE Boc (SINTEZA SPOJIN 24 IN 26)	71
5.12	BIOLOŠKO VREDNOTENJE SPOJIN NA CELIČNI LINIJI RAMOS-BLUE	71
6.	SKLEP	74
7.	LITERATURA	76

I. POVZETEK

Človeški organizem se mora nenehno boriti proti raznim mikroorganizmom ter ostalim nevarnostim, ki izvirajo iz okolja ali pa so posledica napak v organizmu samem. Pri tem igrajo pomembno vlogo znotrajcelični receptorji NOD1 (nukleotid-vezavna domena oligomerizacije 1), ki po posredni detekciji nevarnih dejavnikov aktivirajo predvsem mehanizme prirojene imunosti. Ti receptorji predstavljajo zanimivo tarčo za nova imunomodulatorna zdravila, saj imajo njihovi agonisti potencial za zdravljenje različnih bolezni povezanih z nepravilnostmi v njihovem delovanju, kot protimikrobne učinkovine s posrednim in/ali neposrednim delovanjem, kot adjuvansi v cepivih in kot protitumorne učinkovine. V okviru diplomske naloge smo na osnovi najmanjšega znanega agonista receptorjev NOD1, dipeptida γ -D-Glu-(2*S*,6*R*)-*mezo*-DAP (iE-DAP), načrtovali in sintetizirali dve spojini s potencialnim imunostimulatornim delovanjem. Pri sintezi smo izhajali iz komercialno dostopnih aminokislin D- in L-metionin ter D- in L-alilglicin, ki smo jih pretvorili v ustrezno zaščitene fragmente za reakcijo olefinske metateze, s katero smo sintetizirali dva analoga diaminopimelinske kisline. Tema analogoma smo nato s tvorbo peptidne vezi pripeli analog D-glutaminske kisline, ki je bil alkiliran z dvema lipofilnima verigama in smo ga sintetizirali iz komercialno dostopne D-glutaminske kisline zaščitene s skupino Fmoc in *tert*-butilnim estrom. V zadnji stopnji smo z odščito zaščitnih skupin dobili dve končni spojini, ki smo ju biološko ovrednotili na celični liniji Ramos-Blue™ in ugotovili, da sta selektivna agonista receptorjev NOD1, ki izkazujeta močnejše delovanje kot izhodni dipeptid iE-DAP in nekateri drugi znani agonisti. Sklepamo, da je za povečano aktivnost odgovorna tako uvedba lipofilnih verig, ki omogoča lažje prehajanje čez celične membrane, kot tudi rigidizacija molekul z dvojno vezjo, ki zmanjša število možnih prostorskih konformacij in predvidoma omogoči boljše ujemanje agonistov s tarčnim mestom na receptorju. Novo sintetizirani spojini lahko služita kot osnova za razvoj novih imunomodulatornih učinkovin, zraven tega pa sta še potencialna inhibitorja encimov DAP dekarboksilaza, DAP dehidrogenaza, DAP epimeraza, MurE in MurF.

Ključne besede: NOD1, iE-DAP, olefinska metateza, imunomodulacija.

II. ABSTRACT

The human organism is in a constant battle with various microorganisms and other perils that originate from the environment and also from within the organism itself. An intracellular pattern recognition receptor termed NOD1 (nucleotide-binding oligomerization domain 1) plays an important role in this battle and activates the mechanisms of the innate immune system following the detection of molecular patterns that potentially present danger. This receptor represents an interesting target for novel immunomodulatory drugs since its agonists could potentially be useful for treatment of diseases originating from NOD1 dysfunctions. NOD1 agonistic compounds were also shown to possess direct and/or indirect antimicrobial activity, adjuvant activity in vaccines and anti-tumor activity. We designed and synthesized two compounds based on the smallest known NOD1 agonist, the dipeptide γ -D-Glu-(2*S*,6*R*)-*meso*-DAP (iE-DAP), that possess immunomodulatory activity. Our synthesis started from commercially available amino acids D- and L-methionine and D- and L-allylglycine, that were converted into properly protected fragments for olefin metathesis, which was subsequently performed and afforded two orthogonally protected analogues of diaminopimelic acid. These analogues were then coupled with an *N,N*-dialkylated D-glutamic acid analogue which was prepared from commercially available D-glutamic acid derivative. In the final step, following the removal of protective groups we have obtained two novel and improved derivatives of iE-DAP. A biological evaluation was performed on Ramos-Blue™ cell line and revealed that our compounds act as selective NOD1 agonists and possess greater activity with respect to the original dipeptide iE-DAP and some other known agonists. We presume that the enhanced activity is the result of the introduction of lipophilic moiety that improves transport across cell membranes as well as the result of double bond formation that makes the molecules more rigid, decreases their conformational space and presumably enables a better interaction with the binding site on the receptor. The newly synthesized compounds can serve as the basis for development of novel immunomodulatory drugs whereas they could also act as potential inhibitors of enzymes DAP decarboxylase, DAP dehydrogenase, DAP epimerase, MurE and MurF on account of the structural similarity with the substrates/products of the aforementioned enzymes.

Key words: NOD1, iE-DAP, olefin metathesis, immunomodulation.

III. SEZNAM OKRAJŠAV

AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i> – sindrom pridobljene imunske pomanjkljivosti
ATP	adenozin trifosfat
BIR	<i>baculoviral inhibitory repeat/baculovirus 'inhibitor of apoptosis' repeat</i> – bakulovirusna inhibitorna ponovitev
Boc	<i>tert</i> -butiloksikarbonil
CARD	<i>caspase activation and recruitment domain</i> – domena za aktivacijo in rekrutiranje kaspaz
CARD4	receptor kodiran z genom »domena za aktivacijo in rekrutiranje kaspaz 4« (drugo ime za receptor NOD1)
CD	<i>cluster of differentiation</i> – označevalec pripadnosti
C12-iE-DAP	<i>N</i> -dodekanoil- γ -D-glutamyl- <i>mezo</i> -diaminopimelinska kislina
d	dublet
DAMP	<i>damage associated molecular patterns</i> (tudi <i>danger associated molecular patterns</i>) – molekularni vzorci povezani s poškodbami/z nevarnostjo
DAP	diaminopimelinska kislina
DBU	1,8-diazabiciklo[5.4.0]undec-7-en
DKM	diklorometan
DMSO-d₆	devteriran dimetil sulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DS(anh)-3P(DAP)	<i>N</i> -acetilglukozaminil-(β 1-4)-(anhidro) <i>N</i> -acetilmuramil-L-alanil-D-glutamyl- <i>mezo</i> -diaminopimelinska kislina
dsRNK	<i>double-stranded ribonucleic acid</i> – dvoverižna ribonukleinska kislina
EA	etilacetat
EC₅₀	<i>half maximal effective concentration</i> – efektivna koncentracija, ki izzove 50 % maksimalnega učinka
ESI	<i>electrospray ionization</i> – elektrorazpršilna ionizacija
Fmoc	fluorenilmetiloksikarbonil
Hex	<i>n</i> -heksan
HMGB1	<i>high-mobility group box 1</i> – protein visoko-mobilne skupine B1
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i> – masna spektrometrija visoke ločljivosti

HSP	<i>heat shock protein</i> – protein vročinskega šoka
iE-DAP	γ -D-Glutamil-(2 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)- <i>mezo</i> -diaminopimelinska kislina
IFNα	interferon α
IFNβ	interferon β
IgA	imunoglobulin A
IgE	imunoglobulin E
IgG	imunoglobulin G
IKK	I κ B kinaza
IL	interlevkin
IR	infrardeča spektroskopija
IκB	inhibitor NF- κ B
J	sklopitvena konstanta
LGP2	<i>laboratory of genetics and physiology 2</i> – receptor »laboratorij genetike in fiziologije 2«
LRR	<i>leucine-rich repeat</i> – z levcinom bogate ponovitve
m	multiplet
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> – z mitogeni aktivirana protein kinaza
MDA5	<i>melanoma differentiation-associated antigen 5</i> – z diferenciacijo melanoma povezan antigen 5
Mf	mobilna faza
MHC I	<i>major histocompatibility complex class I</i> – poglobitni histokompatibilnostni kompleks razreda I (tudi PHK I)
MHC II	<i>major histocompatibility complex class II</i> – poglobitni histokompatibilnostni kompleks razreda II (tudi PHK II)
M_r	relativna molekulska masa
MS	masna spektrometrija
MurE	UDP- <i>N</i> -acetilmuramil-L-Ala- γ -D-Glu:L-Lys ligaza
MurF	UDP- <i>N</i> -acetilmuramil-L-Ala- γ -D-Glu- <i>mezo</i> -DAP:D-Ala-D-Ala ligaza
NACHT	domena skupna receptorjem <u>NAIP</u> , <u>CIITA</u> , <u>HET-E</u> in <u>TP1</u>
NEMO	<i>NF-κB essential modulator</i> – esencialen modulator NF- κ B
NF-κB	<i>nuclear factor κB</i> – nuklearni faktor κ B
NLR	<i>NOD-like receptor</i> – NOD-u podoben receptor
NMM	<i>N</i> -metilmorfolin
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> – jedrska magnetna resonanca

NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i> – nukleotid-vezavna domena oligomerizacije
PAMP	<i>pathogen associated molecular patterns</i> – molekularni vzorci povezani s patogeni
PRM	<i>pattern recognition molecule</i> – molekula za prepoznavo vzorcev
PRR	<i>pattern recognition receptor</i> – receptor za prepoznavo vzorcev
PYD	<i>pyrin domain</i> – pirinska domena
R_f	retencijski faktor
RICK	(tudi RIP2, CARDIAK ali RIPK2) <i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2</i> – z receptorjem interagirajoča serin/treonin-protein kinaza 2
RIG-I	<i>retinoic acid-inducible gene I</i> – z retinojsko kislino inducibilen gen I
RLR	<i>RIG-I-like receptor</i> – receptor podoben RIG-I
RNK	ribonukleinska kislina
s	singlet
SEAP	<i>secreted embryonic alkaline phosphatase</i> – »izločena zarodna alkalna fosfataza«
ssRNK	<i>single-stranded ribonucleic acid</i> – enoverižna ribonukleinska kislina
t	triplet
TBTU	<i>O</i> -(benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronijev tetrafluoroborat
Tc	<i>cytotoxic T cell</i> – citotoksična celica T
TFA	2,2,2-trifluoroocetna kislina
tGPI-mucin	<i>Trypanosoma-derived glycosylphosphatidylinositol-mucin</i> – Tripanosomski glikozilfosfatidilinozitolni mucin
Th	<i>helper T cell</i> – celica T pomagalka
THF	tetrahidrofuran
TIR	<i>Toll-interleukin (IL)-1 receptor</i> – receptor Toll-interlevkin (IL)-1
TLC	<i>thin layer chromatography</i> – tankoplastna kromatografija
TLR	<i>Toll-like receptor</i> – Toll-u podoben receptor
TNFα	faktor tumorske nekroze α
t_R	retencijski čas
Tri-DAP	L-Alanil- γ -D-glutamil- <i>mezo</i> -diaminopimelinska kislina
δ	kemijski premik
λ	valovna dolžina

1. UVOD

1.1 IMUNSKI SISTEM

Človeški organizem je izpostavljen številnim nevarnostim iz okolja, saj mu nenehno pretijo razne bakterije, glive, virusi in paraziti, prav tako pa v telo vdirajo tudi neživi delci ter toksini. Od znotraj ga ogrožajo tudi napake lastnih celic, ki lahko privedejo do nastanka rakavih bolezni, zato se je z evolucijo razvil kompleksen obrambni mehanizem, ki kljubuje tem škodljivim dejavnikom. To je imunski sistem, ki se aktivira kadar telo zazna tuje snovi oziroma antigene in s tem sproži imunski odziv, ki v nadaljevanju preide iz faze spoznavanja antigena v efektorsko fazo, ki je naravnana tako, da antigen odstrani iz telesa. Ko antigen ni več prisoten, imunski odziv usahne (1).

1.1.1 Prirojeni imunski sistem

Imunski sistem zajema veliko mehanizmov, ki skrbijo za obrambo telesa. Prvo linijo obrambe pred vdorom tujkov v človeški organizem predstavljajo mehanske in biokemijske ovire. Govorimo predvsem o koži in sluznicah, ki so prekrte z izločki različnih žlez, ki vsebujejo razne nespecifične baktericidne in virucidne snovi. V primeru, da tujek uspe vdreti v človeški organizem, ga tam pričaka še vrsta drugih obrambnih mehanizmov:

- fagocitoza (vršijo jo monociti, nevtrofilci in makrofagi),
- endocitoza (vršijo jo vse telesne celice),
- liza celic (preko komplementnega sistema ali naravnih celic ubijalk),
- opsonizacija (npr. preko komplementnega sistema),
- kemotaksa imunoaktivnih celic (npr. preko komplementnega sistema),
- protivirusni mehanizmi posredovani preko interferonov,
- vnetje.

Vse te našteje mehanizme prištevamo k naravni ali prirojeni imunosti (1).

1.1.2 Pridobljeni imunski sistem

Velikokrat prirojena imunost ni dovolj učinkovita pri posredovanju imunskega odziva, zato se je pri vretenčarjih razvila še pridobljena ali specifična imunost. Ta sistem zapletenih obrambnih mehanizmov se aktivira nekoliko kasneje kot sistem prirojene imunosti, saj deluje tako, da okrepi mehanizme prirojene imunosti in jih usmerja. Je močno specifičen in napada le tuje antigene, do lastnih pa razvija toleranco. Pridobljeni imunski sistem ima tudi

spominsko funkcijo in tekom odziva nekatere celice pretvori v spominske celice, s čimer zagotovi hitrejši ter bolj učinkoviti obrambni mehanizem ob ponovnem stiku z istim antigenom. Glavni nosilci specifične imunosti so limfociti T in B. Limfociti B se ob aktivaciji diferencirajo v spominske celice B in v efektorske celice B, oziroma plazmatke. Plazmatke začnejo izločati veliko količino protiteles specifičnih za antigen, ki jih je aktiviral. Protitelesa in ostali dejavniki v telesnih tekočinah, ki prispevajo k odstranjevanju antigena, posredujejo humoralno imunost, limfociti T, ki jih v grobem delimo na celice T pomagalke (Th) in citotoksične celice T (Tc), pa posredujejo celično imunost. Prve izločajo citokine, ki aktivirajo limfocite B, limfocite Tc, makrofage in ostale celice imunskega odziva, medtem ko druge ubijajo spremenjene lastne celice kot so rakave celice in celice okužene z virusi ali drugimi znotrajceličnimi mikroorganizmi. Limfocite Th nadalje delimo na limfocite Th1, ki imajo podoben profil izločanja citokinov kot limfociti Tc in spodbujajo vnetje ter mehanizme celične imunosti in na limfocite Th2, ki spodbujajo limfocite B k izločanju protiteles. Limfociti T se prav tako diferencirajo še v spominske celice (1).

1.1.3 Medcelična komunikacija in detekcija telesu tujih snovi

Za učinkovito zaščito telesa mora imunski sistem tuje antigene spoznati kot imunogene, ključ do uspešnega imunskega odziva pa je tudi v ustrezni komunikaciji med njegovimi komponentami.

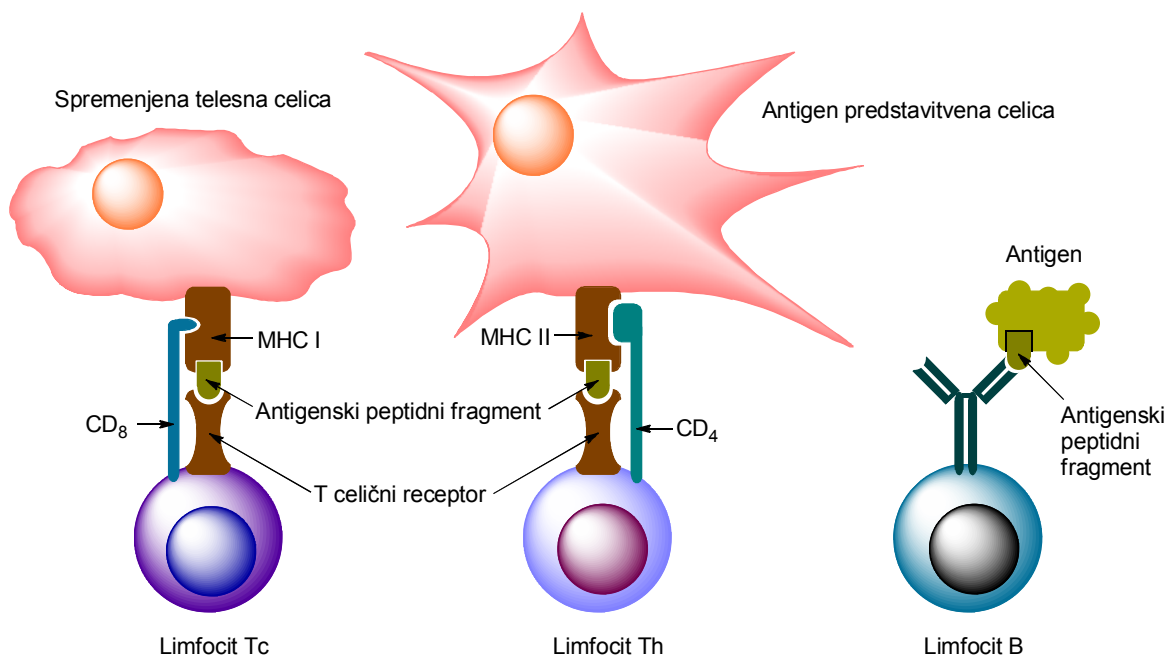
Celice udeležene v imunskem odzivu med seboj komunicirajo z direktnim stikom (na primer predstavitev antigena limfocitom Th z antigen predstavitvenimi celicami) ali pa posredno preko citokinov. Citokini so glikoproteini z majhno molekularno maso (manj kot 30 kD), ki skrbijo za medcelično signalizacijo in so udeleženi pri uravnavanju skoraj vseh bioloških procesov. Delujejo avtokrino ali parakrino, v nekaterih primerih tudi endokrino. Na membrani tarčne celice se vežejo s specifičnimi receptorji in s tem sprožijo signale, ki povzročijo spremenjeno izražanje genov. Pri imunskem odzivu so poglobitni vir citokinov aktivirani makrofagi in aktivirani limfociti Th (1). Glavne funkcije nekaterih citokinov so predstavljene v preglednici I.

Preglednica I: Delovanje nekaterih citokinov (2).

Citokin	Izvorne celice	Glavne tarčne celice	Glavni učinki
IL-1 α IL-1 β	makrofagi, veliki granularni limfociti, limfociti B, endotelijske celice, fibroblasti, astrociti	limfociti T, limfociti B, makrofagi, endotelijske celice, tkivne celice	aktivacija limfocitov, stimulacija makrofagov, povečana adhezija levkocitov na endotelij, pireksija, indukcija proteinov akutne faze
IL-4	limfociti T	limfociti T, limfociti B	proliferacija limfocitov B, selekcija izotipov protiteles, izločanje IgE in IgG1
IL-5	limfociti T	limfociti B	rast in diferenciacija limfocitov B, izločanje IgA
IL-6	limfociti T, limfociti B, fibroblasti, makrofagi	limfociti B, hepatociti	diferenciacija limfocitov B, indukcija proteinov akutne faze
IL-8	monociti, fibroblasti	nevtrofilci, bazofilci, limfociti T, keratinociti	kemotaksa, angiogeneza, izločanje superoksida, sproščanje vsebine iz granul celic imunskega sistema
IL-12	monociti	limfociti T	indukcija limfocitov Th1
IL-17	CD4 ⁺ limfociti T	epitelijske celice, fibroblasti, endotelijske celice	sproščanje IL-6, IL-8, granulocitne kolonije spodbujajočega faktorja, prostaglandina E2, izboljšana adhezija preko intracelularne adhezijske molekule 1, stimulacija fibroblastov k vzdrževanju CD34 ⁺ izvornih celic
IL-22	aktivirani limfociti T	limfociti Th2	inhibicija produkcije IL-4
TNF α	makrofagi, tkivni bazofilci, limfociti	makrofagi, granulociti, tkivne celice	aktivacija makrofagov, granulocitov in citotoksičnih celic, adhezija levkocitov na endotelij, kaheksija, pireksija, indukcija proteinov akutne faze, stimulacija angiogeneze, povečano izražanje MHC I
IFN β	fibroblasti, epithelijske celice	tkivne celice, levkociti	povečano izražanje MHC I, aktivacija protivirusnega stanja okuženih celic, antiproliferativni učinek

Imunski sistem za detekcijo telesu tujih snovi uporablja različne mehanizme. V sklopu pridobljenega imunskega sistema pride do zaznave antigenov z membranskimi receptorji na limfocitih T in B. Limfociti Th na membrani ob T-celičnih receptorjih izražajo še glikoproteine CD4, antigen pa zaznajo le, če jim ga predstavijo antigen predstavitvene celice (limfociti B, makrofagi in dendritične celice) vezanega na poglobitni histokompatibilnostni kompleks razreda II (MHC II). Limfociti Tc izražajo glikoproteine CD8 in zaznajo antigen vezan na poglobitni histokompatibilnostni kompleks razreda I (MHC I), ki ga izražajo skoraj vse celice z jedri. Limfociti T torej antigena ne zaznavajo

direktno, temveč s pomočjo drugih celic. Pri limfocitih B so receptorji za antigene na membrano vezani imunoglobulini (protitelesa), ki vršijo detekcijo z direktno vezavo antigena. K zaznavi antigenov pri pridobljenem imunskem odzivu prištevamo tudi njihovo vezavo na protitelesa, ki jih izločajo plazmatke (slika 1) (1).



Slika 1: Detekcija pri pridobljenem imunskem sistemu (prirejeno po (1)).

Pridobljeni imunski sistem zajema širok nabor med seboj različnih in izredno specifičnih receptorjev, ki jih pridobi z naključnim preurejanjem genskih segmentov, ki kodirajo T-celične receptorje in molekule protiteles. Vsaka celica izraža na površini le receptorje enega tipa. Tiste celice, ki po naključju izražajo receptorje za telesu lastne antigene, organizem v fazi njihovega zorenja odstrani in s tem prepreči avtoimunski odziv (1).

Tudi prirojeni imunski sistem ima zmožnost zaznave telesu tujih snovi. Čeprav ni specifičen, vsebuje sofisticirane receptorje, ki razlikujejo med lastnim in tujim in jih imenujemo receptorji za prepoznavo vzorcev (angl. »pattern recognition receptors« – PRR) (2–5). Prisotni so na membrani in v citosolu različnih celic imunskega sistema ter tudi pri ostalih telesnih celicah, na primer pri epiteljskih celicah. Nekateri avtorji jih označujejo tudi kot molekule za prepoznavo vzorcev (angl. »pattern recognition molecules« – PRM), mednje pa štejejo še razne molekule prisotne v plazmi ter ostalih telesnih tekočinah, kot so na primer nekatere komponente komplementnega sistema, ki lahko aktivirajo komplement bodisi po lektinski, bodisi po alternativni poti (2,5,6).

V človeškem telesu med pomembne PRR spadajo Toll-u podobni receptorji, NOD-u podobni receptorji, receptorji podobni RIG-I, manozni receptorji, receptor CD14, odstranjevalni receptorji (angl. »scavenger receptors«) in formil peptidni receptorji. V telesnih tekočinah lahko najdemo še PRM kot so C-reaktivni protein, manozo-vezoči protein, lipopolisaharid-vezoči protein in surfaktantni protein A (2–8).

1.2 RECEPTORJI ZA PREPOZNAVO VZORCEV (PRR)

Receptorji PRR predstavljajo pomemben del prirojenega imunskega sistema. Z njimi organizem zaznava kemijske strukture, ki so se tekom evolucije ohranile pri širokem spektru različnih mikroorganizmov. Te strukture imenujemo molekulski vzorci povezani s patogeni (PAMP), katerih prisotnost nakazuje na nevarnost okužbe. Preko teh molekulskih vzorcev telo posredno zaznava mikroorganizme in usmerja mehanizme prirojene imunosti na mesto infekcije (2–5). Ker so PAMP motivi, ki se pojavljajo le pri mikroorganizmih, imunski sistem ne sproži odziva proti telesu lastnim snovem in celicam (2,4,5). Hkrati se mikroorganizmi težko izognejo detekciji z mutacijo PAMP, saj so to komponente, ki so nujno potrebne za njihovo rast in preživetje, a nekaterim patogenom to vendarle uspeva (2,4). Med PAMP med drugim sodijo lipopolisaharidi, strukturni deli peptidoglikana, bakterijski lipoproteini, flagelin in virusne ter bakterijske nukleinske kisline (4).

Vezava teh struktur na receptorje PRR sproži aktivacijo signalnih poti kot so pot nuklearnega faktorja κB (NF- κB), pot z mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK) in pot interferona tipa I, kar privede do sproščanja vnetnih citokinov in kemokinov, končni rezultat pa je nastanek vnetja in aktivacija protiinfekcijskih mehanizmov (3). Na mesto zaznave s kemotakso pripotujejo nevtrofilci in makrofagi, ki vršijo fagocitozo in tudi izločajo citokine. Sproščajo se tudi prostanoidi in razni protimikrobni peptidi, borbi proti patogenom pa se pridružijo še ostali levkociti, kot so na primer naravne celice ubijalke (2,3,9). Vsi naštetih mehanizmi odstranijo veliko tujkov, a niso zmeraj dovolj učinkoviti za uspešno obrambo organizma. Zato PRR preko citokinov tudi aktivirajo in usmerjajo limfocite, kar vodi do vključitve pridobljenega imunskega sistema. Ker je za aktivacijo in nastanek zadostnega števila antigen-specifičnih limfocitov potrebnih več dni, v tem času za omejitev razmnoževanja patogenov skrbi prirojeni imunski sistem, saj bi le-ti drugače preplavili tudi nove mehanizme obrambe (2,3,9).

PRR zraven potencialno nevarnih živih organizmov zaznavajo še druge oblike nevarnosti, saj so sposobni prepoznati telesu nevarne eksogene snovi kot sta silicijev dioksid in azbest,

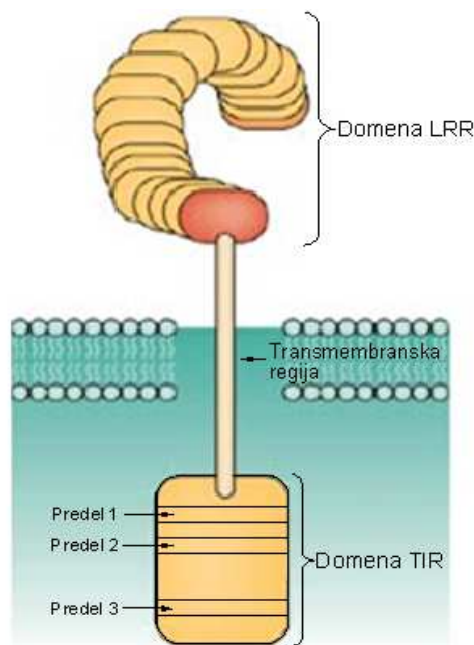
prav tako pa zaznavajo tudi endogene molekule, ki se sprostito ob nekrozi celic in tkiva. Takšne molekule so na primer adenozin trifosfat (ATP), protein visoko-mobilne skupine B1 (angl. »high-mobility group box 1« – HMGB1), proteini vročinskega šoka (angl. »heat shock proteins« – HSP) ter sečna kislina in se nahajajo v znotrajceličnem matriksu. Encimi, ki so udeleženi v obnovi tkiva ali se sprostito iz nekrotičnih celic, pa s proteolizo iz zunajceličnega matriksa sprostito fragmente kot so hialuronska kislina, heparan sulfat in biglikan, ki prav tako aktivirajo PRR. Vse te molekule, ki ne izvirajo iz živih organizmov in telo opozarjajo na nevarnost ali pa mu jo predstavljajo, s skupnim imenom imenujemo molekulski vzorci povezani s poškodbami ali DAMP. Vezava le-teh na PRR ima za posledico zelo podoben odziv kot vezava PAMP, saj se sproži proizvodnja vnetnih citokinov in kemokinov, na mesto zaznave pripotujejo nevtrofilci in makrofagi, preko indukcije limfocitov T pa se aktivira tudi pridobljeni imunski odziv. Ti mehanizmi, ki jih povzroči vezava DAMP na PRR, v končni fazi poskrbijo, da se telesu nevarne snovi odstranijo in da se začne obnova tkiv ter celjenje ran (3).

Poznamo torej več različnih PRR, ki zaznavajo strukturno zelo različne molekule živega in neživega izvora. Njihove signalne poti so zelo povezane, zato daje vezava različnih ligandov podobne odzive. Prav tako lahko različni ligandi aktivirajo iste PRR in enaki ligandi različne PRR. PRR torej niso specifični za točno določene mikroorganizme ali tuje delce, so pa zmožni diskriminacije med lastnimi in tujimi snovmi. Izraženi so konstitutivno in nimajo spominske funkcije, zato zmeraj reagirajo z enako intenziteto (3,4,9,10). Med tri večje skupine PRR, ki jih najdemo v telesnih celicah in na njihovi površini štejemo Toll-u podobne receptorje, receptorje podobne RIG-I in NOD-u podobne receptorje (6,11).

1.2.1 Toll-u podobni receptorji

Toll-u podobni receptorji (angl. »Toll-like receptors« – TLR) so transmembranski glikoproteini tipa I, ki enkrat prebadajo membrano in imajo C-terminalni konec obrnjen v citosol (6). Sestavljeni so iz ektodomene, ki jo tvorijo z levcinom bogate ponovitve (angl. »leucine-rich repeat« – LRR), iz transmembranske regije, in iz citosolne domene Toll-IL-1R (TIR) (slika 2) (10). TLR so precej veliki receptorji in v dolžino merijo 780–1100 Å. Njihova domena LRR, ki je odgovorna za samo zaznavo, zajema približno 80 % receptorja in tvori tuljavo v obliki podkve (4,6,12). Zgrajena je iz niza 19–25 motivov LRR, od katerih vsak vsebuje 24–29 aminokislinskih ostankov. V zaporedju aminokislinskih ostankov se pojavljajo sekvence XLXXLXLXX in

XØXXØXXXXFXXLX (L – levcinski ostanek, F – fenilalaninski ostanek, X – ostanek katerekoli aminokislina, Ø – ostanek hidrofobne aminokislina). Zaporedje aminokislin pri vsakem motivu LRR tvori β -trak in α -vijačnico, ki sta med seboj povezana z zanko (4,13). PAMP in DAMP se vežejo na konveksno stran domene LRR in sicer na mesto, ki ni maskirano z ogljikovimi hidrati (14). To povzroči homo- ali heterodimerizacijo



Slika 2: Shema Toll-u podobnega receptorja (prirejeno po (13,15)).

receptorjev, kar ima za posledico združitve domen TIR in spremembo njihovih konformacij. S tem se sproži kaskada signalov, ki v končni fazi pretežno preko faktorja NF- κ B privede do sproščanja vnetnih citokinov, kemokinov, interferonov in protimikrobnih peptidov (6,10,12,13). Citosolna domena TIR zajema približno 200 aminokislinskih ostankov in je v veliki meri homologna z receptorji za interleukin 1. Za posredovanje signalov so pomembna tri konservativna področja, ki jih enostavno imenujemo predel 1, predel 2 in predel 3 (13).

Do sedaj je bilo odkritih 10 podtipov človeških receptorjev TLR. Vsi so izraženi na fagocitirajočih celicah, nekateri pa tudi na dendritičnih celicah, limfocitih B, nekaterih limfocitih T, mastocitih, fibroblastih in na epiteljskih celicah. Večina tkiv v telesu ima izražen vsaj en tip receptorjev TLR (2,4). Receptorji TLR 1, 2, 4, 5 in 6 se nahajajo na zunajcelični membrani, medtem ko receptorje TLR 3, 7, 8 in 9 najdemo v notranjosti celic. Prvi so odgovorni za zunajcelično detekcijo in zaznavajo predvsem komponente membran mikroorganizmov, medtem ko drugi vršijo znotrajcelično detekcijo z zaznavo nukleinskih kislin virusov ter drugih znotrajceličnih napadalcev. Nahajajo se v znotrajceličnih veziklih, ki zajemajo endoplazmatski retikulum, endosome, lizosome in endolizosome (10). Receptorji TLR so pomemben člen prirojenega imunskega sistema, saj zaznavajo PAMP bakterij, virusov, gliv in parazitov. Z njihovo disfunkcijo ali z nepravilnim delovanjem njihovih signalnih poti je organizem bolj podvržen infekciji z nekaterimi mikroorganizmi (6,10). Nekateri ligandi, ki jih zaznavajo človeški receptorji TLR so predstavljeni v preglednici II.

Preglednica II: Seznam človeških receptorjev TLR in njihovih ligandov (2,4,10).

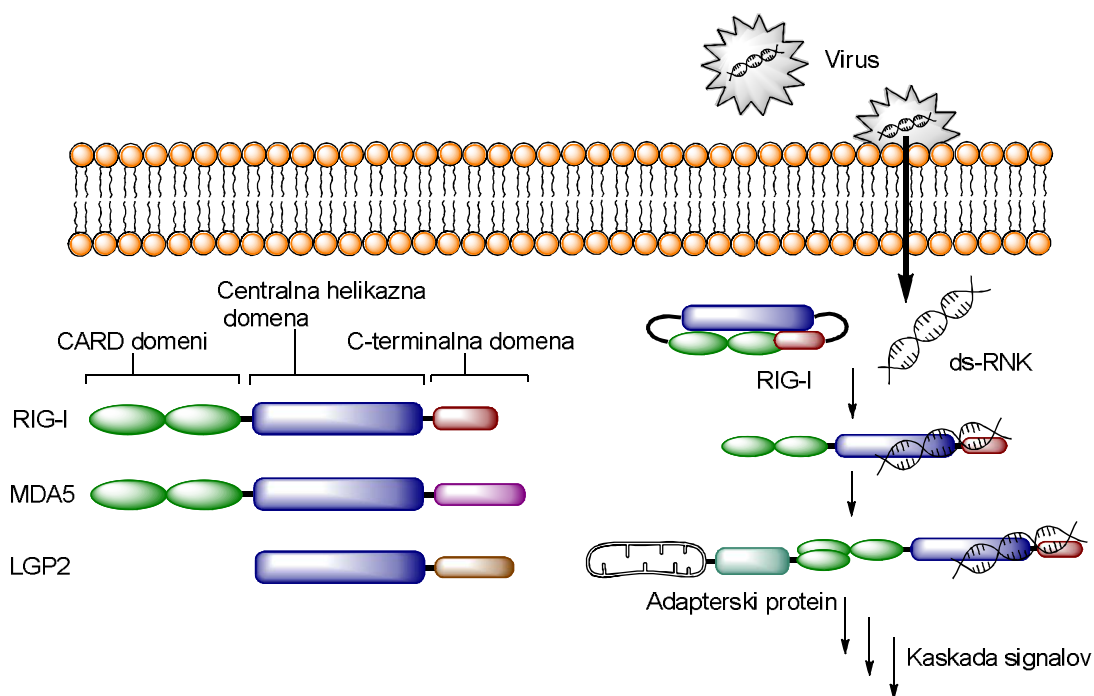
Toll-u podoben receptor	PAMP/DAMP	Izvor PAMP/DAMP
TLR1	lipopeptidi	Gram-negativne bakterije, mikobakterije
TLR2	lipoteihoična kislina peptidoglikan lipoarabinomanan porini hemaglutinin proteini virusne ovojnice cimosan fosfolipomanan β-glukan manan glukuronoksilomanan tGPI-mucin	Gram-pozitivne bakterije mikobakterije Neisseria virusi glive paraziti (Tripanosoma)
TLR3	dsRNK	virusi
TLR4	lipopolisaharidi proteini virusne ovojnice manan glukuronoksilomanan glikoinozitolfosfolipidi fibrinogen HSP	Gram-negativne bakterije virusi glive paraziti (Tripanosoma) človeški organizem (telesu lastne snovi)
TLR5	flagelin	bakterije
TLR6	diacil lipopetidi lipoteihoična kislina cimosan β-glukan	mikobakterije Gram-pozitivne bakterije glive
TLR7	RNK	bakterije, virusi, glive
TLR8	ssRNK	virusi
TLR9	DNK hemozoin	bakterije, virusi, glive, paraziti paraziti (Plazmodij)
TLR10	neznani	neznani

1.2.2 Receptorji podobni RIG-I

Receptorji podobni RIG-I (angl. »RIG-I-like receptors« – RLR) so znotrajcelični receptorji, ki zaznavajo ribonukleinske kisline virusov in zajemajo receptorje RIG-I, MDA5 ter LGP2 (16–18). Vsi so RNK helikaze in so prisotni v citosolu večine telesnih celic (16). RIG-I in MDA5 sta sestavljena iz dveh N-terminalnih domen za aktivacijo in nabor kaspaz (angl. »caspase activation and recruitment domain – CARD), centralne helikazne domene ter iz C-terminalne domene (slika 3) (17). C-terminalna domena receptorja RIG-I vsebuje represijsko domeno, ki inhibira njegovo aktivacijo v odsotnosti virusov (16).

Za prepoznavo telesu tujih molekul RNK skrbi C-terminalna domena, medtem ko je za vezavo z dovolj visoko afiniteto pomembna helikazna domena. Po detekciji PAMP poteka signalizacija preko domen CARD (17). V primeru receptorjev RIG-I so predpostavili naslednji model zaznave virusne RNK. Domeni CARD sta v času mirovanja maskirani z intramolekularno vezavo represijske domene. Po prepoznavi preko C-terminalne domene se virusna RNK veže na helikazno domeno in v pozitivno nabito režo C-terminalne domene, ki zajema tudi del represijske regije. Posledica je sprememba konformacije receptorja in razkritje domen CARD, za kar je potrebna še energija iz ATP. V tej fazi je možna tudi tvorba homodimerov receptorjev. Preko CARD se nato sproži kaskada reakcij, ki povzroči izražanje interferonov tipa I ($IFN\alpha$, $IFN\beta$) in ostalih citokinov, te molekule pa aktivirajo mehanizme, ki uničijo in odstranijo viruse (slika 3) (16,19).

Receptorji RIG-I zaznavajo ssRNK s trifosfatno skupino na 5' koncu in kratke verige dsRNK. Od molekul dsRNK signal sprožijo le tiste s topimi konci ali s 5' štrlečimi lepljivimi konci (16). Odsotnost RIG-I povzroči oslavljen odziv na viruse influence A, bolezni Newcastle, Sendai, vezikularnega stomatitisa in japonskega encefalitisa (20). Z receptorji MDA5 celice zaznavajo relativno dolge molekule dsRNK (16). V primeru odsotnosti MDA5 se celice slabše odzovejo na virus encefalomiokarditisa, mengovirus in na Theiler-jev virus (21).



Slika 3: Shema receptorjev RLR in predstavitev domnevnega mehanizma delovanja receptorja RIG-I (prirejeno po (16,17)).

LGP2 ima enako zgradbo kot receptorja RIG-I in MDA5, le da ne vsebuje nobene za signalizacijo pomembne domene CARD, njegova C-terminalna domena pa tako kot pri RIG-I vsebuje represijsko regijo (slika 3) (17). *In vitro* testi so pokazali, da je lahko LGP2 negativni regulator odzivov RIG-I in MDA5, novejšje *in vivo* raziskave pa so dokazale, da v primeru nekaterih virusnih obolenj LGP2 pozitivno modulira odziv RIG-I in MDA5 (22–25).

1.2.2 NOD-u podobni receptorji

NOD-u podobni receptorji (angl. »NOD-like receptors – NLR) zajemajo veliko družino znotrajceličnih PRR, ki zaznavajo predvsem bakterijske in virusne PAMP ter različne DAMP. Znanih je 22 človeških receptorjev NLR, ki jih na podlagi N-terminalne signalizacijske domene razdelimo v poddružine NLRA, NLRB, NLRP ter NLRC/X. Njihova signalizacijska domena lahko vsebuje CARD, BIR (bakulovirusno inhibitorno ponovitev) ali PYD (pirinsko domeno). Vsem NLR je skupna centralna domena NACHT (imenuje se tudi NOD) in vsi razen receptorja NLRP10 imajo na C-terminalnem koncu izraženo domeno LRR (preglednica III) (26,27).

Preglednica III: Receptorji NLR (26).

Podružina NLR	NLR	Shema NLR
NLRA	CIITA	
NLRB	NAIP	
NLRP	NLRP1	
	NLRP2 – NLRP9	
	NLRP11 – NLRP14	
	NLRP10	
NLRC/X	NLRC3	
	NLRC5	
	NLRX1	
	NLRC4	
	NOD1	
	NOD2	

Receptorji NLR se nahajajo v citosolu in zaznavajo telesu tuje ter nevarne molekule preko domene LRR, ki ima veliko homologijo z domeno LRR Toll-u podobnih receptorjev. Podobno kot pri receptorjih TLR in RLR, tudi v tem primeru vezava ligandov povzroči konformacijske spremembe, čemur sledita od ATP odvisna oligomerizacija receptorjev preko domene NACHT in vezava adapterskih proteinov na signalizacijsko domeno. Preko adapterskih molekul se nato s kaskado reakcij sprožijo poti kot so pot NF- κ B, pot inflamazoma iz kaspaze 1 in pot MAPK, s katerimi se aktivirajo mehanizmi prirojenega imunskega odziva (9,28–30). Nekateri ligandi, ki jih zaznavajo receptorji NLR, so podani v preglednici IV.

Preglednica IV: Nekateri PAMP in DAMP, ki jih zaznavajo receptorji NLR (26).

NLR	PAMP/DAMP
NLRC4	flagel
NAIP	flagel
NLRP1	toksin antraksa muramil dipeptid
NLRP3	nigericin maitotoksin muramil dipeptid virusna dsRNK bakterijska RNK ATP azbest silicijev dioksid aluminijeve soli sečna kislina
NOD1	deli peptidoglikana, ki vsebujejo diaminopimelinsko kislino (DAP)
NOD2	muramil dipeptid

Tako kot TLR in RLR, so tudi NOD-u podobni receptorji pomemben člen prirojenega imunskega sistema, saj je z njihovo mutacijo, polimorfizmom in spremenjenim izražanjem povezanih veliko bolezni, od katerih jih večina sodi med kronične vnetne bolezni in so navedene v preglednici V (26,28).

Preglednica V: Nekatere bolezni, povezane z receptorji NLR (26).

NLR	Bolezen povezana z NLR
CIITA	sindrom golih limfocitov multipla skleroza sistemski lupus eritematosus Addisonova bolezen
NLRC4	atopični dermatitis
NLRP1	vitiligo
NLRP3	Muckle-Wells-ov sindrom družinska urtikarija zaradi mraza infantilni kronični vnetni nevrološki, kožni in sklepni sindrom Crohnova bolezen
NLRP5	hipoparatiroidizem pri pacientih z avtoimunim poliendokrinim sindromom tipa 1
NLRP12	sindrom dednih periodičnih vročic
NOD1	astma atopični dermatitis kronična vnetna črevesna bolezen
NOD2	Crohnova bolezen Blau sindrom sarkoidoza z zgodnjim začetkom

1.3 RECEPTORJI NOD1

Receptor NOD1, član NLRC/X poddružine NOD-u podobnih receptorjev, je eden izmed prvih okarakteriziranih receptorjev NLR (31–33). Velikost tega receptorja je ocenjena na 108 kDa, njegovo 965 aminokislinskih dolgo zaporedje pa kodira gen »domena za aktivacijo in rekrutiranje kaspaz 4«, zato ga imenujemo tudi CARD4 (9,27,34,35). Kot ostali NLR je tudi NOD1 sestavljen iz centralne NACHT oziroma NOD domene in C-terminalne LRR domene, medtem ko ima na N-terminalnem koncu eno signalizacijsko domeno CARD (26,27). Z domeno LRR, sestavljeno iz desetih motivov LRR, zaznava bakterijske peptidoglikanske strukture, ki vsebujejo diaminopimelinsko kislino (DAP) (26,35,36).

Receptorji NOD1 se nahajajo v velikem številu različnih telesnih celic, izmed katerih so najbolj izraženi v tistih, ki prihajajo v stik s peptidoglikani vsebujočimi mikroorganizmi. Med tovrstni tip celic sodijo antigen predstavitvene celice (makrofagi in dendritične celice)

ter epiteljske celice, pri čemer je NOD1 zlasti pomemben v slednjih, saj so epiteljske celice prebavnega trakta in dihalnih poti ves čas izpostavljene flori različnih mikroorganizmov (27,37–39). Na luminalni površini teh celic receptorji TLR praktično niso prisotni, saj bi le-ti ves čas prožili signale in s tem povzročali nepotreben imunski odziv ter kronično vnetje. V tem primeru so receptorji NOD1 prvi in glavni detekcijski mehanizem prirojenega imunskega sistema in reagirajo le na agresivne patogene mikroorganizme, ki jim uspe vdreti v celico ali vanjo izločiti njihove snovi, medtem ko se na nepatogene in komenzalne mikroorganizme ne odzovejo (2,27,40,41).

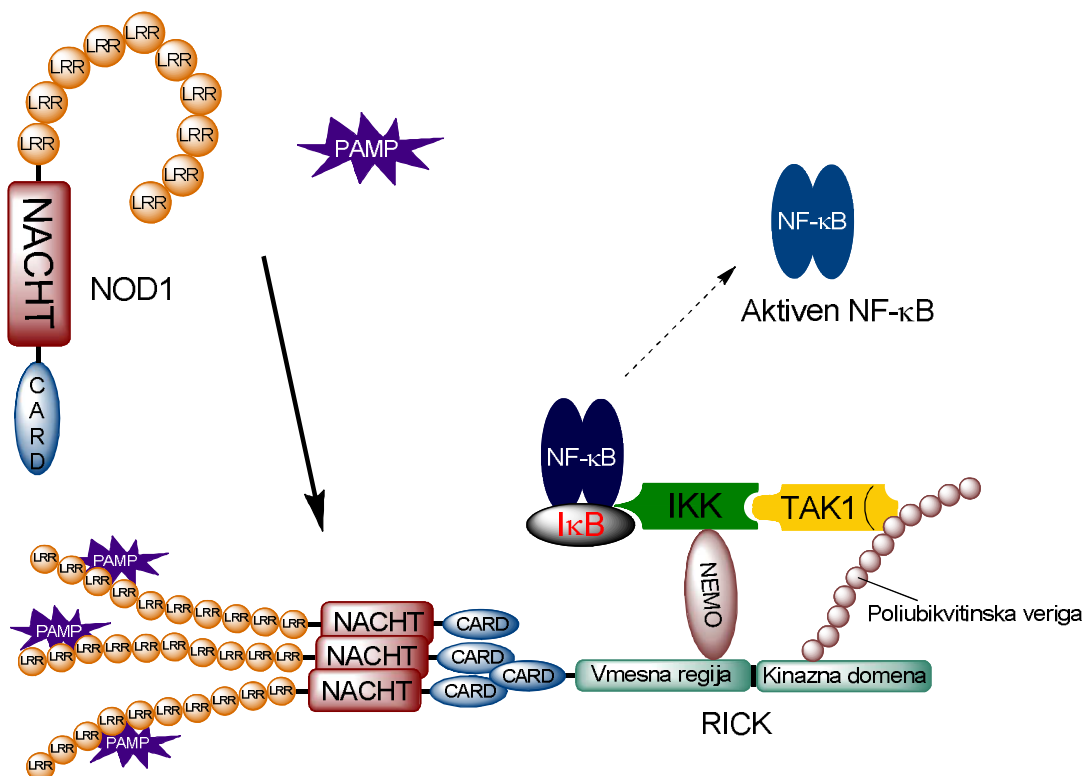
1.3.1 Mehanizem delovanja receptorjev NOD1

NOD1 so znotrajcelični receptorji, ki se nahajajo v citosolu, zato morajo njihovi ligandi najprej preiti plazmalemo, kar se lahko zgodi na več načinov:

- Bakterijsko posredovano prehajanje celične membrane;
 - injiciranje delov peptidoglikana v citosol s sekrecijskimi sistemi,
 - prehajanje celične membrane z vezikli iz zunanje membrane bakterij,
 - invazivne bakterije (*Shigella*, *Listeria*) same prinesejo potencialne ligande s seboj v citosol.
- Prehajanje celične membrane z mehanizmi telesu lastnih celic;
 - od pH odvisna endocitoza, ki ji sledi prehajanje ligandov v citosol preko transporterjev SLC15A4,
 - transport krajših DAP vsebujočih di- in tripeptidov v citosol s peptidnim transporterjem 1 ali 2.
- Samostojno prehajanje celične membrane s pasivno difuzijo.
- Drugi, še neznani mehanizmi (28,42–46).

Ko ligandi prispejo v citosol, se vežejo na domeno LRR receptorjev NOD1, kar povzroči spremembo njihove konformacije in omogoči od ATP odvisno oligomerizacijo NOD1 preko domene NACHT (29,31,35,43). Nato se na N-terminalni konec NOD1 preko CARD-CARD interakcij veže adapterski protein RICK (tudi RIP2, CARDIAK ali RIPK2). Na kinazni domeni RICK-a poteče poliubikvitinacija in na verigo ubikvitina se veže kompleks s kinazo TAK1. Na vmesno regijo proteina RICK se preko proteina NEMO (tj. esencialnega modulatorja NF- κ B) veže še kompleks I κ B kinaze (IKK – kinaza inhibitorja NF- κ B), in tako RICK v bistvu deluje kot premostitveni protein, ki privede kinazo TAK1 v neposredno bližino IKK. TAK1 nato fosforilira IKK in jo aktivira,

aktivirana IKK pa fosforilira inhibitor nuklearnega faktorja κ B, kar povzroči aktivacijo NF- κ B (slika 4) (47).



Slika 4: Shema mehanizma delovanja receptorjev NOD1 (prirejeno po (31,47)).

Receptorji NOD1 posredujejo svoje učinke v glavnem preko NF- κ B. Aktivirajo pa tudi MAPK c-JUN N-terminalno kinazo in spodbujajo apoptozo preko kaspaze-1. Te dodatne mehanizme bi lahko receptorji NOD1 aktivirali preko protein kinazne aktivnosti na kinazni domeni proteina RICK, ki ni udeležena pri aktivaciji NF- κ B (27,28,47,48).

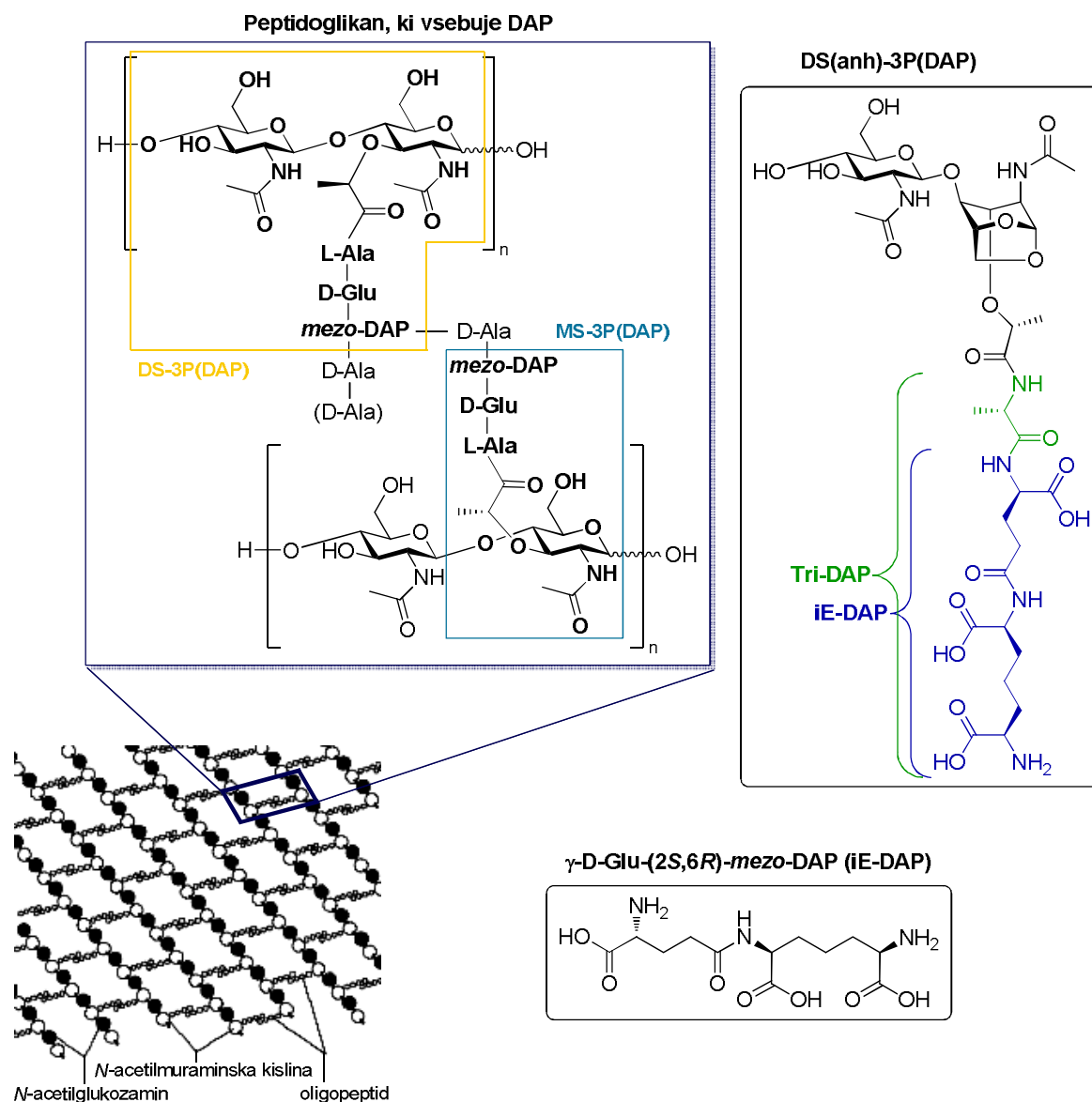
Vezava PAMP na NOD1 v končni fazi privede do sproščanja citokinov IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-12 in TNF- α ter poveča transkripcijo IL-17, IL-19, IL-20, IL-22 in IL-24. Izrazito se poveča tudi sproščanje kemokinov IL-8, CXCL1, MIP-2 in MCP-1 (28,37,49–51). Sproščeni vnetni citokini in kemokini povzročijo vnetje, aktivirajo mehanizme prirojenega imunskega sistema in predvsem preko indukcije limfocitov Th2 prispevajo k aktivaciji pridobljenega imunskega sistema (28,50). NOD1 prav tako modulira nastajanje interferona β in povzroči sproščanje peptidoglikan prepoznavnih proteinov ter protimikrobnih peptidov, β -defenzinov (52–54). Čeprav NOD1 preko kaspaze-1 spodbuja apoptozo, do nje ne pride, ker jo zavre NF- κ B (48,55–57).

1.3.2 Odnos med strukturo in delovanjem (SAR) agonistov NOD1

Tridimenzionalna struktura domene LRR oziroma vezavnega mesta za PAMP na receptorjih NOD1 še ni znana, zato moramo o strukturnih zahtevah za agonistično delovanje sklepati na podlagi že znanih ligandov.

NOD1 zaznava strukturne dele peptidoglikana bakterij. Bakterijski peptidoglikan je heteropolimer, sestavljen iz polisaharidnih verig z alternirajočim zaporedjem *N*-acetilglukozamina in *N*-acetilmuraminske kisline, ki se med seboj povezujeta z β -(1,4)-glikozidno vezjo. Polisaharidne verige so med seboj premrežene s kratkimi peptidi, ki na tretjem mestu navadno vsebujejo diamino kislino, ki je pri večini po Gramu pozitivnih bakterij lizin, po Gramu negativne in nekatere po Gramu pozitivne bakterije pa vsebujejo diaminopimelinsko kislino (DAP) (slika 5). NOD1 zaznava le strukture, ki vsebujejo DAP, zato zaznava večinoma po Gramu negativne bakterije (36,39,58,59).

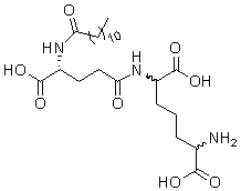
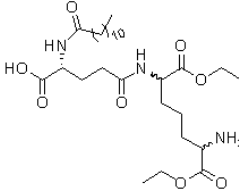
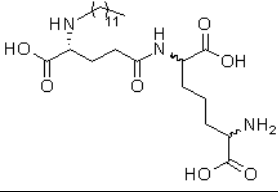
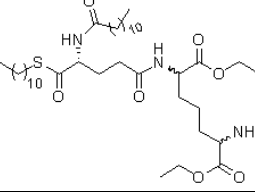
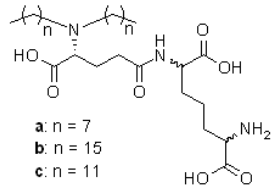
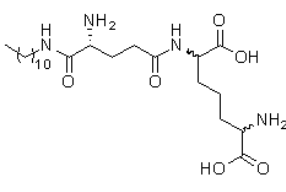
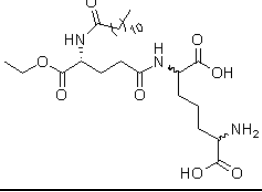
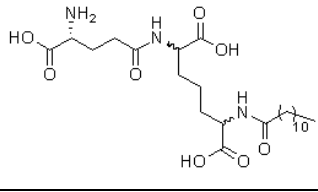
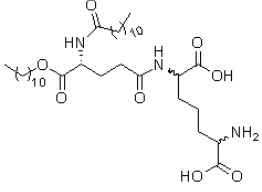
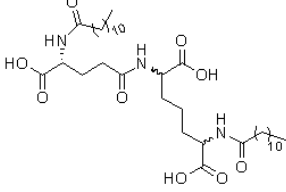
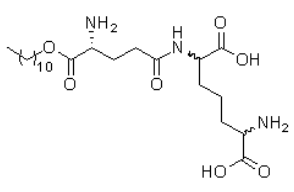
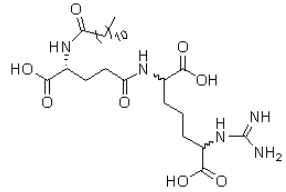
Najmočnejši naravni ligand receptorjev NOD1 je GlcNAc-(β 1-4)-(anhidro)MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-*mezo*-DAP (DS(anh)-3P(DAP)), ki v celicah HEK293T pri koncentraciji 10 ng/mL poveča izražanje NF- κ B za faktor \sim 21. Precej močna naravna agonista sta še MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-*mezo*-DAP (MS-3P(DAP)), ki pri koncentraciji 10 ng/mL prav tako za \sim 21-krat poveča izražanje NF- κ B, in GlcNAc-(β 1-4)-MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-*mezo*-DAP (DS-3P(DAP)), ki pri istih pogojih poveča izražanje NF- κ B za \sim 15-krat (36,39,58). Če tem molekulam odstranimo sladkorni del, dobimo še vedno aktiven tripeptid Tri-DAP (L-Ala- γ -D-Glu-*mezo*-DAP), za katerega so dokazali direktno vezavo na domeno LRR receptorja NOD1 (43). Najmanjši strukturni fragment bakterijskega peptidoglikana, ki še sproži odziv preko receptorjev NOD1 pa je dipeptid γ -D-Glu-DAP (36,60,61). Ta dipeptid ima dva stereogena centra in s tem 4 možne optične izomere, pri čemer daleč najmočnejše deluje njegova (2*S*,6*R*)-*mezo* oblika, ki jo navadno zasledimo tudi v strukturi peptidoglikana, medtem ko ostali diastereoizomeri γ -D-Glu-DAP izkazujejo 10–10000-krat nižje delovanje (36,59,60). Za agonistično delovanje na receptorjih NOD1 je pomembno preko katere karboksilne kisline sta s peptidno vezjo povezani glutaminska kislina in DAP, saj dipeptid α -D-Glu-DAP ne izkazuje nobene agonistične aktivnosti (62). Strukture omenjenih agonistov receptorjev NOD1 so predstavljene na sliki 5.



Slika 5: Zgradba peptidoglikana z diaminopimelinsko kislino in strukture nekaterih agonistov na receptorjih NOD-1 (prirejeno po (36,63,64)).

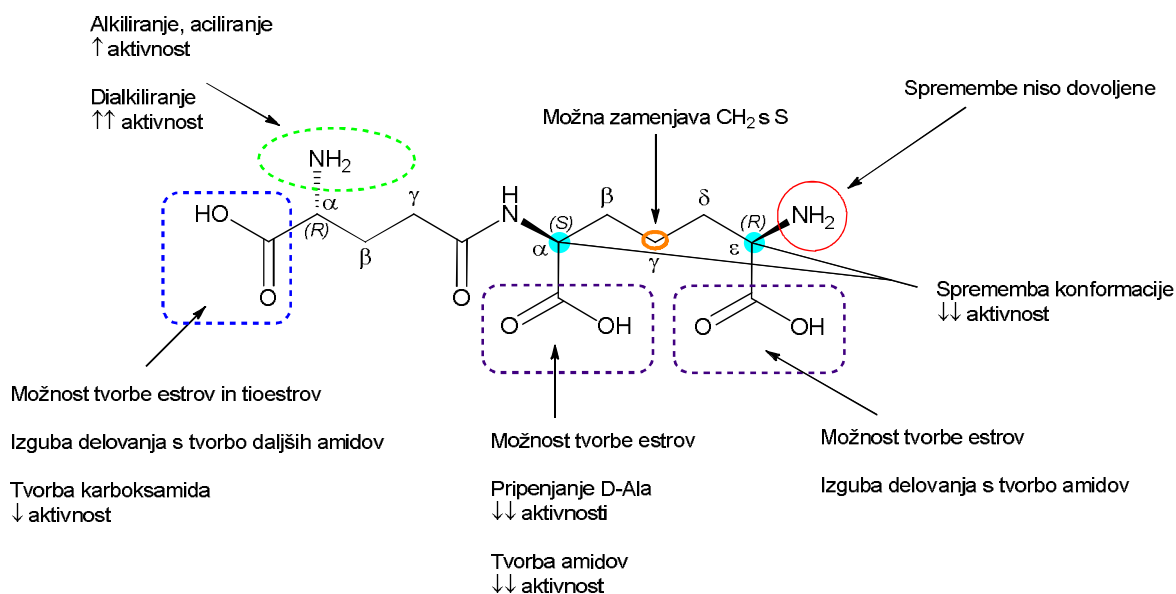
V dipeptidu γ -D-Glu-(2*S*,6*R*)-*mezo*-DAP (iE-DAP) ključne strukturne dele predstavljajo obe amino skupini in vse tri karboksilne skupine. Njihova odstranitev močno zmanjša aktivnost ali pa povzroči popolno izgubo delovanja (51,61). Osnovno molekulo pa lahko preoblikujemo in vanjo uvajamo določene spremembe, katerih vpliv na EC₅₀ (efektivna koncentracija, ki izzove 50 % maksimalnega učinka) je predstavljen v preglednici VI.

Preglednica VI: Analogi dipeptida iE-DAP in njihove vrednosti EC₅₀ (51).

Spojina	EC ₅₀ (pM)	Spojina	EC ₅₀ (pM)
	27		145
	23		181
 a: n = 7 b: n = 15 c: n = 11	a: 200 b: 120 c: 1.5		826
	69		550
	134		580
	66		622

Aciliranje iE-DAP s hidrofobnimi kislinami na α -amino skupini ostanka glutaminske kisline privede do močnejšega delovanja, kar je najverjetneje povezano s povečanim prehajanjem takšnih spojin skozi celično membrano (60). Če aciliranje izvedemo z miristinsko kislino (tetradekanojska kislina), dobimo derivat, ki v celicah HEK293T pri koncentraciji 10 ng/mL poveča izražanje NF- κ B za faktor \sim 19, kar je primerljivo z aktivnostjo naravnega liganda DS(anh)-3P(DAP) (36). Aciliranje z drugimi višjimi maščobnimi kislinami prav tako privede do analogov z dobrim delovanjem. Dodekanojski

derivat, C12-iE-DAP, je na voljo kot referenčni standard za agoniste NOD1 in ima $EC_{50} \sim 30$ pM. Tako kot aciliranje tudi N-alkiliranje α -amino skupine glutamatnega ostanka z dolgimi alkilnimi verigami poveča aktivnost, v primeru dialkiliranja pa se aktivnost še bistveno poveča. Na vseh karboksilnih skupinah iE-DAP lahko tvorimo estre brez izgube aktivnosti (51), medtem ko je na karboksilni skupini glutamatnega dela molekule možno tvoriti še tioestre, tvorba amidov na tem mestu pa zmanjša aktivnost, oziroma povzroči izgubo delovanja (51,65,66). Če na ϵ -karboksilni skupini ostanka DAP spojine MS-3P(DAP) uvedemo karboksamidno skupino, dobimo popolnoma neaktiven derivat. Na tej podlagi lahko sklepamo, da tvorba amidov na analogni skupini v iE-DAP vodi v izgubo delovanja. Podobno se zgodi tudi s pripenjanjem D-alanina na α -karboksilno skupino ostanka DAP, saj D-alanin na tem mestu v MS-3P(DAP) močno zmanjša aktivnost. Pomembna je tudi dolžina distančnika med stereogenima centroma v DAP delu molekule, saj daljšanje verige DAP v MS-3P(DAP) vodi do neaktivnih derivatov, medtem ko zamenjava centralne CH_2 skupine z žveplovim atomom ne povzroči izgube aktivnosti (36,61,66). V DAP delu dipeptida iE-DAP je še posebej občutljiva prosta aminska skupina, na kateri kakršne koli spremembe niso tolerirane (51,61). SAR derivatov dipeptida iE-DAP je predstavljen na sliki 6.



Slika 6: SAR derivatov dipeptida γ -D-Glu-(2S,6R)-*mezo*-DAP (iE-DAP) (prirejeno po (51)).

iE-DAP je pomemben strukturni del bakterij in hkrati tip spojine, kakršnega v človeškem organizmu ne zasledimo. Aminokislina se v našem organizmu pojavljajo v L-obliki, medtem ko je aminokislina DAP popolnoma specifična za bakterije, zato je detekcija preko NOD1 dober in specifičen način odkrivanja bakterij. Nekaterim bakterijam je vendar

uspelo modificirati svojo peptidoglikansko strukturo, in sicer lahko nekatere tvorijo karboksamid na α -karboksilni kislini glutamatnega ostanka, na prosti karboksilni skupini DAP, ali na obeh mestih. Preko glutamatnega ostanka lahko namesto amida tvorijo peptidno vez z glicinom ali D-serinom. Možna je tudi zamenjava DAP z L-ornitinom ter nekaterimi drugimi aminokislinami in sprememba konformacije DAP v (*2R,6R*) ali (*2S,6S*) obliko. S tem se izognejo detekciji ali pa zmanjšajo njeno intenziteto. Seveda NOD1 prav tako ne zaznava po Gramu pozitivnih bakterij, ki imajo namesto DAP v svoji strukturi L-lizin (60,61,66).

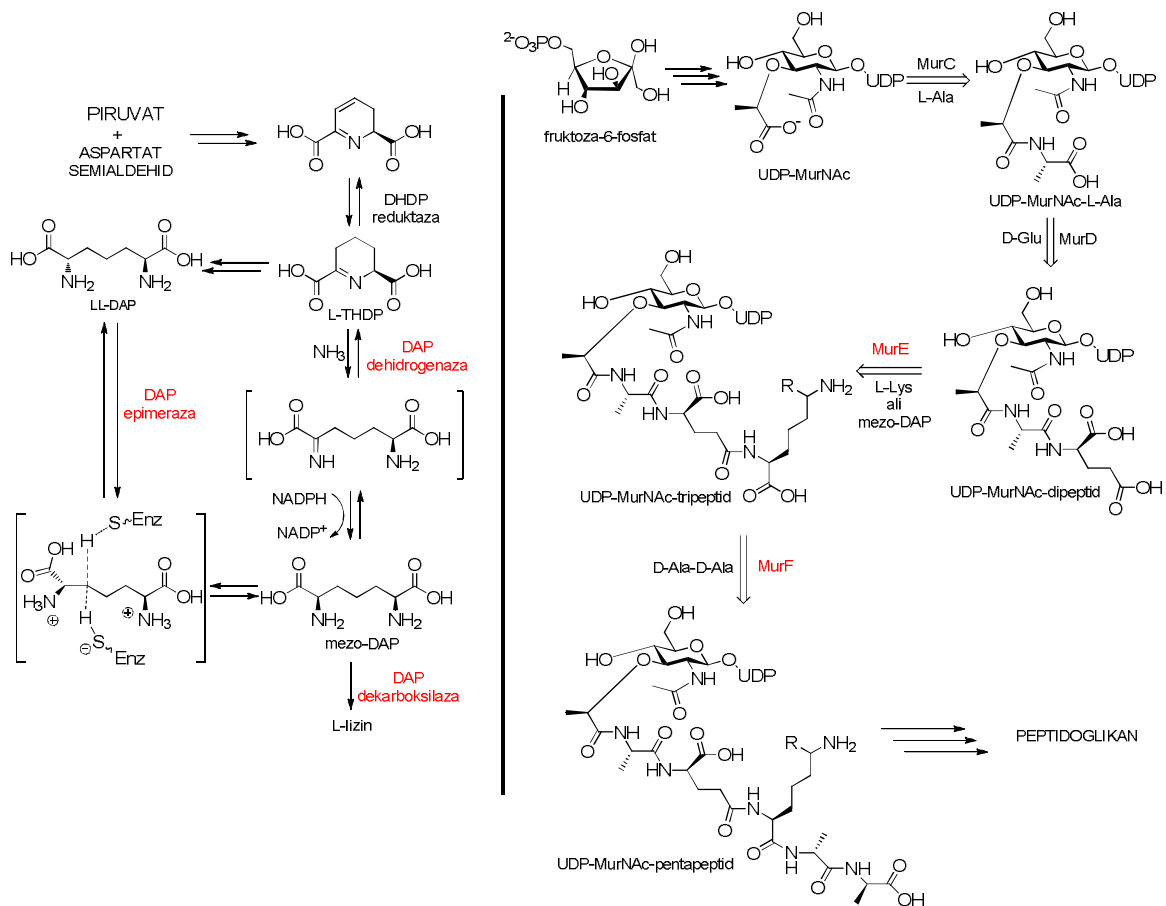
1.3.3 Potencial agonistov in antagonistov receptorjev NOD1

Nepravilno delovanje receptorjev NOD1 vodi v razna bolezenska stanja. Pretirana stimulacija imunskega sistema preko NOD1 je povezana z nastankom astme, kronične vnetne črevesne bolezni, avtoimunega uveitisa, vaskularnih vnetnih bolezni, atopičnega dermatitisa, revmatoidnega artritisa ter drugih obolenj (34,67–75). Povečano je tudi tveganje za razvoj multiple skleroze (76). Z antagonisti NOD1 bi lahko razvili novo generacijo učinkovin za zdravljenje teh bolezni, ki bi bile koristne tudi pri obvladovanju septičnega šoka, saj bi negativno modulirale imunski odziv, torej bi delovale imunosupresivno (77).

Po drugi strani bi z agonisti NOD1 lahko razvili nove imunostimulanse, oziroma učinkovine, ki pozitivno modulirajo imunski odziv. Z njimi bi bilo možno stimulirati imunski sistem pri imunokompromitiranih bolnikih, na primer tistih, ki imajo AIDS, levkemijo ali prejemajo protitumorno terapijo (77,78). Pri bolnikih, katerih imunski sistem sicer normalno deluje, pa bi okrepili mehanizme prirojene in pridobljene imunosti, s čimer bi dosegli uporabo nižjih odmerkov ali skrajšan čas terapije pri zdravljenju z ostalimi zdravili (64,78). Dovolj močni imunostimulansi bi lahko morda sami prevesili ravnotežje bitke z mikroorganizmi v prid gostitelja (26,79–81). Nekateri raziskave so pokazale, da so receptorji NOD1 pomembni pri obrambi pred bakterijo *Helicobacter pylori*, z njimi bi bilo med drugim možno zdraviti ulkus (44,53,82). Velika prednost novih protimikrobnih učinkovin takšnega tipa bi bila majhna možnost pojava rezistence, saj njihova primarna tarča niso mikroorganizmi sami in zato ne vršijo direktnega selekcijskega pritiska. To teorijo podpira tudi dejstvo, da se pri uporabi cepiv pojavlja manjša rezistenca kot pri uporabi klasičnih protimikrobnih učinkovin. Zaradi nespecifičnosti mehanizmov prirojene imunosti, bi bila druga prednost imunostimulansov kot protimikrobnih agensov

učinkovanje na širok spekter patogenov (79,80). Ker receptorji NOD1 stimulirajo limfocite Th2, bi lahko njihove agoniste uporabili tudi kot adjuvance pri cepivih (26,50,51). Znano je, da receptorji NOD1 igrajo pomembno vlogo v boju proti nekaterim tumorjem, zato imajo njihovi agonisti potencial kot protitumorne učinkovine, ki bi zavirale rast in proliferacijo nekaterih tumorjev dojk ali zmanjšale incidenco tumorja debelega črevesja pri bolnikih s kronično vnetno črevesno boleznijo (62,83). Seveda lahko imajo agonisti NOD1 tudi slabosti. Pričakovani glavni stranski učinki pri vseh načinih uporabe so akutni zapleti zaradi pretiranega vnetja in možnost povzročitve avtoimunih ter kroničnih vnetnih bolezni (80).

Spojine, ki imajo v svoji strukturi fragment *mezo*-DAP, lahko imajo tudi neposredno protibakterijsko delovanje. Premreženje bakterijskega peptidoglikana poteka v glavnem preko L-lizina ali *mezo*-DAP (59). Bakterije ti dve aminokislini sintetizirajo same, medtem ko sesalci tega nismo sposobni. Encimi v sintezni poti L-lizina in *mezo*-DAP zato predstavljajo dobre tarče za razvoj novih kemoterapevtikov s selektivno toksičnostjo (84–87). Spojin, ki vsebujejo *mezo*-DAP, bi lahko inhibirale encime DAP dekarboksilazo, DAP dehidrogenazo in DAP epimerazo v biosintezni poti L-lizina preko DAP (slika 7). Pri tem bi bilo za inhibicijo DAP dehidrogenaze in DAP epimeraze bolje, če bi bil ogljikov atom na mestu 6 v *mezo*-DAP planaren (84,85). Potencialne tarče za nove kemoterapevtike so tudi Mur ligaze, ki so encimi udeleženi v sintezi bakterijskega peptidoglikana. *mezo*-DAP je substrat encima MurE, ki UDP-*N*-acetilmuramil-L-Ala- γ -D-Glu pretvori v UDP-*N*-acetilmuramil-L-Ala- γ -D-Glu-*mezo*-DAP. UDP-*N*-acetilmuramil-L-Ala- γ -D-Glu-*mezo*-DAP nato vstopa v reakcijo z dipeptidom D-Ala-D-Ala preko encima MurF. *mezo*-DAP vsebujoče spojine bi torej lahko inhibirale encima MurE in MurF (slika 7) (88,89).



Slika 7: Biosinteza L-lizina preko DAP in sinteza bakterijskega peptidoglikana. Encimi, ki so potencialne tarče za nove DAP vsebujoče kemoterapevtike, so označeni z rdečo barvo (prirejeno po (64,85)).

2. NAMEN DELA

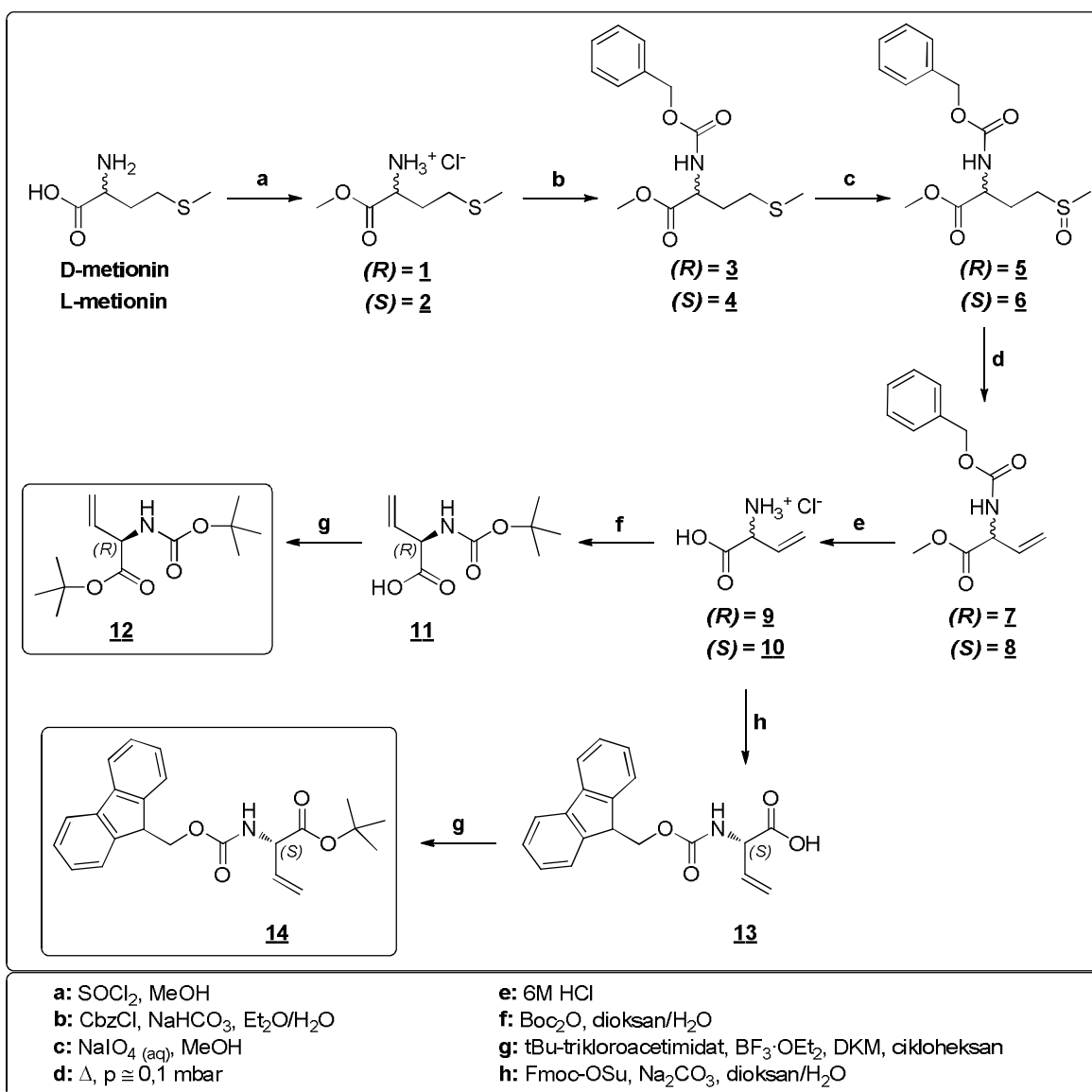
V okviru diplomskega dela bomo sintetizirali dve spojini s potencialnim agonističnim delovanjem na receptorjih NOD1, ki lahko predstavljata izhodišče za razvoj novih imunomodulatornih učinkovin. Kot je bilo omenjeno že prej, imajo spojine takšnega tipa potencial za zdravljenje različnih bolezni povezanih z nepravilnostmi v delovanju receptorjev NOD1, za uporabo kot adjuvansi v cepivih, kot protitumorne učinkovine in ne nazadnje kot protimikrobne učinkovine s posrednim in/ali neposrednim delovanjem.

Ker 3D struktura vezavnega mesta ligandov NOD1 še ni znana, bomo ti dve spojini načrtovali na osnovi že znanih agonistov. Izhajali bomo iz dipeptida γ -D-Glu-(2*S*,6*R*)-*mezo*-DAP (iE-DAP), najmanjšega fragmenta bakterijskega peptidoglikana, ki še sproži odziv preko receptorjev NOD1 (61). Na aminsko skupino v glutamatnem delu iE-DAP bomo uvedli dve dolgi lipofilni verigi, saj predvidevamo, da bomo s tem spojinama povečali lipofilnost in izboljšali prehod čez celične membrane. Rezultati drugih raziskovalnih skupin kažejo, da je to za delovanje zelo ugodno (51,60). Zaradi relativno dolge stranske verige aminokislina *mezo*-DAP lahko iE-DAP zavzame veliko različnih prostorskih konformacij. Sklepamo lahko, da vse postavitve v prostoru niso ugodne za vezavo na tarčno mesto, zato bi bilo z rigidizacijo ostanka *mezo*-DAP v dipeptidu iE-DAP možno povečati afiniteto do tarčnega mesta na receptorju in s tem tudi povečati aktivnost.

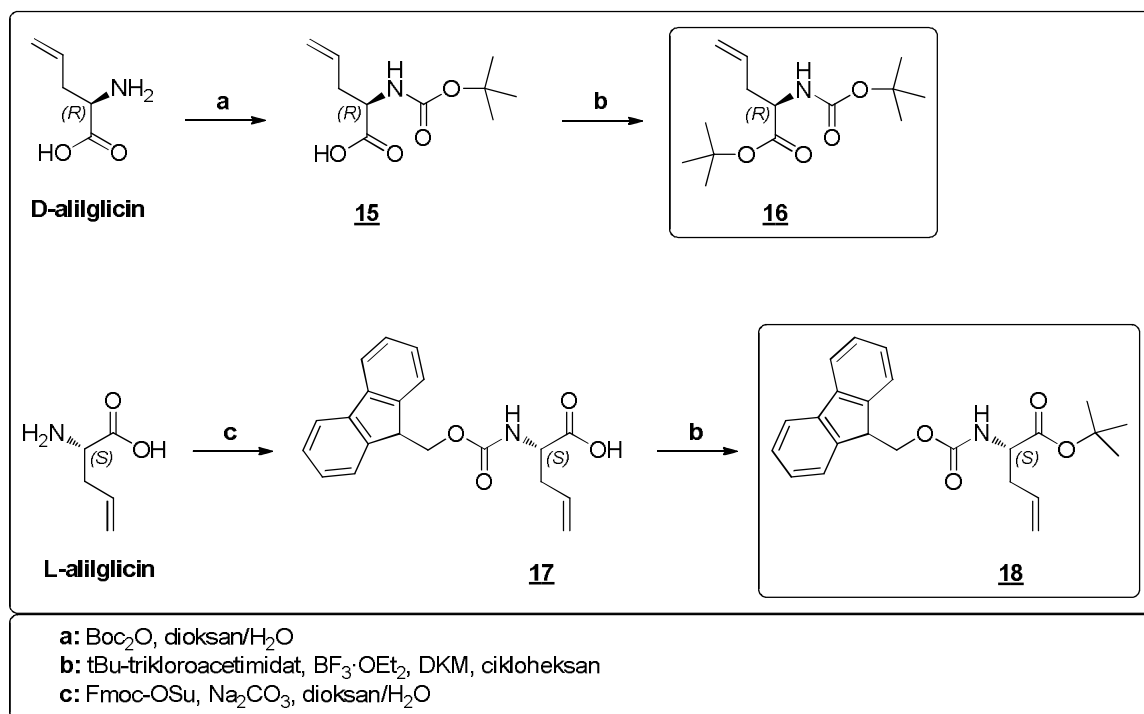
Odločili smo se, da bomo našima spojinama povečali rigidnost s tvorbo dvojne vezi v DAP delu molekule. Prva spojina bo imela dvojno vez na mestu β - γ in druga na mestu γ - δ (slika 12). Naši spojini bosta tako strukturno zelo podobni že znanim agonistom, a bolj rigidni. Tvorba dvojne vezi je enostaven in ugoden način rigidizacije, saj z njo na molekulo ne uvajamo novih funkcionalnih skupin, ki bi lahko s steričnimi interakcijami ovirale vezavo. Potrebno je omeniti še, da je dvojna vez elektronegativna, a glede na to, da lahko v tem delu molekule CH₂ skupino zamenjamo z žveplovim atomom, ki je prav tako elektronegativen, to ne bi smelo predstavljati problema (61).

Pri sintezi spojin bomo izhajali iz aminokislin D- in L-metionin, iz katerih bomo s S-oksidacijo in kasnejšo dehidrosulfenilacijo pripravili ustrezno zaščiten D- in L-vinilglicin (slika 8), ter iz komercialno dostopnih aminokislin D- in L-alilglicin, katerima bomo ustrezno zaščitili karboksilno in aminsko skupino (slika 9). L-vinilna in alilna derivata glicina bosta imela aminsko skupino zaščiten s skupino Fmoc, medtem ko

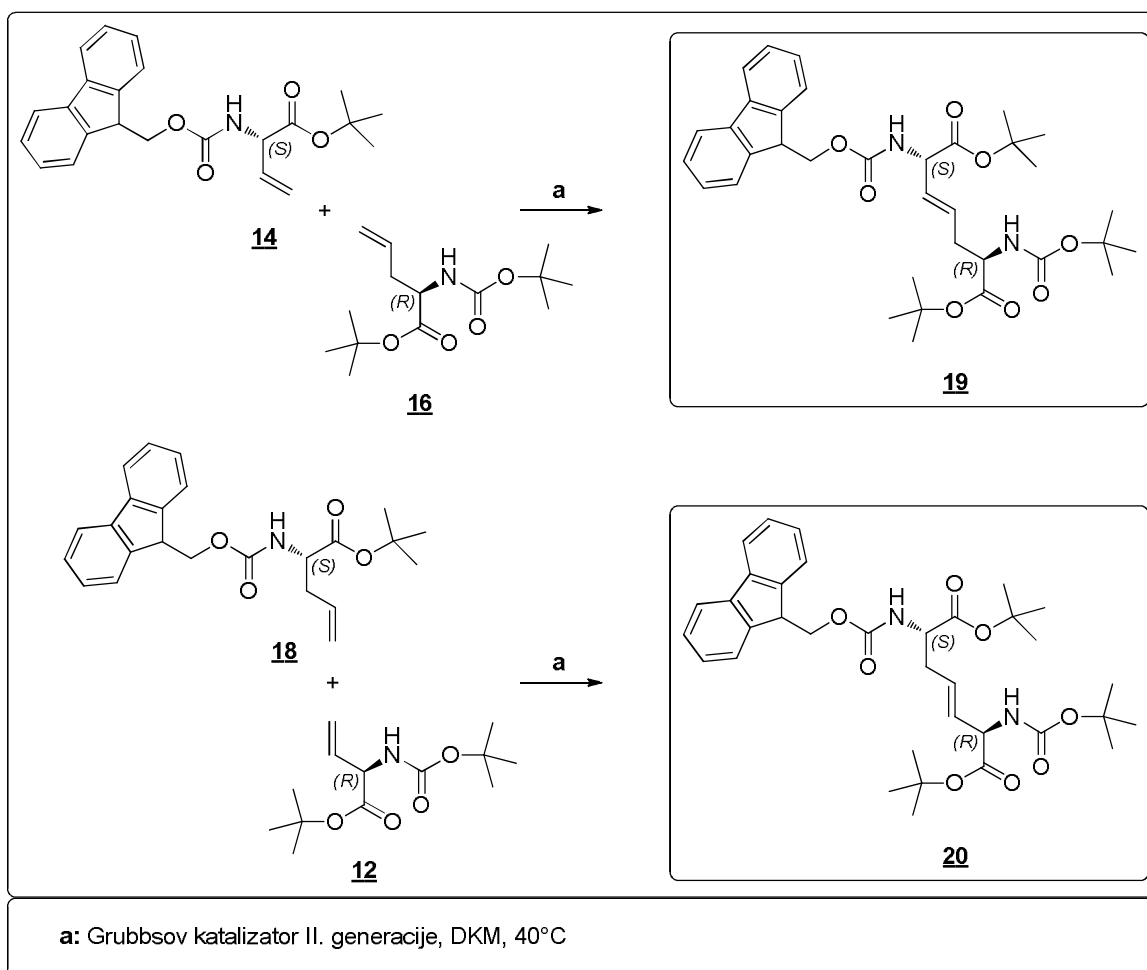
bosta imela D-vinilna in alilna derivata na tem mestu zaščitno skupino Boc, vsi derivati pa bodo imeli karboksilno skupino zaščiteno s *tert*-butilnim estrom. Iz tako pripravljenih spojin bomo z olefinsko metatezo sintetizirali dva rigidizirana analoga diaminopimelinske kisline, ki bosta ključna fragmenta v naši sintezi (slika 10). V nadaljevanju bomo derivatu D-glutaminske kisline odščitili amsko skupino in nanjo z reduktivnim aminiranjem uvedli dve *n*-dodecilni verigi, α -karboksilno skupino pa bomo pustili zaščiteno s *tert*-butilnim estrom. Sledila bo odščita Fmoc-zaščiteneh amskih skupin na analogih aminokislina DAP in pripenjanje *N,N*-dialkilnega derivata D-glutaminske kisline preko tvorbe peptidne vezi. V zadnji stopnji sinteze bomo s trifluoroocetno kislino odščitili Boc in *tert*-butilne zaščite in s tem dobili želeni spojini, ki bosta *N,N*-dialkilna analoga dipeptida γ -D-Glu-(2*S*,6*R*)-*mezo*-DAP v obliki di-trifluoroacetata (slika 11).



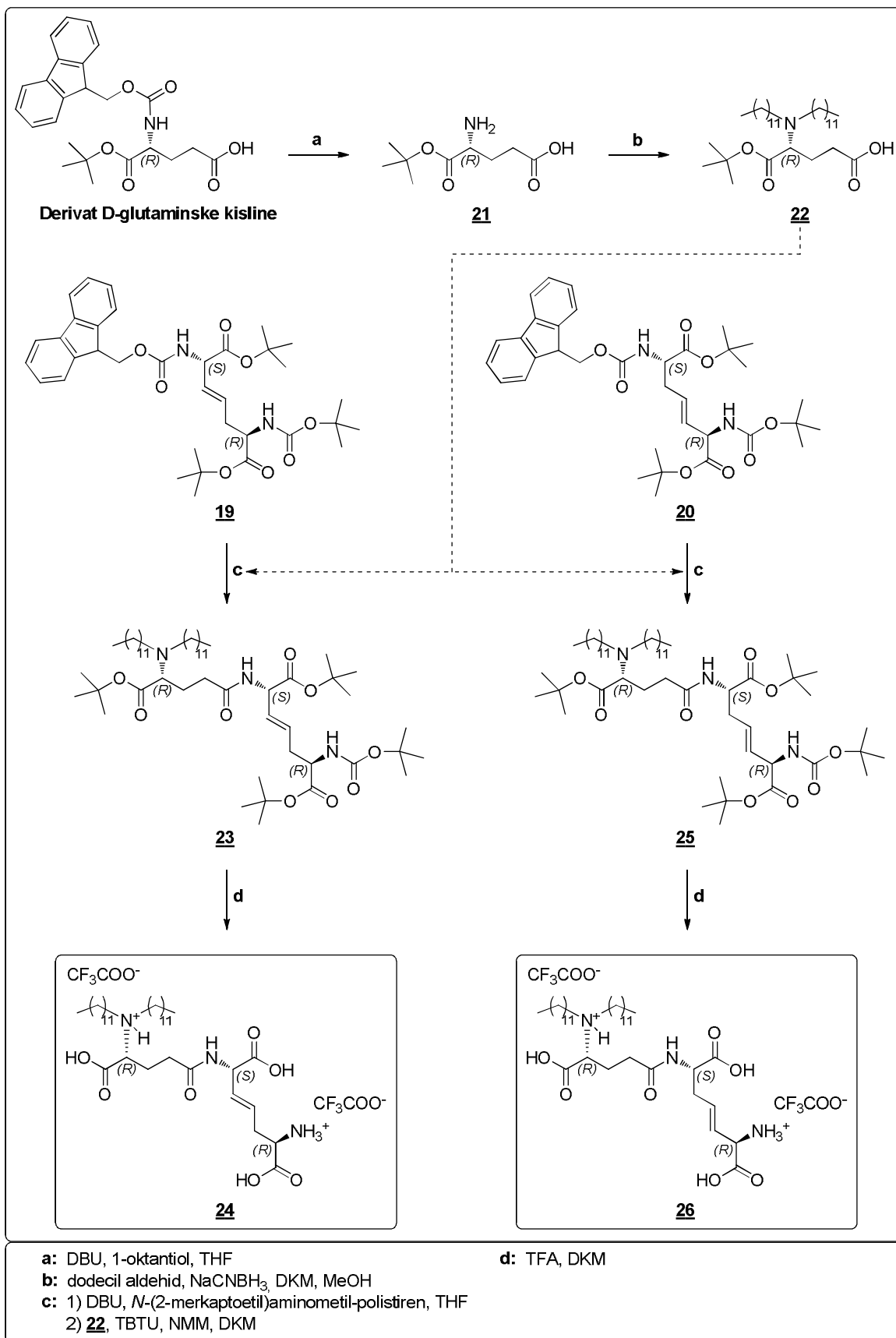
Slika 8: Shema sinteze zaščiteneh derivatov vinilglicina.



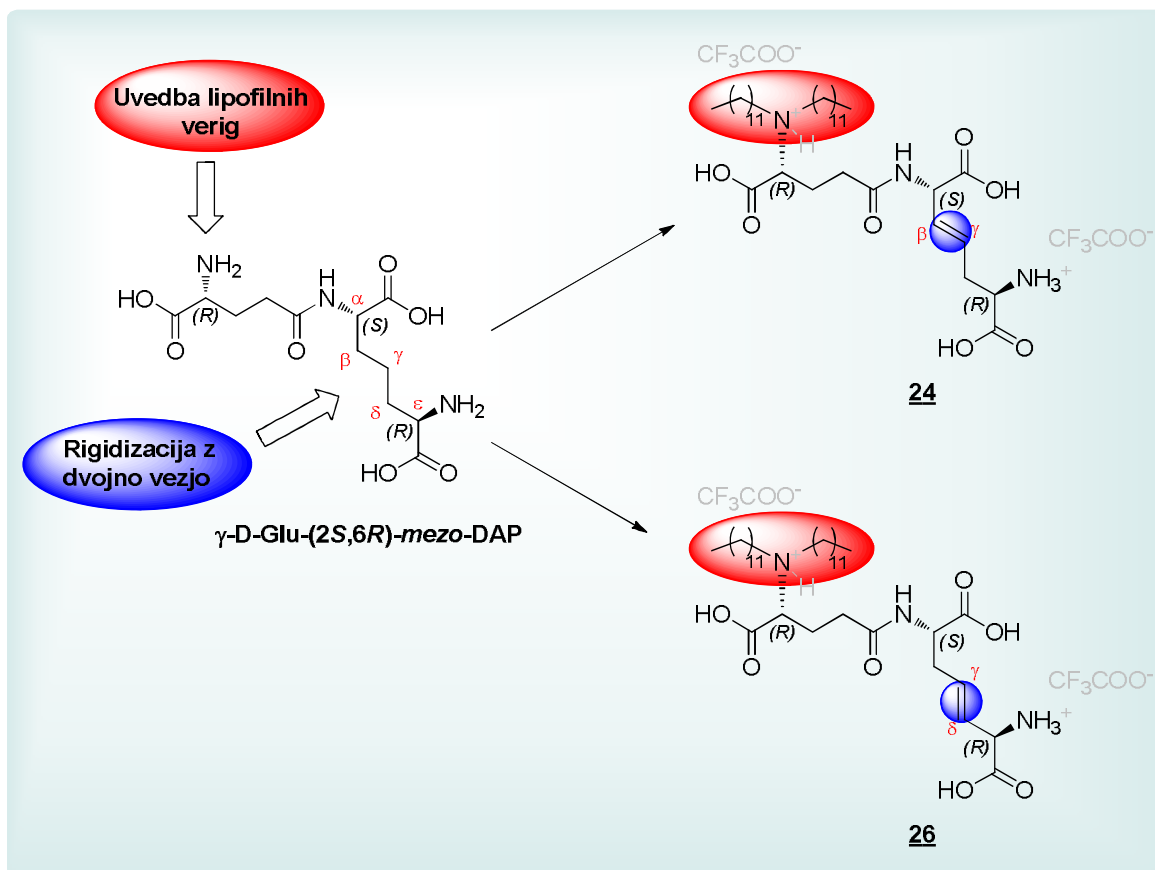
Slika 9: Shema sinteze zaščiteneh derivatov alilglicina.



Slika 10: Sinteza analogov *mezo*-diaminopimelinske kisline z olefinsko metatezo.



Slika 11: Shema sinteze rigidiziranih analogov dipeptida γ -D-Glu-(2*S*,6*R*)-*mezo*-DAP.



Slika 12: Primerjava strukture dipeptida γ -D-Glu-(2*S*,6*R*)-*mezo*-DAP s spojinama **24** in **26**.

Naši novo sintetizirani spojinii bomo biološko ovrednotili na celični liniji Ramos-Blue™. Njuno delovanje bomo primerjali z delovanjem znanih NOD1 agonistov, tripeptida Tri-DAP in dipeptida C12-iE-DAP. Pričakujemo, da bosta naši spojinii preko receptorjev NOD1 povečali izražanje NF- κ B, kar bo kazalo na njuno imunostimulatorno delovanje. Prav tako predvidevamo, da bosta zaradi ugodne *N,N*-dialkilacije z dolgimi alkilnimi verigami in zaradi večje rigidnosti, boljše ali vsaj enako aktivni kot spojinii uporabljeni za standard.

3. MATERIALI IN METODE

Reagenti in topila

Pri delu smo uporabljali reagente in topila različnih proizvajalcev (Acros Organics, Sigma-Aldrich, Fluka, Molekula, Bachem, Merck, Janssen, Kemika). Brezvodni diklorometan (DKM) smo pripravili po standardnem postopku in ga hranili nad molekularnimi siti z velikostjo por 0.4 nm.

Laboratorijska oprema

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

Kromatografske metode

- **Tankoplastna kromatografija (TLC)**

Za izvedbo tankoplastne kromatografije smo uporabljali plošče Kieselgel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Nemčija) z 0,20 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem in različne mobilne faze. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabljali UV svetilko ($\lambda = 254 \text{ nm}$ in/ali 366 nm) ter orositveni reagent ninhidrin.

- **Kolonska kromatografija**

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

- **Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)**

HPLC analize smo izvajali na instrumentu Agilent Technologies HP 1100 z UV-VIS detektorjem G1365B, kolono Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 ($4,6 \times 150 \text{ mm}$, 5 μm delci) ob uporabi predkolone in pri pretoku 1 mL/min. Kot eluent smo izbrali zmes 0,1 % raztopine trifluoroocetne kisline v vodi in acetonitrila, pri čemer smo gradient spreminjali glede na izbrano metodo:

♦ **HPLC metoda A:**

1–25 minuta – gradient od 50 % do 80 % acetonitrila
25–27 minuta – gradient od 80 % do 90 % acetonitrila
27–28 minuta – gradient od 90 % do 50 % acetonitrila

♦ **HPLC metoda B:**

1–25 minuta – gradient od 30 % do 80 % acetonitrila
25–30 minuta – gradient od 80 % do 90 % acetonitrila
30–32 minuta – gradient od 90 % do 30 % acetonitrila

♦ **HPLC metoda C:**

1–25 minuta – gradient od 30 % do 80 % acetonitrila
25–27 minuta – gradient od 80 % do 90 % acetonitrila
27–30 minuta – gradient od 90 % do 30 % acetonitrila

Določevanje tališč

Tališča spojin smo določili na Koflerjevem mikroskopu z ogrevalno mizico proizvajalca Leica in so nekorrigirana.

Jedrska magnetna resonanca (NMR)

¹H NMR spektri so bili posneti pri 400 MHz na spektrometru Bruker Avance DPX₄₀₀ na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani ali pri 300 MHz na spektrometru Bruker Avance DPX₃₀₀ na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani. ¹³C NMR spektri so bili posneti pri 100 MHz na spektrometru Bruker Avance DPX₄₀₀ na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Vzorce smo raztopili v DMSO-d₆, CDCl₃ ali devteriranem metanolu in kot interni standard uporabili tetrametilsilan. Spektre smo procesirali s programom MestReC.

Masna spektrometrija (MS)

Masni spektri so bili posneti z ESI tehniko na masnem spektrometru AutoSpec Q (proizvajalec: Micromass, Manchester, Velika Britanija) v Centru za masno spektrometrijo na Institutu »Jožef Stefan« v Ljubljani.

Infrardeča spektroskopija (IR)

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

Optična sučnost

Optično sučnost spojin smo izmerili s polarimetrom Perkin-Elmer 241 MC pri valovni dolžini 589 nm (natrijeva D-linija) v kiveti dolžine 0,1 dm na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Nomenklatura in risanje spojin

Za poimenovanje in risanje spojin smo uporabili programa ChemDraw Ultra 9.0 in ChemBioDraw Ultra 12.0 proizvajalca CambridgeSoft.

Testiranje spojin na celični liniji Ramos-blue

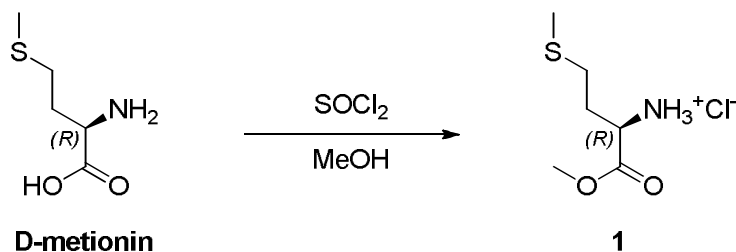
Novosintetizirana agonista receptorjev NOD1 smo dali biološko ovrednotiti na Katedro za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Za testiranje so uporabili celice Ramos-Blue™ in reagent QUANTI-Blue™ proizvajalca InvivoGen.

180 µL suspenzije celic Ramos-Blue™ (~ 400000 celic) je bilo dodanih 20 µL 1 µM ali 10 µM raztopine naših agonistov (spojina **24** oziroma **26**), 1 µM raztopine C12-iE-DAP ali 10 µM raztopine Tri-DAP, pri čemer je bil kot topilo uporabljen gojitveni medij. Pri negativni kontroli je bil suspenziji celic dodan le gojitveni medij. Celice so bile nato skupaj z ustreznimi slepimi vzorci 18 ur inkubirane pri 37 °C v 5 % atmosferi CO₂. Po končani inkubaciji je bila v supernatantu celic z reagentom QUANTI-Blue™ spektrofotometrično izmerjena količina »izločene zarodne alkalne fosfataze« (angl. »secreted embryonic alkaline phosphatase« – SEAP). Absorbanca vzorcev je bila izmerjena pri 640 nm po 24-urni inkubaciji v mediju za analizo.

4. EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 SINTEZA (2*R*)-1-METOKSI-4-(METILTIO)-1-OKSO-2-BUTANAMINIJEVEGA KLORIDA (**1**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

15,10 g (101,2 mmol) D-metionina smo raztopili v 125 mL metanola in raztopino ohladili na 0 °C. Nato smo s kapalnikom ob mešanju dodali 8,1 mL (110 mmol) tionil klorida, reakcijsko zmes predstavili na oljno kopel in jo kratek čas refluktirali. Po refluktiranju smo reakcijo pustili potekati pri sobni temperaturi in jo prekinili po 43-ih urah. Reakcijski zmesi smo pod znižanim tlakom uparili metanol in dobili trden zaostanek, ki smo ga suspendirali v dietil etru. Eter smo odnučali s pomočjo presesalne erlenmajerice in zavrgli, trden zaostanek pa posušili v sušilniku ter dobili 20,00 g spojine **1**.

PRODUKT:

Izgled: bela trdna snov

Izkoristek: 99,0 %

R_f: 0,72 (Mf: CH₃CN/MeOH/H₂O = 6/1/1)

Tališče: 154–155 °C; po literaturi: 145–146 °C (90)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):

δ [ppm] = 2,04–2,09 (m, 5H, -CH₂-S-CH₃),
2,58–2,68 (m, 2H, -CH-CH₂-),
3,76 (s, 3H, -OCH₃),
4,12 (t, 1H, J = 6,4 Hz, -α-CH-),
8,55 (s, 3H, -NH₃⁺).

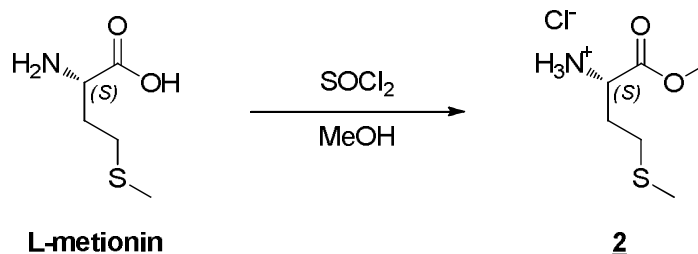
MS (ESI): *m/z* = 164,1 (M – Cl)⁺; **M_r (izračunano):** 199,70;

M_r (izračunano za M – HCl): 163,24

HRMS (za C₆H₁₄NO₂S): 164,0753; izračunano: 164,0745

4.2 SINTEZA (2*S*)-1-METOKSI-4-(METILTIO)-1-OKSO-2-BUTANAMINIJEVEGA KLORIDA (2)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

15,10 g (101,2 mmol) L-metionina smo raztopili v 125 mL metanola in raztopino ohladili na 0 °C. Nato smo s kapalnikom ob mešanju dodali 8,1 mL (110×10^2 mmol) tionil klorida, reakcijsko zmes prestavili na oljno kopel in jo kratek čas refluktirali. Po refluktiranju smo reakcijo pustili potekati pri sobni temperaturi in jo prekinili po 43-ih urah. Reakcijski zmesi smo pod znižanim tlakom uparili metanol in dobili trden zaostanek, ki smo ga suspendirali v dietil etru. Eter smo odnučali s pomočjo presesalne erlenmajerice in zavrgli, trden zaostanek pa posušili v sušilniku ter dobili 20,00 g spojine 2.

PRODUKT:

Izgled: bela trdna snov

Izkoristek: 99,0 %

R_f: 0,72 (Mf: CH₃CN/MeOH/H₂O = 6/1/1)

Tališče: 152–153 °C; po literaturi: 145–146 °C (90)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):

δ [ppm] = 2,04–2,09 (m, 5H, -CH₂-S-CH₃),
2,58–2,68 (m, 2H, -CH-CH₂-),
3,76 (s, 3H, -OCH₃),
4,12 (t, 1H, J = 6,4 Hz, -α-CH-),
8,55 (s, 3H, -NH₃⁺).

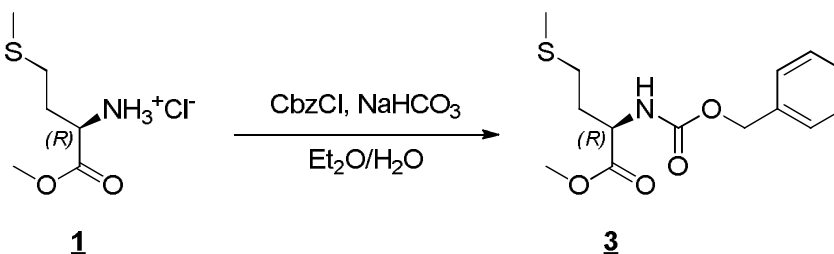
MS (ESI): m/z = 164,1 (M - Cl)⁺; **M_r (izračunano):** 199,70;

M_r (izračunano za M - HCl): 163,24

HRMS (za C₆H₁₄NO₂S): 164,0739; izračunano: 164,0745

4.3 SINTEZA METIL (2*R*)-2-[[*(BENZILOKSI)KARBONIL*]AMINO]-4-(METILTIO)BUTANOATA (**3**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

3,72 g (18,6 mmol) spojine **1** smo raztopili v zmesi 30 mL dietil etra in 30 mL vode, vse skupaj ohladili na 0 °C ter dodali 7,83 g (93,2 mmol) NaHCO₃. Po 15-ih minutah smo s kapalnikom ob mešanju dodali 6,6 mL (21 mmol) 45 % raztopine benzil kloroformata v toluenu in pustili reakcijo potekati pri sobni temperaturi. Po 120-ih urah smo reakcijo prekinili in reakcijsko zmes zlili v lij ločnik. Vodno fazo smo ločili od eterne ter jo še dvakrat ekstrahirali z 10 mL dietil etra. Vse eterne faze smo združili in jih sprali najprej z 20 mL 1M raztopine HCl, nato z 20 mL vode in na koncu še z 20 mL nasičene raztopine NaCl. Nato smo organsko fazo posušili z Na₂SO₄ in eter uparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 5,63 g produkta, ki je vseboval 78,8 % (m/m) oziroma 4,44 g spojine **3**.

PRODUKT:

Izgled: brezbarvna oljnata tekočina

Izkoristek: 80,1 %

R_f: 0,70 (Mf: DKM/MeOH = 20/1)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):

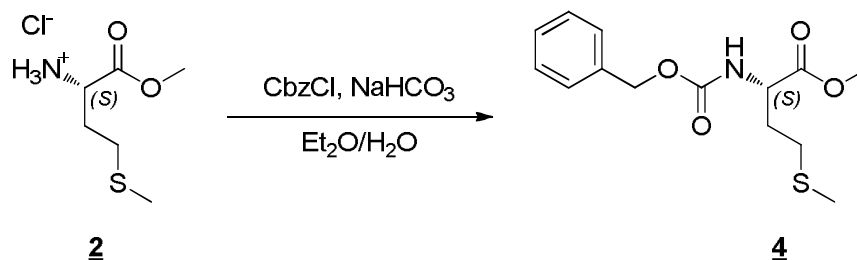
δ [ppm] = 1,93–2,05 (m, 1H, -β-CH_{2A}-),
2,11 (s, 3H, -S-CH₃),
2,16–2,25 (m, 1H, -β-CH_{2B}-),
2,56 (t, 2H, J = 7,2 Hz, -S-CH₂-),
3,78 (s, 3H, -OCH₃),
4,50–4,57 (m, 1H, -α-CH-),
5,15 (s, 2H, Ar-CH₂-),
5,44 (d, 1H, J = 6,6 Hz, -NH-),
7,16–7,41 (m, 5H, Ar-H).

MS (ESI): $m/z = 298,1$ ($M + H$)⁺; **M_r (izračunano):** 297,37

HRMS (za $C_{14}H_{20}NO_4S$): 298,1124; izračunano: 298,1113

4.4 SINTEZA METIL (2S)-2-[[**(BENZILOKSI)KARBONIL**]AMINO]-4-(**METILTIO**)BUTANOATA (**4**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

3,73 g (18,7 mmol) spojine **2** smo raztopili v zmesi 30 mL dietil etra in 30 mL vode, vse skupaj ohladili na 0 °C ter dodali 7,83 g (93,2 mmol) NaHCO₃. Po 15-ih minutah smo s kapalnikom ob mešanju dodali 6,6 mL (21 mmol) 45 % raztopine benzil kloroformata v toluenu in pustili reakcijo potekati pri sobni temperaturi. Po 120-ih urah smo reakcijo prekinili in reakcijsko zmes zlili v lij ločnik. Vodno fazo smo ločili od eterne ter jo še dvakrat ekstrahirali z 10 mL dietil etra. Vse eterne faze smo združili in jih sprali najprej z 20 mL 1M raztopine HCl, nato z 20 mL vode in na koncu še z 20 mL nasičene raztopine NaCl. Nato smo organsko fazo posušili z Na₂SO₄ in eter uparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 5,66 g produkta, ki je vseboval 78,8 % (m/m) oziroma 4,46 g spojine **4**.

PRODUKT:

Izgled: bela trdna snov

Izkoristek: 80,3 %

R_f : 0,70 (Mf: DKM/MeOH = 20/1)

Tališče: 37–40 °C; po literaturi: 42–43 °C (90)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 1,93–2,05 (m, 1H, - β -CH_{2A}-),
2,11 (s, 3H, -S-CH₃),
2,16–2,25 (m, 1H, - β -CH_{2B}-),
2,56 (t, 2H, J = 7,2 Hz, -S-CH₂-),
3,78 (s, 3H, -OCH₃),
4,50–4,57 (m, 1H, - α -CH-),

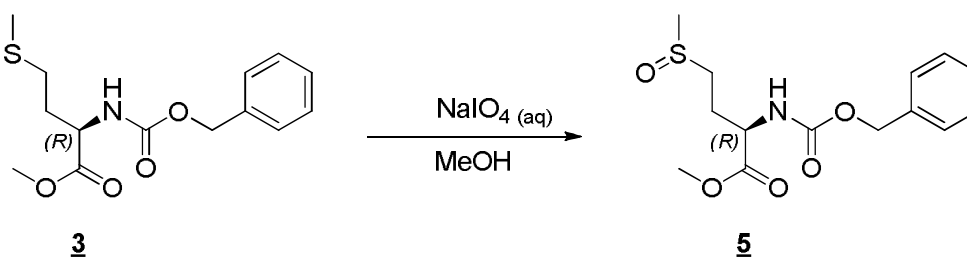
5,15 (s, 2H, Ar-CH₂-),
5,44 (d, 1H, J = 6,6 Hz, -NH-),
7,16–7,41 (m, 5H, Ar-H).

MS (ESI): $m/z = 298,1 (M + H)^+$; **M_r (izračunano):** 297,37

HRMS (za C₁₄H₂₀NO₄S): 298,1109; izračunano: 298,1113

4.5 SINTEZA METIL (2*R*)-2-[(BENZILOKSI)KARBONIL]AMINO}-4-(METILSULFINIL)BUTANOATA (**5**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

4,44 g (14,9 mmol) spojine **3**, smo raztopili v 40 mL metanola in raztopino ohladili na 0 °C. Nato smo ob mešanju po kapljicah dodali 3,33 g (15,6 mmol) natrijevega metaperjodata raztopljenega v 20 mL vode in reakcijo pustili potekati čez noč pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo s tankoplastno kromatografijo potrdili, da v reakcijski zmesi ni bilo več izhodne spojine in reakcijo prekinili. V reakcijski zmesi je bila prisotna oborina, ki smo jo odnučali s pomočjo presesalne erlenmajerice, sprali z metanolom in zavrgli. Filtrat smo pod znižanim tlakom skoncentrirali na 20 mL in ekstrahirali štirikrat s 15 mL DKM. Združene frakcije DKM smo sprali z 20 mL nasičene raztopine NaCl ter posušili z Na₂SO₄. Po odparevanju DKM pod znižanim tlakom smo dobili 4,64 g spojine **5**.

PRODUKT:

Izgled: brezbarvna oljnata tekočina

Izkoristek: 99,2 %

R_f: 0,25 (Mf: DKM/MeOH = 20/1)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 2,12–2,20 (m, 1H, -β-CH_{2A}-),
2,32–2,41 (m, 1H, -β-CH_{2B}-),
2,54 (s, 3H, -SO-CH₃),
2,72–2,79 (m, 2H, -SO-CH₂-),

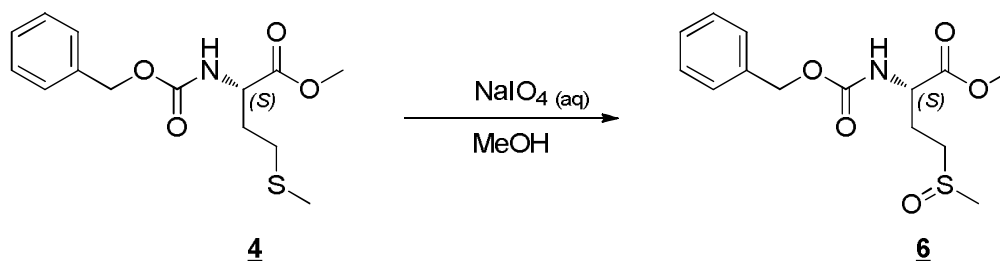
3,76 (s, 3H, -OCH₃),
4,47–4,51 (m, 1H, - α -CH-),
5,12 (s, 2H, Ar-CH₂-),
5,78–5,87 (m, 1H, -NH-),
7,28–7,37 (m, 5H, Ar-H).

MS (ESI): $m/z = 314,1 (M + H)^+$; **M_r (izračunano):** 313,37

HRMS (za C₁₄H₂₀NO₅S): 314,1058; izračunano: 314,1062

4.6 SINTEZA METIL (2S)-2-[[**(BENZILOKSI)KARBONIL**AMINO]-4-(**METILSULFINIL**)BUTANOATA (**6**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

4,46 g (15,0 mmol) spojine **4**, smo raztopili v 40 mL metanola in raztopino ohladili na 0 °C. Nato smo ob mešanju po kapljicah dodali 3,33 g (15,6 mmol) natrijevega metaperjodata raztopljenega v 20 mL vode in reakcijo pustili potekati čez noč pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo s tankoplastno kromatografijo potrdili, da v reakcijski zmesi ni bilo več izhodne spojine in reakcijo prekinili. V reakcijski zmesi je bila prisotna oborina, ki smo jo odnučali s pomočjo presesalne erlenmajerice, sprali z metanolom in zavrgli. Filtrat smo pod znižanim tlakom skoncentrirali na 20 mL in ekstrahirali štirikrat s 15 mL DKM. Združene frakcije DKM smo sprali z 20 mL nasičene raztopine NaCl ter posušili z Na₂SO₄. Po odparevanju DKM pod znižanim tlakom smo dobili 4,67 g spojine **6**.

PRODUKT:

Izgled: bela trdna snov

Izkoristek: 99,3 %

R_f: 0,25 (Mf: DKM/MeOH = 20/1)

Tališče: 63–66 °C; po literaturi: 77–78 °C (91)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):

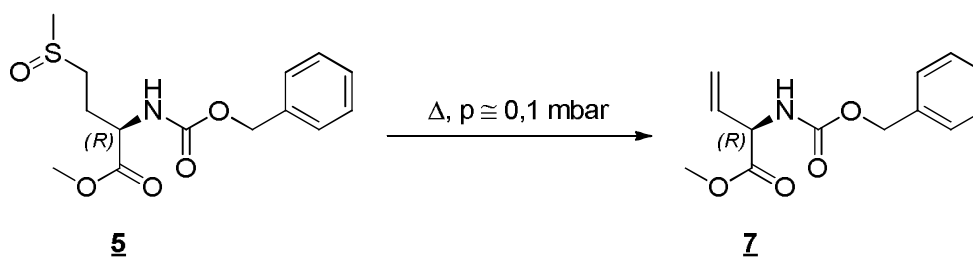
δ [ppm] = 2,12–2,20 (m, 1H, -β-CH_{2A}-),
2,32–2,41 (m, 1H, -β-CH_{2B}-),
2,54 (s, 3H, -SO-CH₃),
2,72–2,79 (m, 2H, -SO-CH₂-),
3,76 (s, 3H, -OCH₃),
4,47–4,51 (m, 1H, -α-CH-),
5,12 (s, 2H, Ar-CH₂-),
5,78–5,87 (m, 1H, -NH-),
7,28–7,37 (m, 5H, Ar-H).

MS (ESI): *m/z* = 314,1 (M + H)⁺; **M_r (izračunano):** 313,37

HRMS (za C₁₄H₂₀NO₅S): 314,1064; izračunano: 314,1062

4.7 SINTEZA METIL (2*R*)-2-[[*(BENZILOKSI)KARBONIL*]AMINO]-3-BUTENOATA (**7**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

Reakcijo smo izvedli z aparaturo Kugelrohr, pri čemer smo uporabili tri zaporedno povezane bučke. V prvo bučko smo natehtali 15,96 g (50,93 mmol) spojine **5** in jo vstavili v pečko aparature, ki je bila segreta na 226 °C. Drugo bučko smo segrevali z žarilno pištolo (~ 400 °C), tretjo pa hladili z ledom. Ob izvajanju reakcije smo bučke rotirali s konstantno hitrostjo in tlak v njih vzdrževali na ~ 0,1 mbar. Reakcijo smo prekinili po 1 uri, ko je v prvi bučki ostala minimalna količina izhodne spojine. Vsebinsko tretje bučke smo očistili s kolonsko kromatografijo z gradientno elucijo (Mf: Hex/EA = 5/1; večanje deleža EA) in dobili 3,85 g spojine **7**.

PRODUKT:

Izgled: rumena oljnata tekočina

Izkoristek: 30,3 %

R_f: 0,42 (Mf: Hex/EA = 2/1)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):

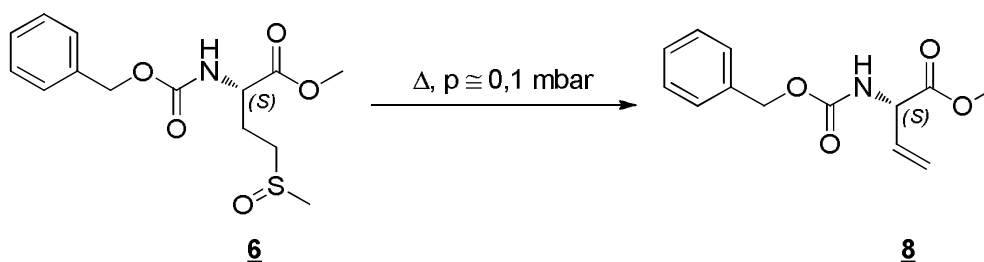
δ [ppm] = 3,77 (s, 3H, -OCH₃),
4,90–5,00 (m, 1H, -α -CH-),
5,14 (s, 2H, Ar-CH₂-),
5,27–5,40 (m, 2H, -CH=CH₂),
5,56 (d, 1H, J = 6,0 Hz, -NH-),
5,86–5,97 (m, 1H, -CH=CH₂),
7,28–7,36 (m, 5H, Ar-H).

MS (ESI): m/z = 250,1 (M + H)⁺; **M_r (izračunano):** 249,26

HRMS (za C₁₃H₁₆NO₄): 250,1075; izračunano: 250,1079

4.8 SINTEZA METIL (2S)-2-[[(BENZILOKSI)KARBONIL]AMINO]-3-BUTENOATA (8)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

Reakcijo smo izvedli z aparaturo Kugelrohr, pri čemer smo uporabili tri zaporedno povezane bučke. V prvo bučko smo natehtali 17,53 g (55,94 mmol) spojine **6** in jo vstavili v pečko aparature, ki je bila segreta na 226 °C. Drugo bučko smo segrevali z žarilno pištolo (~ 400 °C), tretjo pa hladili z ledom. Ob izvajanju reakcije smo bučke rotirali s konstantno hitrostjo in tlak v njih vzdrževali na ~ 0,1 mbar. Reakcijo smo prekinili po 1 uri, ko je v prvi bučki ostala minimalna količina izhodne spojine. Vsebinsko tretje bučke smo očistili s kolonsko kromatografijo (Mf: Hex/EA = 5/1) in dobili 4,63 g spojine **8**.

PRODUKT:

Izgled: rumena oljnata tekočina

Izkoristek: 33,2 %

R_f: 0,42 (Mf: Hex/EA = 2/1)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 3,77 (s, 3H, -OCH₃),

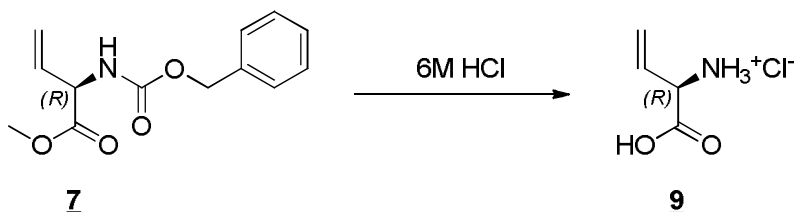
4,90–5,00 (m, 1H, - α -CH-),
5,14 (s, 2H, Ar-CH₂-),
5,27–5,40 (m, 2H, -CH=CH₂),
5,56 (d, 1H, J = 6,0 Hz, -NH-),
5,86–5,97 (m, 1H, -CH=CH₂),
7,28–7,36 (m, 5H, Ar-H).

MS (ESI): $m/z = 250,1 (M + H)^+$; **M_r (izračunano):** 249,26

HRMS (za C₁₃H₁₆NO₄): 250,1076; izračunano: 250,1079

4.9 SINTEZA (1*R*)-1-KARBOKSI-2-PROPEN-1-AMINIJEVEGA KLORIDA (**9**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

V bučko smo zatehtali 1,96 g (7,86 mmol) spojine **7**, dodali 40 mL 6 M raztopine HCl in jo opremili z zračnim hladilnikom ter postavili na oljno kopel s temperaturo 100 °C. Po 2 urah refluktiranja smo s tankoplastno kromatografijo zaznali, da v reakcijski zmesi ni bilo več izhodne spojine. Reakcijo smo prekinili, reakcijsko zmes ohladili ter enkrat ekstrahirali s 25 mL diklorometana. Vodni fazi smo pod znižanim tlakom uparili topilo in dobili 0,942 g spojine **9**.

PRODUKT:

Izgled: okrast prašek

Izkoristek: 87,1 %

R_f: 0,00 (Mf: Hex/EA = 2/1)

Tališče: 176–179 °C; po literaturi: 175–177 °C (90)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):

δ [ppm] = 4,55–4,56 (m, 1H, - α -CH-),
5,45–5,54 (m, 2H, -CH=CH₂),
5,88–5,97 (m, 1H, -CH=CH₂),
8,61 (s, 3H, -NH₃⁺);

*signal za -COOH na spektru ni viden.

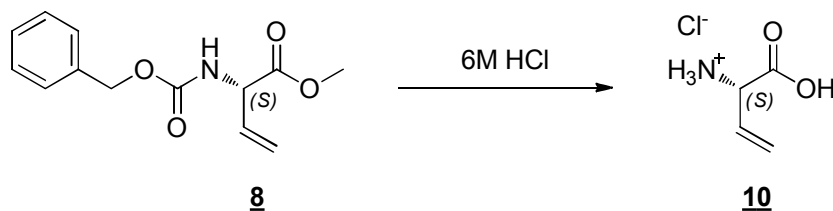
MS (ESI): $m/z = 100,0$ ($M - H - HCl$)⁻; **M_r (izračunano):** 137,56;

M_r (izračunano za $M - HCl$): 101,1

HRMS (za $C_4H_6NO_2$): 100,0404; izračunano: 100,0399

4.10 SINTEZA (1S)-1-KARBOKSI-2-PROPEN-1-AMINIJEVEGA KLORIDA (10)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

V bučko smo zatehtali 2,04 g (8,18 mmol) spojine **8**, dodali 40 mL 6 M raztopine HCl in jo opremili z zračnim hladilnikom ter postavili na oljno kopel s temperaturo 100 °C. Po 90 min refluktiranja smo s tankoplastno kromatografijo zaznali, da v reakcijski zmesi ni bilo več izhodne spojine. Reakcijo smo prekinili, reakcijsko zmes ohladili ter enkrat ekstrahirali z 20 mL diklorometana. Vodni fazi smo pod znižanim tlakom uparili topilo in dobili 0,985 g spojine **10**.

PRODUKT:

Izgled: okrast prašek

Izkoristek: 87,5 %

R_f : 0,00 (Mf: Hex/EA = 2/1)

Tališče: 177–180 °C; po literaturi: 175–177 °C (90)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):

δ [ppm] = 4,54 (s, 1H, - α -CH-),
5,45–5,54 (m, 2H, -CH=CH₂),
5,88–5,97 (m, 1H, -CH=CH₂),
8,64 (s, 3H, -NH₃⁺),
13,98 (s, 1H, -COOH).

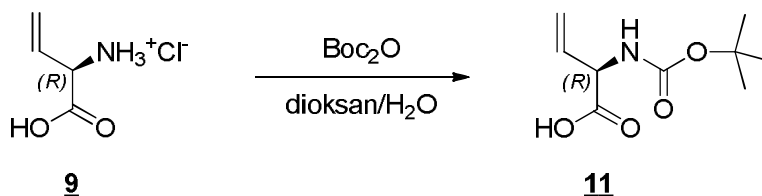
MS (ESI): $m/z = 102,1$ ($M - Cl$)⁺; **M_r (izračunano):** 137,56;

M_r (izračunano za $M - HCl$): 101,1

HRMS (za $C_4H_8NO_2$): 102,0554; izračunano: 102,0555

4.11 SINTEZA (2*R*)-2-[(*TERC*-BUTOKSIKARBONIL)AMINO]-3-BUTENOJSKE KISLINE (**11**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

0,584 g (5,51 mmol) Na₂CO₃ smo raztopili v 16 mL vode in raztopini dodali 0,303 g (2,20 mmol) spojine **9**. Nato smo ob mešanju po kapljicah dodali 0,569 g (2,53 mmol; 97 % reagent) di-*tert*-butil dikarbonata raztopljenega v 8 mL dioksana. Po 3,5 ure smo s tankoplastno kromatografijo zaznali, da v reakcijski zmesi ni bilo več izhodne spojine in reakcijo prekinili. Reakcijski zmesi smo odrotavpirali dioksan, preostanek pa razredčili s 50 mL vode in ekstrahirali z dietil etrom (2 × 30 mL). Vodno fazo smo nakisali do pH 2–3 z 2 M raztopino HCl in jo ekstrahirali z etilacetatom (3 × 40 mL). Združene frakcije etilacetata smo nato sprali s 50 mL nasičene raztopine NaCl in jih posušili z Na₂SO₄. Etilacetat smo uparili pod znižanim tlakom in dobili 0,387 g spojine **11**.

PRODUKT:

Izgled: rumena oljnata tekočina

Izkoristek: 87,3 %

R_f: 0,70 (Mf: CH₃CN/MeOH/H₂O = 3/1/1)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):

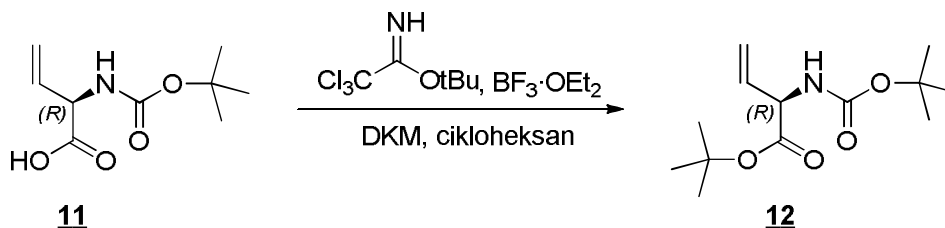
δ [ppm] = 1,38 (s, 9H, -OtBu),
4,50–4,54 (m, 1H, -α -CH-),
5,16–5,32 (m, 2H, -CH=CH₂),
5,84–5,92 (m, 1H, -CH=CH₂),
7,31 (d, 1H, J = 8,0 Hz, -NH-),
12,76 (s, 1H, -COOH).

MS (ESI): m/z = 200,1 (M – H)⁻; **M_r (izračunano):** 201,22

HRMS (za C₉H₁₄NO₄): 200,0924; izračunano: 200,0923

4.12 SINTEZA *TERC*-BUTIL (2*R*)-2-[(*TERC*-BUTOKSIKARBONIL)AMINO]-3-BUTENOATA (**12**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

0,329 g (1,64 mmol) spojine **11** smo raztopili v 5 mL DKM in dodali 0,715 g (3,14 mmol; 96 % reagent) *tert*-butil 2,2,2-trikloroacetimidata raztopljenega v 5 mL cikloheksana ter 65,9 μ L (0,525 mmol) borovega trifluorida dietil eterata. Po 42-ih urah smo reakcijsko zmes nevtralizirali s trdnim NaHCO_3 in dobljeno oborino odnučali s pomočjo presesalne erlenmajerice. Oborino smo zavrgli, filtratu pa pod znižanim tlakom uparili topilo in preostanek očistili s kolonsko kromatografijo (Mf: Hex/EA = 5/1), pri čemer smo dobili 0,290 g spojine **12**.

PRODUKT:

Izgled: rumena oljnata tekočina

Izkoristek: 68,9 %

R_f: 0,50 (Mf: Hex/EA = 5/1)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):

δ [ppm] = 1,47 (s, 9H, -CH-COOtBu),
1,49 (s, 9H, -NH-COOtBu),
4,74–4,78 (m, 1H, - α -CH-),
5,22–5,37 (m, 3H, -NH-*, -CH=CH₂),
5,86–5,94 (m, 1H, -CH=CH₂);

*signal za -NH- je prekrit s signalom protonov vinilne CH₂ skupine (-CH=CH₂).

MS (ESI): $m/z = 258,2$ (M + H)⁺; **M_r (izračunano):** 257,33

HRMS (za C₁₃H₂₄NO₄): 258,1700; izračunano: 258,1705

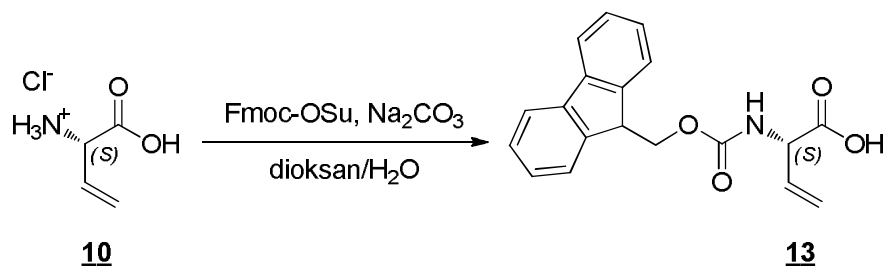
IR (NaCl, cm⁻¹): 3365, 3090, 2979, 2933, 1718, 1499, 1457, 1392, 1368, 1341, 1284, 1251, 1155, 1073, 1052, 1022, 986, 923, 846, 812, 773.

HPLC (metoda A): 94,1 % pri $\lambda = 220$ nm, $t_R = 8,423$ min

$[\alpha]_D^{23}$: + 36,2 ° (c 0,133; DKM)

4.13 SINTEZA (2*S*)-2-[[*(9H*-FLUOREN-9-ILMETOKSI)KARBONIL]AMINO}-3-BUTENOJSKE KISLINE (**13**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

0,698 g (5,07 mmol) spojine **10** smo raztopili v 17 mL 10 % raztopine Na_2CO_3 in ob mešanju po kapljicah dodali 2,17 g (6,30 mmol; 98 % reagent) *N*-(9-fluorenilmetiloksikarboniloksi)sukcinimida raztopljenega v 12 mL dioksana. Po 3,5 ure smo s tankoplastno kromatografijo zaznali, da v reakcijski zmesi ni bilo več izhodne spojine in reakcijo prekinili. Reakcijsko zmes smo razredčili s 100 mL vode in jo ekstrahirali z dietil etrom (3×60 mL). Vodno fazo smo nato z 2 M raztopino HCl nakisali do pH ~ 2, pri čemer je izpadla želatinasta oborina, ki smo jo takoj ekstrahirali s 100 mL etilacetata. Preostalo vodno fazo smo še trikrat ekstrahirali s 100 mL etilacetata in združene frakcije etilacetata sprali s 100 mL nasičene raztopine NaCl ter jih posušili z Na_2SO_4 . Etilacetat smo uparili pod znižanim tlakom in dobili 1,357 g spojine **13**.

PRODUKT:

Izgled: bel prašek

Izkoristek: 82,7 %

R_f: 0,76 (Mf: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 3/1/1$)

Tališče: 145–147 °C

^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6):

δ [ppm] = 4,20–4,30 (m, 3H, $-\text{OCH}_2-\text{CH}-$),
4,59–4,63 (m, 1H, $-\text{NH}-\text{CH}-$),
5,20–5,36 (m, 2H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$),
5,89–5,98 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$),
7,31–7,44 (m, 4H, Ar-H),

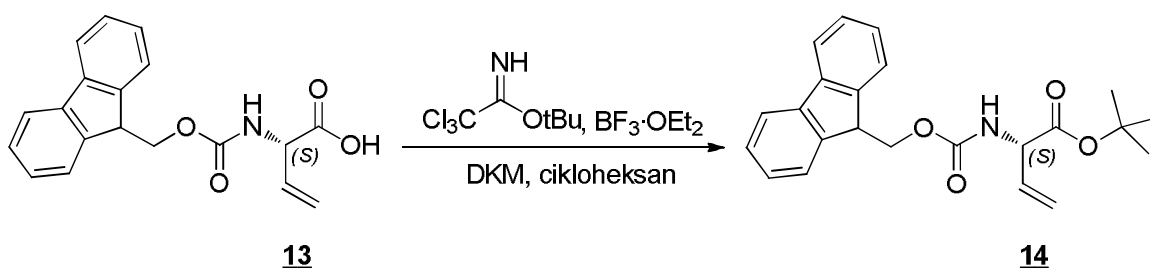
7,73–7,76 (m, 2H, Ar-H),
7,89–7,93 (m, 3H, 2 × Ar-H; -NH-),
12,78 (s, 1H, -COOH).

MS (ESI): $m/z = 324,1 (M + H)^+$; **M_r (izračunano):** 323,34

HRMS (za $C_{19}H_{18}NO_4$): 324,1227; izračunano: 324,1236

4.14 SINTEZA *TERC*-BUTIL (2*S*)-2-[(9*H*-FLUOREN-9-ILMETOKSI)KARBONIL]AMINO}-3-BUTENOATA (**14**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

1,00 g (3,09 mmol) spojine **13** smo raztopili v 10 mL DKM in dodali 1,35 g (5,93 mmol; 96 % reagent) *terc*-butil 2,2,2-trikloroacetimidata raztopljenega v 10 mL cikloheksana ter zmes 5 minut prepihovali z argonom. Nato smo dodali 126 μ L (1,00 mmol) borovega trifluorida dietil eterata in pustili reakcijo potekati v argonovi atmosferi. Po 24-ih urah smo reakcijsko zmes nevtralizirali s trdnim NaHCO_3 in dobljeno oborino odnučali s pomočjo presesalne erlenmajerice. Oborino smo zavrgli, filtratu pa pod znižanim tlakom uparili topilo in preostanek očistili s kolonsko kromatografijo (Mf: Hex/EA = 5/1), pri čemer smo dobili 0,904 g spojine **14**.

PRODUKT:

Izgled: rumenkasta trdna snov

Izkoristek: 77,0 %

R_f : 0,75 (Mf: Hex/EA = 1/1)

Tališče: 80–84 °C

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 1,41 (s, 9H, -OtBu),
4,16 (t, 1H, $J = 7,2$ Hz, -OCH₂-CH-),
4,33–4,36 (m, 2H, -OCH₂-CH-),
4,74–4,76 (m, 1H, -NH-CH-),

5,16–5,29 (m, 2H, -CH=CH₂),
5,41 (d, 1H, J = 6,0 Hz, -NH-),
5,79–5,90 (m, 1H, -CH=CH₂),
7,19–7,27 (m, 2H, Ar-H),
7,31–7,36 (m, 2H, Ar-H),
7,53–7,55 (m, 2H, Ar-H),
7,68–7,71 (m, 2H, Ar-H).

MS (ESI): $m/z = 380,2$ (M + H)⁺; **M_r (izračunano):** 379,45

HRMS (za C₂₃H₂₆NO₄): 380,1855; izračunano: 380,1862

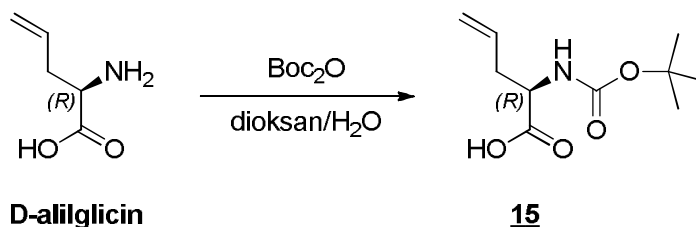
IR (NaCl, cm⁻¹): 3336, 2978, 1718, 1517, 1450, 1369, 1339, 1247, 1155, 1083, 990, 930, 844, 810, 759, 740.

HPLC (metoda A): 96,6 % pri $\lambda = 220$ nm, $t_R = 16,306$ min

[α]_D²³: -100,0 ° (c 0,122; DKM)

4.15 SINTEZA (2R)-2-[(*TERC*-BUTOKSIKARBONIL)AMINO]-4-PENTENOJSKE KISLINE (**15**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

0,553 g (5,22 mmol) Na₂CO₃ smo raztopili v 20 mL vode in raztopini dodali 0,300 g (2,61 mmol) D-alilglicina. Nato smo ob mešanju po kapljicah dodali 0,676 g (3,00 mmol; 97 % reagent) di-*terc*-butil dikarbonata raztopljenega v 10 mL dioksana. Po 4-ih urah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali, da v reakcijski zmesi ni bilo več izhodne spojine in reakcijo prekinili. Reakcijsko zmes smo razredčili s 50 mL vode in jo ekstrahirali z dietil etrom (2 × 30 mL). Vodno fazo smo nato z 2 M raztopino HCl nakisali do pH 2–3 in nakisano vodno fazo ekstrahirali z etilacetatom (3 × 40 mL). Združene frakcije etilacetata smo sprali s 50 mL nasičene raztopine NaCl in posušili z Na₂SO₄. Po uparitvi topila smo dobili 0,552 g spojine **15**.

PRODUKT:

Izgled: brezbarvna oljnata tekočina

Izkoristek: 98,4 %

R_f: 0,78 (Mf: CH₃CN/MeOH/H₂O = 3/1/1)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):

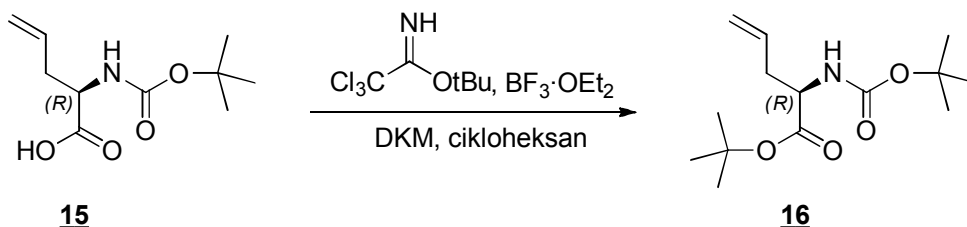
δ [ppm] = 1,38 (s, 9H, -OtBu),
2,28–2,44 (m, 2H, -CH₂-),
3,90–3,96 (m, 1H, -α -CH-),
5,02–5,12 (m, 2H, -CH=CH₂),
5,72–5,82 (m, 1H, -CH=CH₂),
7,05 (d, 1H, J = 8,0 Hz, -NH-),
12,53 (s, 1H, -COOH).

MS (ESI): m/z = 214,1 (M – H)⁻; **M_r (izračunano):** 215,25

HRMS (za C₁₀H₁₆NO₄): 214,1079; izračunano: 214,1084

4.16 SINTEZA *TERC*-BUTIL (2*R*)-2-[(*TERC*-BUTOKSIKARBONIL)AMINO]-4-PENTENOATA (**16**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

0,552 g (2,56 mmol) spojine **15** smo raztopili v 20 mL DKM in dodali 1,17 g (5,14 mmol; 96 % reagent) *terc*-butil 2,2,2-trikloroacetimidata raztopljenega v 15 mL cikloheksana ter 104 μL (0,828 mmol) borovega trifluorida dietil eterata. Ker je bila v času izvajanja te reakcije v digestoriju temperatura le 10 °C, smo reakcijsko zmes postavili na oljno kopel in njeno temperaturo nastavili na 20 °C. Po ~ 30-ih urah smo reakcijo prekinili, reakcijsko zmes nevtralizirali s trdnim NaHCO₃ in dobljeno oborino odnučali s pomočjo presesalne erlenmajerice. Oborino smo zavrgli, filtratu pa pod znižanim tlakom uparili topilo in preostanek očistili s kolonsko kromatografijo (Mf: Hex/EA = 5/1), pri čemer smo dobili 0,356 g spojine **16**.

PRODUKT:

Izgled: brezbarvna oljnata tekočina

Izkoristek: 51,2 %

R_f: 0,67 (Mf: Hex/EA = 2/1)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 1,44 (s, 9H, -CH-COOtBu),
1,46 (s, 9H, -NH-COOtBu),
2,42–2,53 (m, 2H, -CH₂-),
4,23–4,28 (m, 1H, -α -CH-),
5,04 (d, 1H, J = 8,0 Hz, -NH-),
5,10–5,14 (m, 2H, -CH=CH₂),
5,65–5,76 (m, 1H, -CH=CH₂).

MS (ESI): m/z = 272,2 (M + H)⁺; **M_r (izračunano):** 271,35

HRMS (za C₁₄H₂₆NO₄): 272,1855; izračunano: 272,1862

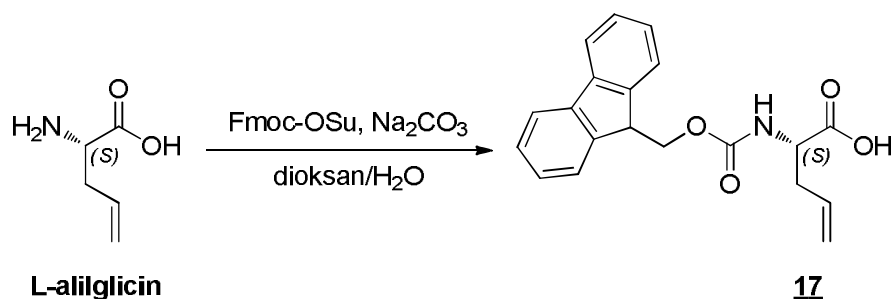
IR (NaCl, cm⁻¹): 3367, 2978, 2932, 1718, 1499, 1391, 1366, 1251, 1154, 1059, 1022, 918, 847.

HPLC (metoda A): 95,3 % pri λ = 210 nm, t_R = 10,303 min

[α]_D²³: - 117,9 ° (c 0,112; DKM)

4.17 SINTEZA (2S)-2-[[*(9H*-FLUOREN-9-ILMETOKSI)KARBONIL]AMINO}-4-PENTENOJSKE KISLINE (17**)**

REAKCIJA:



POSTOPEK:

0,207 g (1,95 mmol) Na₂CO₃ smo raztopili v 4 mL vode in raztopini dodali 0,100 g (0,869 mmol) L-alilglicina. Nato smo ob mešanju po kapljicah dodali 0,380 g (1,10 mmol; 98 % reagent) *N*-(9-fluorenilmetiloksid)karboniloksi)sukcinimida raztopljenega v 4 mL dioksana. Po 90-ih minutah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali, da v reakcijski

zmesi ni bilo več izhodne spojine in reakcijo prekinili. Reakcijsko zmes smo razredčili s 70 mL vode in jo ekstrahirali z dietil etrom (3 × 30 mL). Vodno fazo smo nato nakisali do pH ~ 2 z 2 M raztopino HCl in jo ekstrahirali z etilacetatom (3 × 40 mL). Združene frakcije etilacetata smo sprali s 50 mL nasičene raztopine NaCl ter jih posušili z Na₂SO₄. Etilacetat smo uparili pod znižanim tlakom in dobili 0,273 g spojine **17**.

PRODUKT:

Izgled: rumenkasta trdna snov

Izkoristek: 93,2 %

R_f: 0,78 (Mf: CH₃CN/MeOH/H₂O = 3/1/1)

Tališče: 124–125 °C; po literaturi: 120–122 °C (92); 134–135 °C (93)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):

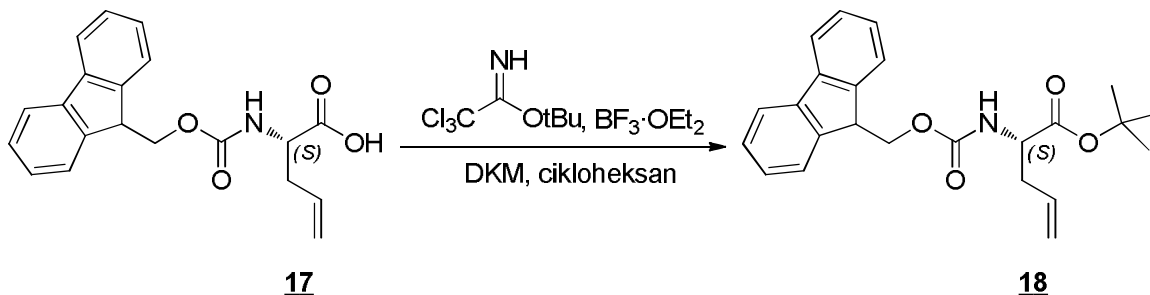
δ [ppm] = 2,32–2,40 (m, 2H, -β-CH₂-),
3,98–4,04 (m, 1H, -NH-CH-),
4,20–4,29 (m, 3H, -OCH₂-CH-),
5,03–5,13 (m, 2H, -CH=CH₂),
5,73–5,83 (m, 1H, -CH=CH₂),
7,31–7,44 (m, 4H, Ar-H),
7,66 (d, 1H, J = 8,0 Hz, -NH-),
7,72 (d, 2H, J = 7,6 Hz, Ar-H),
7,89 (d, 2H, J = 7,2 Hz, Ar-H),
12,61 (s, 1H, -COOH).

MS (ESI): m/z = 336,1 (M – H)⁻; **M_r (izračunano):** 337,37

HRMS (za C₂₀H₁₈NO₄): 336,1237; izračunano: 336,1236

4.18 SINTEZA *TERC*-BUTIL (2*S*)-2-[(9*H*-FLUOREN-9-ILMETOKSI)KARBONILAMINO]-4-PENTENOATA (**18**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

0,243 g (0,720 mmol) spojine **17** smo raztopili v 6 mL DKM in dodali 0,328 g (1,44 mmol; 96 % reagent) *tert*-butil 2,2,2-trikloroacetimidata raztopljenega v 3 mL cikloheksana ter 28,9 μ L (0,230 mmol) borovega trifluorida dietil eterata. Po 67-ih urah smo reakcijsko zmes nevtralizirali s trdnim NaHCO₃ in dobljeno oborino odnučali s pomočjo presesalne erlenmajerice. Oborino smo zavrgli, filtratu pa pod znižanim tlakom uparili topilo in preostanek očistili s kolonsko kromatografijo (Mf: Hex/EA = 5/1), pri čemer smo dobili 0,198 g spojine **18**.

PRODUKT:

Izgled: rumenkasta oljnata tekočina

Izkoristek: 69,9 %

R_f: 0,66 (Mf: Hex/EA = 1/1)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 1,51 (s, 9H, -OtBu),
2,50–2,66 (m, 2H, - β -CH₂-),
4,26 (t, 1H, J = 7,2 Hz, -NH-CH-),
4,36–4,51 (m, 3H, -OCH₂-CH-),
5,15–5,19 (m, 2H, -CH=CH₂),
5,40 (d, 1H, J = 8,0 Hz, -NH-),
5,70–5,80 (m, 1H, -CH=CH₂),
7,32–7,38 (m, 2H, Ar-H),
7,41–7,46 (m, 2H, Ar-H),
7,62–7,66 (m, 2H, Ar-H),
7,79 (d, 2H, J = 8,8 Hz, Ar-H).

MS (ESI): m/z = 394,2 (M + H)⁺; **M_r (izračunano):** 393,48

HRMS (za C₂₄H₂₈NO₄): 394,2007; izračunano: 394,2018

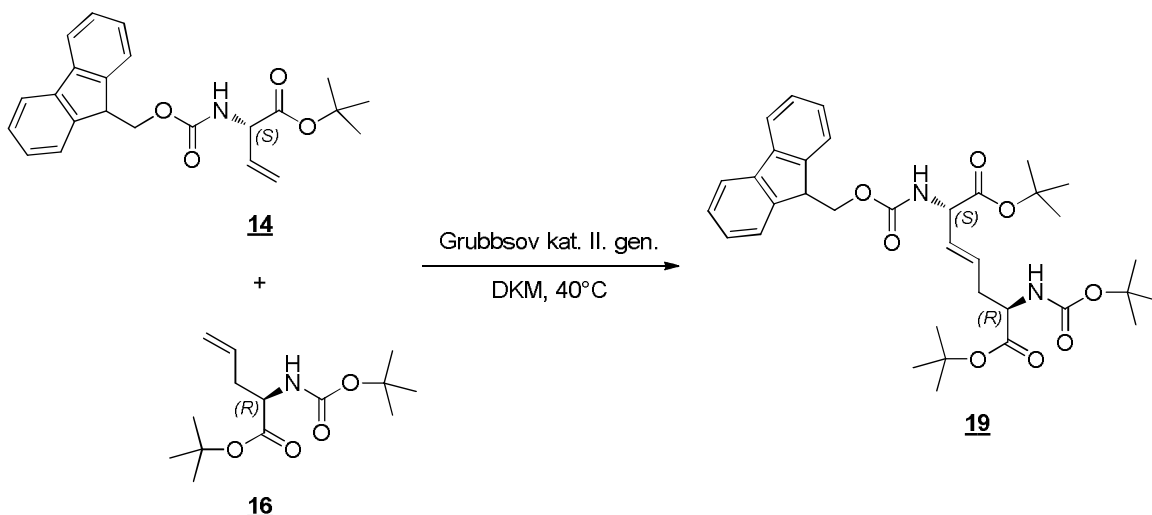
IR (NaCl, cm⁻¹): 3336, 2977, 1718, 1517, 1350, 1226, 1155, 1049, 740.

HPLC (metoda A): 95,1 % pri λ = 210 nm, t_R = 18,194 min

[α]_D²³: + 93,8 ° (c 0,117; DKM)

4.19 SINTEZA DI-(*TERC*-BUTIL) (2*S*,3*E*,6*R*)-6-[(*TERC*-BUTOKSIKARBONIL) AMINO]-2-[[9*H*-FLUOREN-9-ILMETOKSI]KARBONIL]AMINO}-3-HEPTENDIOATA (**19**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

V dvogrlo bučko smo zatehtali 0,074 g (0,087 mmol) Grubbsovega katalizatorja II. generacije in jo takoj prepihali z argonom. Bučko smo nato opremili z vodnim hladilnikom in vse skupaj še enkrat prepihali z argonom. 0,237 g (0,873 mmol) spojine **16** in 0,583 g (1,54 mmol) spojine **14** smo raztopili v 12 mL destiliranega DKM, raztopino prepihali z argonom in jo z injekcijo prenesli v dvogrlo bučko. Vsebino dvogrle bučke smo ponovno prepihali z argonom in jo nato postavili na oljno kopel ter reakcijo pustili potekati 20 ur pri 40 °C v argonovi atmosferi. Po 20-ih urah smo reakcijski zmesi pod znižanim tlakom uparili topilo in preostanek očistili s kolonsko kromatografijo z gradientno elucijo (Mf: Hex/EA = 9/1; večanje deleža EA) ter dobili 0,118 g spojine **19**.

PRODUKT:

Izgled: okrasta oljnata tekočina

Izkoristek: 21,7 %

R_f: 0,22 (Mf: Hex/EA = 5/1)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 1,46–1,51 (m, 27H, 3 × -COOtBu),
2,44–2,61 (m, 2H, -CH=CH-CH₂-),
4,23–4,31 (m, 2H, =CH-CH₂-CH-, -O-CH₂-CH-),
4,36–4,45 (m, 2H, -O-CH₂-),

4,76–4,79 (m, 1H, -CH=CH-CH-),
5,04–5,07 (m, 1H, -NH-Boc),
5,47–5,51 (m, 1H, -NH-Fmoc),
5,58–5,72 (m, 2H, -CH=CH-),
7,32–7,36 (m, 2H, Ar-H),
7,41–7,45 (m, 2H, Ar-H),
7,62–7,64 (m, 2H, Ar-H),
7,79 (d, 2H, J = 7,6 Hz, Ar-H).

MS (ESI): $m/z = 623,3 (M + H)^+$; **M_r (izračunano):** 622,75

HRMS (za $C_{35}H_{47}N_2O_8$): 623,3324; izračunano: 623,3332

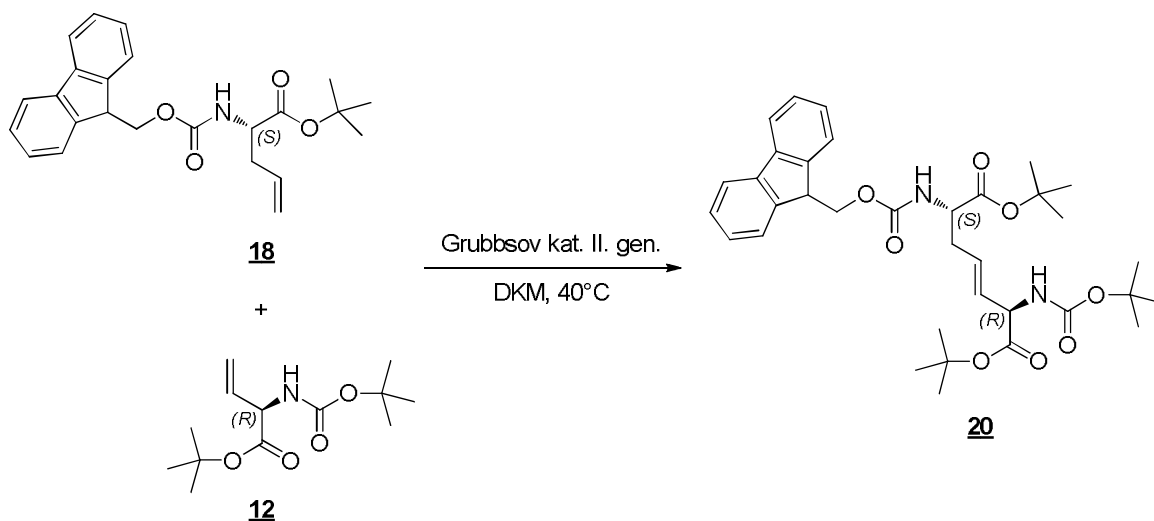
IR (NaCl, cm^{-1}): 3342, 2977, 2362 1716, 1506, 1367, 1249, 1154, 1049, 846, 740.

HPLC (metoda B): 94,7 % pri $\lambda = 254$ nm, $t_R = 30,142$ min

$[\alpha]_D^{23}$: $-91,2^\circ$ (c 0,114; DKM)

4.20 SINTEZA DI-(*TERC*-BUTIL) (2*R*,3*E*,6*S*),-2-[(*TERC*-BUTOKSIKARBONIL)AMINO]-6-[[9*H*-FLUOREN-9-ILMETOKSI]KARBONIL]AMINO}-3-HEPTENDIOATA (**20**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

V dvogrlo bučko smo zatehtali 0,074 g (0,087 mmol) Grubbsovega katalizatorja II. generacije in jo takoj prepihali z argonom. Bučko smo nato opremili z vodnim hladilnikom in vse skupaj še enkrat prepihali z argonom. 0,343 g (0,872 mmol) spojine **18** in 0,395 g (1,53 mmol) spojine **12** smo raztopili v 12 mL destiliranega DKM, raztopino

prepihali z argonom in jo z injekcijo prenesli v dvogrlo bučko. Vsebino dvogrle bučke smo ponovno prepihali z argonom in jo nato postavili na oljno kopel ter reakcijo pustili potekati 20 ur pri 40 °C v argonovi atmosferi. Po 20-ih urah smo reakcijski zmesi pod znižanim tlakom uparili topilo in preostanek očistili s kolonsko kromatografijo z gradientno elucijo (Mf: Hex/EA = 9/1; večanje deleža EA) ter dobili 0,162 g spojine **20**.

PRODUKT:

Izgled: okrasta oljnata tekočina

Izkoristek: 29,8 %

R_f: 0,14 (Mf: Hex/EA = 5/1)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 1,45 (s, 27H, 3 × -COOtBu),
2,54–2,59 (m, 2H, -CH=CH-CH₂-),
4,22 (t, 1H, J = 7,2 Hz, -O-CH₂-CH-),
4,35–4,38 (m, 3H, -O-CH₂-CH-, =CH-CH₂-CH-),
4,67–4,72 (m, 1H, -CH=CH-CH-),
5,19 (d, 1H, J = 7,6 Hz, -NH-Fmoc),
5,40 (d, 1H, J = 7,6 Hz, -NH-Boc),
5,61–5,66 (m, 2H, -CH=CH-),
7,30–7,34 (m, 2H, Ar-H),
7,38–7,42 (m, 2H, Ar-H),
7,60–7,62 (m, 2H, Ar-H),
7,75–7,77 (m, 2H, Ar-H).

MS (ESI): m/z = 623,3 (M + H)⁺; **M_r (izračunano):** 622,75

HRMS (za C₃₅H₄₇N₂O₈): 623,3322; izračunano: 623,3332

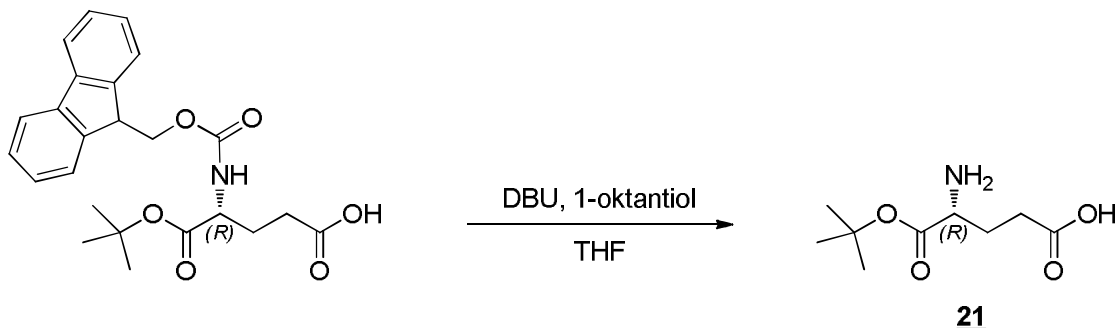
IR (NaCl, cm⁻¹): 3345, 2978, 1717, 1507, 1368, 1251, 1153, 1049, 845, 760, 737.

HPLC (metoda B): 95,9 % pri λ = 254 nm, t_R = 30,161 min

[α]_D²³: – 102,2 ° (c 0,121; DKM)

4.21 SINTEZA (4*R*)-4-AMINO-5-*TERC*-BUTOKSI-5-OKSOPENTANOJSKE KISLINE (21)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

0,200 g (0,470 mmol) (*R*)-4-[[[(9*H*-fluoren-9-il)metoksi]karbonilamino]-5-*terc*-butoksi-5-oksopentanojske kisline smo raztopili v 5 mL THF in najprej dodali 0,709 g (4,70 mmol; 97 % reagent) 1-oktantiola ter nato še 14,4 μ L (0,0944 mmol; 98 % reagent) DBU. Po 22-ih urah s tankoplastno kromatografijo nismo več zaznali izhodne spojine, zato smo uparili topilo in nastali gosti gel triturirali z dietil etrom. Izpadla je bela oborina, ki smo jo sprali z zmesjo Et₂O/Hex = 1/2 in tako dobili 0,090 g spojine **21**.

PRODUKT:

Izgled: bel prašek

Izkoristek: 94,2 %

R_f: 0,49 (Mf: CH₃CN/MeOH/H₂O = 3/1/1)

Tališče: 114–116 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):

δ [ppm] = 1,42 (s, 9H, -OtBu),
1,57–1,63 (m, 1H, -CH_{2A}-CH-NH₂),
1,77–1,82 (m, 1H, -CH_{2B}-CH-NH₂),
2,27 (t, 1H, J = 8,0 Hz, -CH₂-COOH),
3,23–3,27 (m, 1H, -CH-);

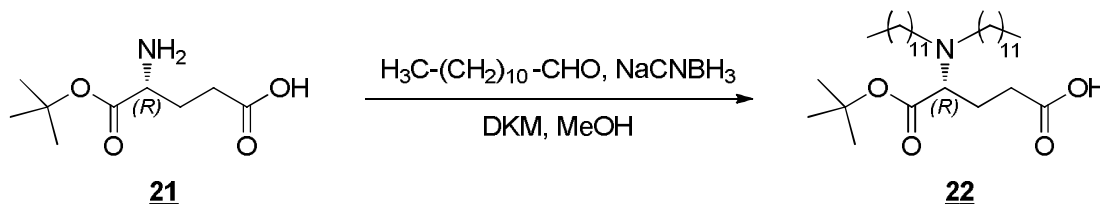
*signala za -NH₂ in -COOH na spektru nista vidna.

MS (ESI): m/z = 204,1 (M + H)⁺; **M_r (izračunano):** 203,24

HRMS (za C₉H₁₈NO₄): 204,1228; izračunano: 204,1236

4.22 SINTEZA (4*R*)-5-*TERC*-BUTOKSI-4-(DIDODECILAMINO)-5-OKSOPENTANOJSKE KISLINE (22)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

0,061 g (0,30 mmol) spojine **21** smo raztopili v 10 mL destiliranega DKM in dodali 5 mL metanola. Nato smo dodali 0,144 g (0,719 mmol; 92 % reagent) dodecil aldehida, 4 kapljice očetne kisline in na koncu še 0,048 g (0,73 mmol; 95 % reagent) NaCNBH₃. Reakcijo smo pustili potekati 18 ur, nakar smo reakcijski zmesi pod znižanim tlakom uparili topilo in preostanek očistili s kolonsko kromatografijo (Mf: Hex/EA = 4/1 (500ml) + 1 %o trietilamina) ter dobili 0,098 g spojine **22**.

PRODUKT:

Izgled: brezbarvna oljnata tekočina

Izkoristek: 60,5 %

R_f: 0,24 (Mf: Hex/EA = 3/1)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):

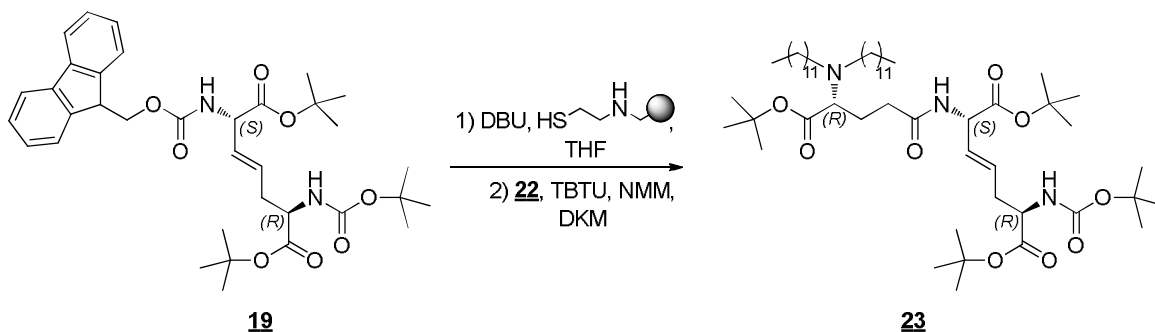
δ [ppm] = 0,84–0,87 (m, 6H, 2 × -CH₂-CH₃),
1,24 (s, 40H, 2 × -CH₂-(CH₂)₁₀-CH₃),
1,41 (s, 9H, -OtBu),
1,62–1,66 (m, 1H, -CH_{2A}-CH-COOtBu),
1,72–1,77 (m, 1H, -CH_{2B}-CH-COOtBu),
2,17–2,43 (m, 6H, -CH₂-COOH, 2 × -CH₂-N-),
3,18–3,22 (m, 1H, -CH-)
12,03 (s, 1H, -COOH).

MS (ESI): *m/z* = 538,5 (M – H)⁻; **M_r (izračunano):** 539,87

HRMS (za C₃₃H₆₆NO₄): 540,5003; izračunano: 540,4992

4.23 SINTEZA TRI-*TERC*-BUTIL (6*R*,8*E*,10*S*,15*R*)-16-DODECIL-2,2-DIMETIL-4,12-DIOKSO-3-OKSA-5,11,16-TRIAZA-8-OKTAKOZEN-6,10,15-TRIKARBOKSILATA (23)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

V bučki smo v 4 mL THF suspendirali 0,618 g (0,803 mmol; ~ 1,3 mmol/g) *N*-(2-merkaptetil)aminometil-polistirena in ga pustili mešati 30 minut, da se je dobro omočil. Nato smo dodali 0,050 g (0,080 mmol) spojine 19 in 12,4 μ L (0,0813 mmol; 98 % reagent) DBU. Vzporedno smo v drugi bučki pripravili aktivirano spojino 22. 0,043 g (0,080 mmol) spojine 22 smo raztopili v 3 mL DKM in dodali 0,027 g (0,082 mmol; 97 % reagent) TBTU ter 17,9 μ L (0,161 mmol; 99 % reagent) *N*-metilmorfolina. Ko smo s tankoplastno kromatografijo zaznali, da v prvi bučki več ni bilo izhodne spojine (po 40-ih minutah), smo iz prve reakcijske zmesi s pomočjo presesalne erlenmajerice odnučali nastali adukt *N*-(2-mekaptoetil)aminometil-polistirena z dibenzofulvenom in filtrat dodali k vsebini druge bučke. Novo reakcijo smo pustili potekati 18 ur, pri čemer smo po 2 urah dodali še 10 μ L (0,090 mmol; 99 % reagent) *N*-metilmorfolina. Po 18-ih urah smo reakcijski zmesi pod znižanim tlakom uparili topilo in preostanek očistili s kolonsko kromatografijo z gradientno elucijo (Mf: Hex/EA = 6/1; večanje deleža EA), pri čemer smo dobili 0,018 g spojine 23.

PRODUKT:

Izgled: brezbarvna oljnata tekočina

Izkoristek: 24,3 %

R_f: 0,40 (Mf: Hex/EA = 3/1)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 0,88 (t, 6H, J = 6,8 Hz, 2 \times -CH₂-CH₃),
1,25 (s, 40H, 2 \times -CH₂-(CH₂)₁₀-CH₃),

1,43–1,48 (m, 36H, 4 × -COOtBu),
1,78–1,88 (m, 1H, -CH_{2A}-CH₂-CO-NH-),
1,94–2,03 (m, 1H, -CH_{2B}-CH₂-CO-NH-),
2,20–2,60 (m, 8H, -CH₂-CO-NH-, -CH=CH-CH₂-, 2 × -CH₂-N-),
3,19–3,25 (m, 1H, -CH-CH₂-CH₂-CO-NH-),
4,21–4,25 (m, 1H, =CH-CH₂-CH-),
4,92–4,95 (m, 1H, -CH=CH-CH-),
5,00–5,02 (m, 1H, -NH-Boc),
5,50–5,66 (m, 2H, -CH=CH-),
6,18–6,20 (d, 1H, J = 7,6 Hz, -CH₂-CO-NH-).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 14,1; 22,7; 25,3; 27,4; 28,0; 28,3; 29,1; 29,4; 29,6; 29,8; 31,9; 35,3; 51,2;
54,2; 54,4; 63,0; 79,7; 82,0; 82,5; 128,0; 129,2; 155,2; 169,8; 170,8;
172,4.

MS (ESI): m/z = 922,7 (M + H)⁺; **M_r (izračunano):** 922,37

HRMS (za C₅₃H₁₀₀N₃O₉): 922,7445; izračunano: 922,7460

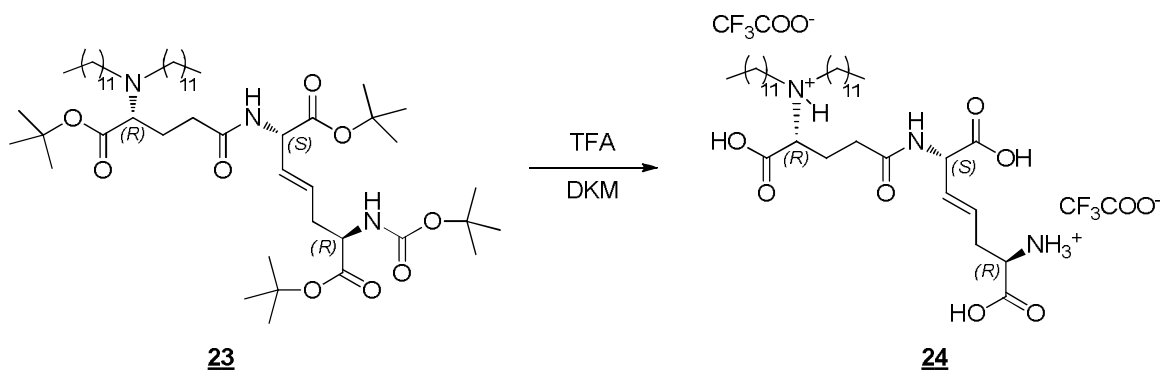
IR (NaCl, cm⁻¹): 3356, 2924, 2853, 2360, 1718, 1507, 1368, 1253, 1154.

HPLC (metoda A): 91,7 % pri λ = 220 nm, t_R = 13,429 min

[α]_D²³: + 110,0 ° (c 0,100; DKM)

4.24 SINTEZA *N*-{*(1R)*-4-[(*1S,2E,5R*)-5-AMONIO-1,5-DIKARBOKSI-2-PENTENILAMINO]-1-KARBOKSI-4-OKSOBUTIL}-*N*-DODECILDODEKAN-1-AMINIJEVEGA DI-2,2,2-TRIFLUOROACETATA (24)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

0,025 g (0,027 mmol) spojine **23** smo raztopili v 2 mL DKM in raztopino ohladili na 0 °C. Ob mešanju smo po kapljicah dodali 2 mL TFA in reakcijo pustili potekati pri sobni temperaturi. Po 4-ih urah smo s tankoplastno kromatografijo zaznali, da ni bilo več izhodne spojine, zato smo reakcijo prekinili. DKM smo uparili pod znižanim tlakom, produkt štirikrat triturali z dietil etrom in dobili 0,022 g spojine **24**.

PRODUKT:

Izgled: rumenkasta oljnata tekočina

Izkoristek: 92,0 %

R_f: 0,51 (Mf: CH₃CN/MeOH/H₂O = 3/1/1)

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 0,90 (t, 6H, J = 6,8 Hz, 2 × -CH₂-CH₃),
1,30–1,28 (m, 36H, 2 × -CH₂-CH₂-(CH₂)₉-CH₃),
1,75 (s, 4H, 2 × -CH₂-CH₂-(CH₂)₉-CH₃),
2,16–2,21 (m, 1H, -CH_{2A}-CH₂-CO-NH-),
2,26–2,29 (m, 1H, -CH_{2B}-CH₂-CO-NH-),
2,66–2,72 (m, 4H, -CH₂-CO-NH-, -CH=CH-CH₂-),
3,19–3,25 (m, 4H, 2 × -CH₂-NH⁺),
4,06–4,07 (m, 2H, -CH-NH⁺-, -CH-NH₃⁺),
5,65–5,92 (m, 2H, -CH=CH-);

*na spektru niso vidni signali za 3 × -COOH, -NH₃⁺, -NH⁺- ter -CO-NH-; signal za -CH-CH=CH- je prekrit s signalom za vodo.

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 14,4; 23,7; 25,5; 27,6; 28,2; 30,2; 30,5; 30,6; 30,8; 33,1; 53,4; 53,5; 53,6;
55,5; 116,7; 131,4; 131,6; 171,3; 173,1; 174,2.

MS (ESI): m/z = 654,5 (M + H – 2 × CF₃COOH)⁺; **M_r (izračunano):** 881,98;

M_r (izračunano za M – 2 × CF₃COOH): 653,93

HRMS (za C₃₆H₆₈N₃O₇): 654,5060; izračunano: 654,5057

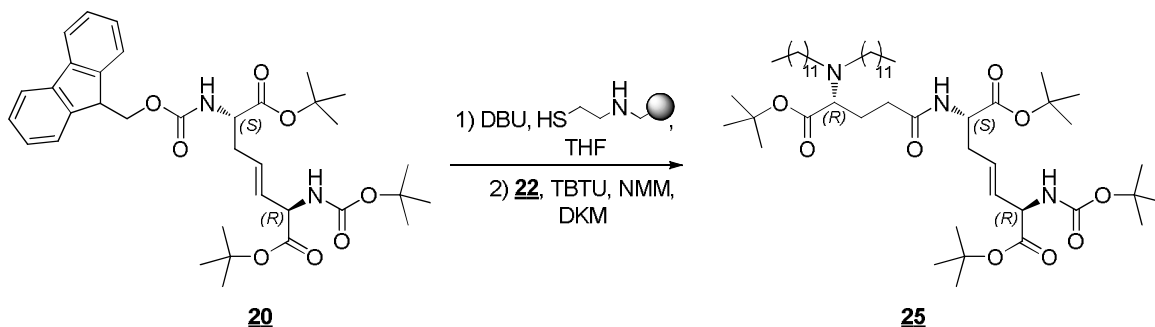
IR (NaCl, cm⁻¹): 1643.

HPLC (metoda C): 95,1 % pri λ = 220 nm, t_R = 23,580 min

[α]_D²³: + 30,9 ° (c 0,091; metanol)

4.25 SINTEZA TRI-*TERC*-BUTIL (6*R*,7*E*,10*S*,15*R*)-16-DODECIL-2,2-DIMETIL-4,12-DIOKSO-3-OKSA-5,11,16-TRIAZA-7-OKTAKOZEN-6,10,15-TRIKARBOKSILATA (**25**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

V bučki smo v 4 mL THF suspendirali 0,865 g (1,12 mmol; ~ 1,3 mmol/g) *N*-(2-merkptoetil)aminometil-polistirena in ga pustili mešati 30 minut, da se je dobro omočil. Nato smo dodali 0,070 g (0,11 mmol) spojine **20** in 17,3 μ L (0,113 mmol; 98 % reagent) DBU ter po 1 uri poteka reakcije še enkrat 17,3 μ L (0,113 mmol; 98 % reagent) DBU. Vzporedno smo v drugi bučki pripravili aktivirano spojino **22**. 0,061 g (0,11 mmol) spojine **22** smo raztopili v 2 mL DKM in dodali 0,047 g (0,14 mmol; 97 % reagent) TBTU ter 25,0 μ L (0,225 mmol; 99 % reagent) *N*-metilmorfolina. Ko smo s tankoplastno kromatografijo zaznali, da v prvi bučki več ni bilo izhodne spojine (po 75-ih minutah), smo iz prve reakcijske zmesi s pomočjo presesalne erlenmajerice odnučali nastali adukt *N*-(2-mekaptoetil)aminometil-polistirena z dibenzofulvenom in filtrat dodali k vsebini druge bučke. Po 23-ih urah smo reakcijski zmesi pod znižanim tlakom uparili topilo in preostanek očistili s kolonsko kromatografijo (Mf: Hex/EA = 5/1), pri čemer smo dobili 0,054 g spojine **25**.

PRODUKT:

Izgled: brezbarvna oljnata tekočina

Izkoristek: 52,1 %

R_f: 0,43 (Mf: Hex/EA = 3/1)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 0,88 (t, 6H, J = 6,8 Hz, 2 \times -CH₂-CH₃),
1,25 (s, 40H, 2 \times -CH₂-(CH₂)₁₀-CH₃),
1,44–1,46 (m, 36H, 4 \times -COOtBu),

1,73–1,87 (m, 1H, $-\underline{\text{CH}}_{2\text{A}}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$),
1,93–2,05 (m, 1H, $-\underline{\text{CH}}_{2\text{B}}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$),
2,16–2,31 (m, 2H, $-\underline{\text{CH}}_2-\text{CO}-\text{NH}-$),
2,41–2,47 (m, 2H, $-\text{CH}=\text{CH}-\underline{\text{CH}}_2-$),
2,52–2,60 (m, 4H, $2 \times -\underline{\text{CH}}_2-\text{N}-$),
3,21–3,25 (m, 1H, $-\underline{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$),
4,51–4,55 (m, 1H, $=\text{CH}-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}}-$),
4,67 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}-\underline{\text{CH}}-$),
5,15–5,17 (d, 1H, $J = 8 \text{ Hz}$, $-\underline{\text{NH}}-\text{Boc}$),
5,54–5,65 (m, 2H, $-\underline{\text{CH}}=\underline{\text{CH}}-$),
6,04–6,10 (m, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CO}-\underline{\text{NH}}-$).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD):

δ [ppm] = 14,1; 22,7; 25,3; 27,4; 28,0; 28,2; 28,3; 29,1; 29,7; 31,9; 32,9; 35,1; 51,2;
52,0; 55,5; 62,9; 80,6; 82,2; 82,3; 126,8; 129,4; 154,9; 169,9; 170,6;
172,3.

MS (ESI): $m/z = 922,8$ ($\text{M} + \text{H}^+$); **M_r (izračunano):** 922,37

HRMS (za $\text{C}_{53}\text{H}_{100}\text{N}_3\text{O}_9$): 922,7500; izračunano: 922,7460

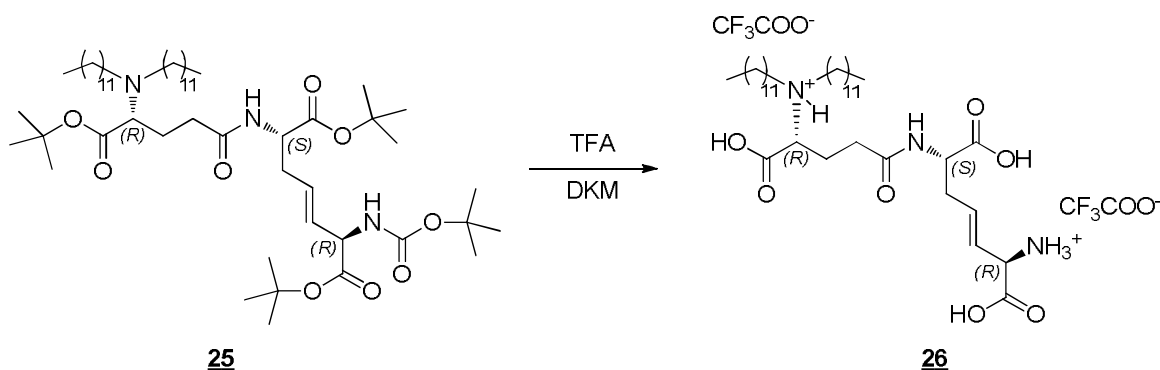
IR (NaCl, cm^{-1}): 2925, 2363, 1720, 1507, 1154.

HPLC (metoda A): 95,4 % pri $\lambda = 220 \text{ nm}$, $t_R = 18,061 \text{ min}$

$[\alpha]_D^{23}$: $-318,1^\circ$ (c 0,111; DKM)

4.26 SINTEZA *N*-{(1*R*)-4-[(1*S*,3*E*,5*R*)-5-AMONIO-1,5-DIKARBOKSI-3-PENTENILAMINO]-1-KARBOKSI-4-OKSOBUTIL}-*N*-DODECILDODEKAN-1-AMINIJEVEGA DI-2,2,2-TRIFLUOROACETATA (26)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

0,050 g (0,054 mmol) spojine **25** smo raztopili v 3 mL DKM in raztopino ohladili na 0 °C. Ob mešanju smo po kapljicah dodali 3 mL TFA in reakcijo pustili potekati 22 ur pri sobni temperaturi. Ko smo s tankoplastno kromatografijo potrdili, da v reakcijski zmesi ni bilo več izhodne spojine, smo pod nižanim tlakom uparili DKM, produkt triturali trikrat z dietil etrom in enkrat s petroletrom ter dobili 0,041 g spojine **26**.

PRODUKT:

Izgled: rumenkasta oljnata tekočina

Izkoristek: 85,8 %

R_f: 0,48 (Mf: CH₃CN/MeOH/H₂O = 3/1/1)

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 0,90 (t, 6H, J = 6,8 Hz, 2 × -CH₂-CH₃),
1,29–1,38 (m, 36H, 2 × -CH₂-CH₂-(CH₂)₉-CH₃),
1,75 (s, 4H, 2 × -CH₂-CH₂-(CH₂)₉-CH₃),
2,06–2,17 (m, 1H, -CH_{2A}-CH₂-CO-NH-),
2,21–2,29 (m, 1H, -CH_{2B}-CH₂-CO-NH-),
2,49–2,75 (m, 4H, -CH₂-CO-NH-, -CH=CH-CH₂-),
3,14–3,27 (m, 4H, 2 × -CH₂-NH⁺-),
3,96–4,09 (m, 1H, -CH-NH⁺-),
4,46–4,52 (m, 1H, -CO-NH-CH-COOH),
5,70–5,76 (m, 1H, -CH-CH=CH-CH₂-),
5,92–6,03 (m, 1H, -CH-CH=CH-CH₂-);

*na spektru niso vidni signali za 3 × -COOH, -NH₃⁺, -NH⁺ ter -CO-NH-; signal za -CH-CH=CH- je prekrit s signalom za vodo.

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD):

δ [ppm] = 14,5; 23,3; 23,8; 25,5; 27,6; 30,6; 32,4; 33,1; 35,4; 52,9; 53,3; 55,8; 66,2;
116,7; 119,6; 125,9; 135,0; 162,7; 163,1; 170,8; 171,6; 174,3.

MS (ESI): m/z = 652,5 (M – H – 2 × CF₃COOH)⁻; **M_r (izračunano):** 881,98;

M_r (izračunano za M – 2 × CF₃COOH): 653,93

HRMS (za C₃₆H₆₆N₃O₇): 652,4889; izračunano: 652,4901

IR (NaCl, cm⁻¹): 2922, 1654.

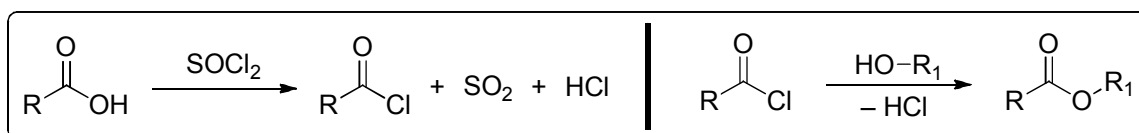
HPLC (metoda C): 94,9 % pri λ = 220 nm, t_R = 23,802 min

[α]_D²³: – 40,0 ° (c 0,090; metanol)

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 TVORBA METILNEGA ESTRA (SINTEZA SPOJIN 1 IN 2)

Karboksilni skupini D- in L-metionina smo pretvorili v metilna estra, pri čemer smo kot reagent uporabili tionil klorid, ki karboksilne skupine pretvori v močno reaktivne kislinske kloride, ti pa z alkoholi reagirajo do ustreznih estrov (slika 13) (94). V našem primeru smo imeli v reakcijski zmesi velik prebitek metanola, saj smo ga uporabili kot topilo. Nastali kislinski klorid je z njim zreagiriral do metilnega estra. Po končani reakciji je sledila enostavna izolacija z odparevanjem topila in odstranjevanjem nezreagirane tionil klorida z etrom. Reakcija je potekla brez posebnosti in z visokim izkoristkom (99,0 %).



Slika 13: Tvorba estra s tionil kloridom in alkoholom (94).

5.2 UVEDBA BENZIL KARBAMATNE ZAŠČITNE SKUPINE (SINTEZA SPOJIN 3 IN 4)

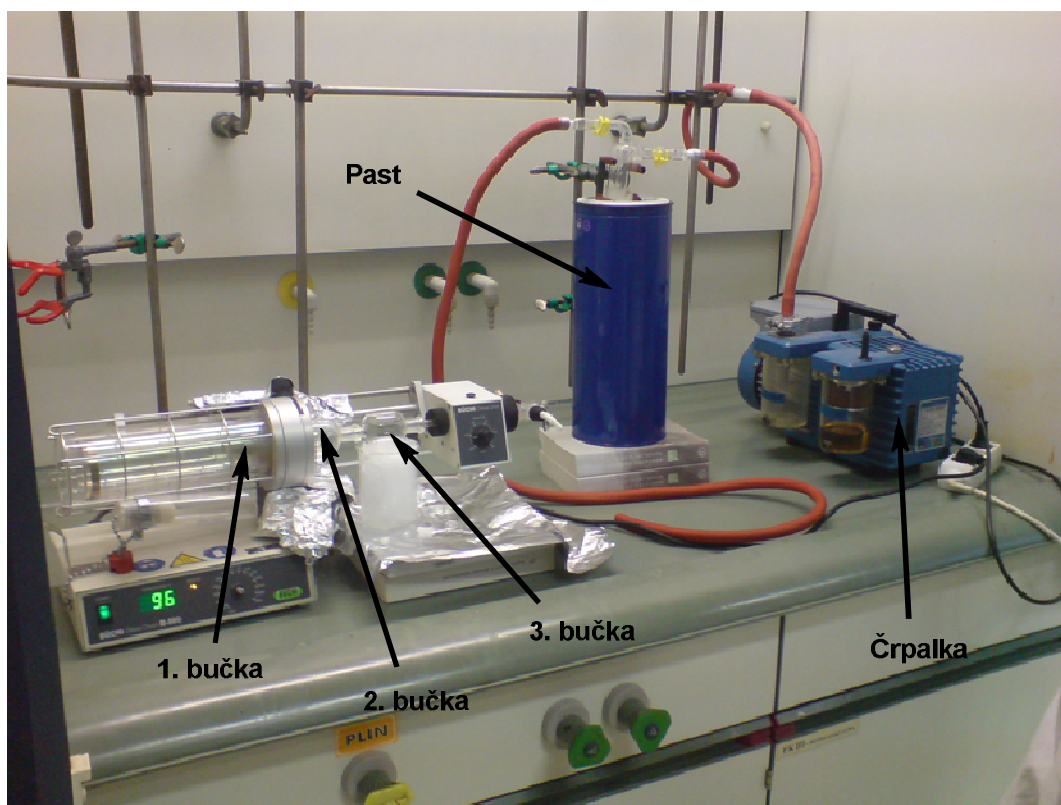
Aminsko skupino spojnin 1 in 2 smo zaščitili s tvorbo benzil karbamata (zaščitna skupina »Z«). Pri izvedbi reakcije smo kot reakcijski medij uporabili dvofazni sistem, saj je bila naša izhodna spojina topna v vodi, reagent pa v nepolarnem topilu. V reakcijsko zmes smo dodali velik prebitek šibke baze NaHCO₃, ki je izhodno spojino pretvoril v neionizirano obliko in omogočil njen prehod v eterno fazo, kjer je potekla reakcija z benzil kloroformatom. NaHCO₃ je prav tako nevtraliziral HCl, ki se je sproščal med reakcijo. Reakcija je potekla s precej visokim izkoristkom (80,1 % in 80,3 % glede na čisti produkt), s tankoplastno kromatografijo in z NMR pa smo ugotovili, da dobljeni produkt ni bil čist. Glede na NMR je vseboval 21,2 % (m/m) toluena, a nas to ni motilo, saj smo se ga znebili pri izolaciji v naslednji reakciji, kjer tudi ni motil samega poteka reakcije. Če bi želeli toluen odstraniti že prej, bi lahko produkt očistili s kolonsko kromatografijo, najbolje pa bi bilo, da bi pri naslednji izvedbi reakcije uporabili bolj čist benzil kloroformat (na primer 95 % reagent).

5.3 OKSIDACIJA SULFIDA V SULFOKSID (SINTEZA SPOJIN 5 IN 6)

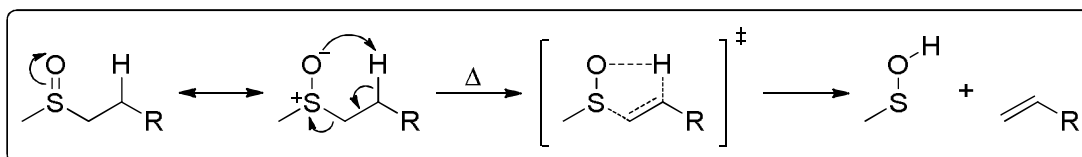
Spojini 3 in 4 smo z natrijevim metaperjodatom oksidirali v ustrezna sulfoksida. Metaperjodat se je pri tem reduciral v jodat(V), ki smo ga v postopku izolacije odstranili z nučanjem s pomočjo presesalne erlenmajerice (90,95). Pri tej reakciji bi kot stranski produkt lahko nastal tudi sulfon, zato smo pri njeni izvedbi uporabili minimalni prebitek oksidacijskega reagenta (1,04 ekvivalenta). Reakcija je potekla brez zapletov in z visokim izkoristkom (99,2 % in 99,3 %).

5.4 DEHIDROSULFENILACIJA SULFOKSIDA (SINTEZA SPOJIN 7 IN 8)

Dehidrosulfenilacijo sulfoksidov 5 in 6 smo izvedli v aparaturi Kugelrohr (slika 14). Pri izvedbi reakcije je najprej potekla destilacija izhodne spojine iz prve v drugo bučko, kjer je v plinastem stanju potekla termična eliminacija metansulfenske kisline, pri čemer je kot produkt nastal ustrezen alken. Le-ta je nato dalje destiliral v tretjo bučko, kjer je zaradi nizke temperature kondenziral. Mehanizem poteka termične eliminacije je predstavljen na sliki 15.

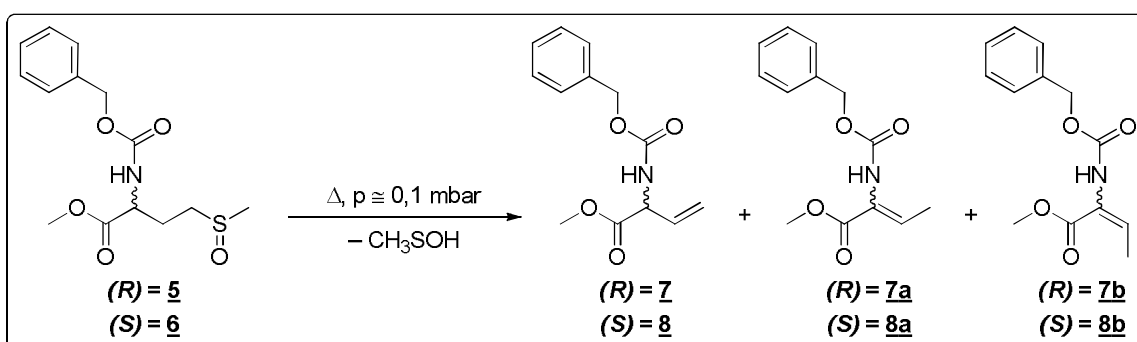


Slika 14: Aparatura Kugelrohr.



Slika 15: Mehanizem termične eliminacije metansulfenske kisline (96).

Zraven želenega β,γ -nenasičenega kinetičnega produkta (**7** oziroma **8**) sta z reakcijo nastala še *Z* in *E* α,β -nenasičena termodinamska produkta (**7a** in **7b** oziroma **8a** in **8b**; slika 16), kar smo potrdili tudi z NMR. Prav tako je v zbirno bučko destilirala nezreagirana izhodna spojina, s tankoplastno kromatografijo pa smo zaznali še dva neznan stranska produkta. Končni produkt smo zato očistili s kolonsko kromatografijo.



Slika 16: Produkti dehidrosulfenilacije sulfoksidov **5** in **6**.

Glede na predhodne raziskave bi se lahko termodinamskih produktov in ostalih neželenih spojin znebili z naslednjimi modifikacijami:

- Znižanje tlaka pod 0,03 mbar – hitrejši potek reakcije in s tem večje favoriziranje nastanka kinetičnega produkta. Prav tako omogočimo izvedbo reakcije pri nižji temperaturi prve bučke.
- Nižja temperatura prve bučke – manj stranskih reakcij ter počasnejša destilacija in zato bolj popolna termoliza v plinasti fazi.
- Zamenjava druge bučke z majhno stekleno cevko in segrevanje le-te na višjo temperaturo (na primer s pirolizno pečko) – s kratko izpostavitvijo plinaste faze visokim temperaturam bi dosegli bolj popolno termolizo. Z uporabo pirolizne pečke bi lahko segrevali na višjo temperaturo in bolj nadzorovano (97).

Z zmanjšanjem pojava neželenih produktov bi zagotovo tudi močno izboljšali izkoristek, ki je v našem primeru znašal le 30,3 % oziroma 33,2 %.

5.5 ODSTRANITEV METILNEGA ESTRA IN BENZIL KARBAMATA (SINTEZA SPOJIN 9 IN 10)

Za nadaljnje reakcije smo potrebovali vinilglicin, zaščiten z drugimi, bolj ustreznimi zaščitnimi skupinami, zato smo izvedli hidrolizo zaščitnih skupin na spojinah 7 in 8. Metilni ester se ponavadi odstranjuje z alkalno hidrolizo, benzil karbamat pa s katalitskim hidrogeniranjem (98). V našem primeru smo zaščiti odstranili kar z refluktiranjem v 6 M raztopini HCl, kar so zelo ostri pogoji, ki so omogočili enostavno in hkratno odstranitev obeh zaščit. Reakcija je potekla brez posebnosti in s precej visokim izkoristkom (87,1 % in 87,5 %).

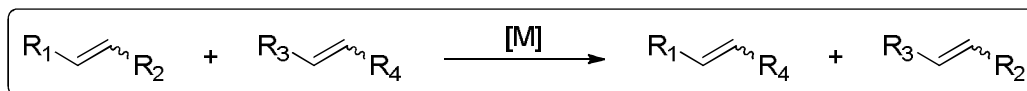
5.6 ZAŠČITA FUNKCIONALNIH SKUPIN VINIL IN ALILGLICINOV (SINTEZA SPOJIN 11–18)

Aminsko skupino D-vinilglicina (spojina 9) in D-alilglicina smo zaščitili z zaščitno skupino Boc, medtem ko smo aminsko skupino L-vinilglicina (spojina 10) in L-alilglicina zaščitili z zaščitno skupino Fmoc. Karboksilne skupine vseh vinil in alilglicinov pa smo zaščitili s tvorbo *tert*-butilnega estra. Na ta način smo pripravili fragmente, ki so po izvedbi naslednje stopnje sinteze tvorili ortogonalno zaščiten spojino.

Boc skupino smo uvedli z Boc anhidridom, Fmoc skupino z *N*-(9-fluorenilmetiloksikarboniloksi)sukcinimidom, *tert*-butilni ester pa smo tvorili s *tert*-butil 2,2,2-trikloroacetimidatom. Vse reakcije so v skladu s pričakovanji potekle brez posebnosti, še posebej dobro sta potekli uvedba Boc in Fmoc zaščite, saj je reakcija potekla kvantitativno. Izkoristek je pri teh reakcijah znašal med 82,7 % in 98,4 %, izgube pa pripisujemo izolaciji. Nekoliko slabše so potekle reakcije tvorbe *tert*-butilnega estra, kjer izhodna spojina ni popolnoma zreagirala, zraven produkta pa smo imeli v reakcijski zmesi še neznane stranske produkte. V teh primerih so bili izkoristki nekoliko nižji, a še vedno zadovoljivi (51,2–77,0 %).

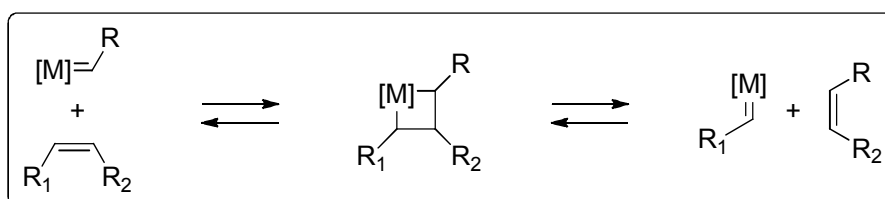
5.7 OLEFINSKA METATEZA (SINTEZA SPOJIN 19 IN 20)

Spojini 19 in 20 smo sintetizirali z navzkrižno olefinsko metatezo. Pri tej reakciji se prekinejo dvojne vezi olefinov oziroma alkenov, nato pa substituenti ob dvojni vezi tvorijo nove dvojne vezi s substituenti drugih alkenov, pri čemer nastanejo nove molekule. Reakcija poteka ob prisotnosti kovinskega alkilidenskega kompleksa kot katalizatorja in je predstavljena na sliki 17, kjer substituent R₂ menja mesto s substituentom R₄.



Slika 17: Navzkrižna olefinska metateza.

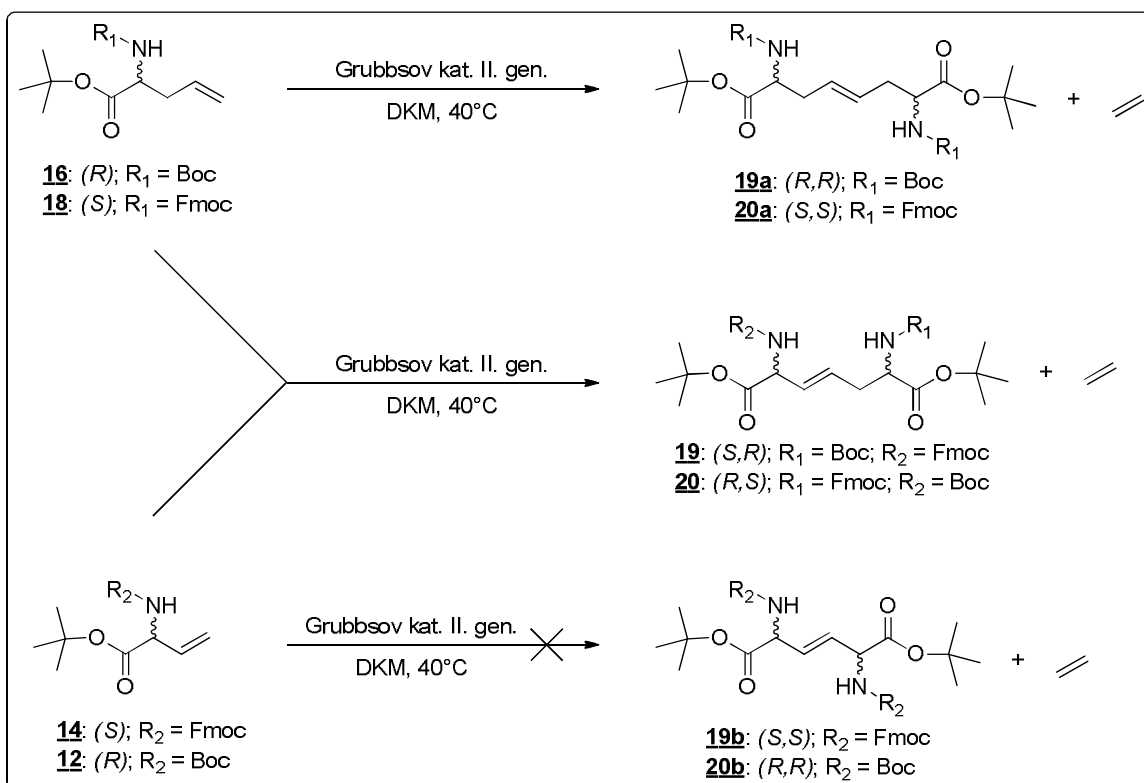
Še dandanes je kot generalni mehanizem poteka olefinske metateze sprejet Chauvinov »karbenski« mehanizem iz leta 1971. Po tej teoriji se alken s kovinskim alkilidnom poveže v metalociklobutanski intermediat, ki nato razpade na novi alken in alkiliden (slika 18). Takšna reakcija se večkrat ponovi z različnimi alkeni in alkilidni, končen rezultat pa je premešanje substituentov ob dvojnih vezeh v reakcijo vstopajočih alkenov (99–102).



Slika 18: Mehanizem olefinske metateze (99).

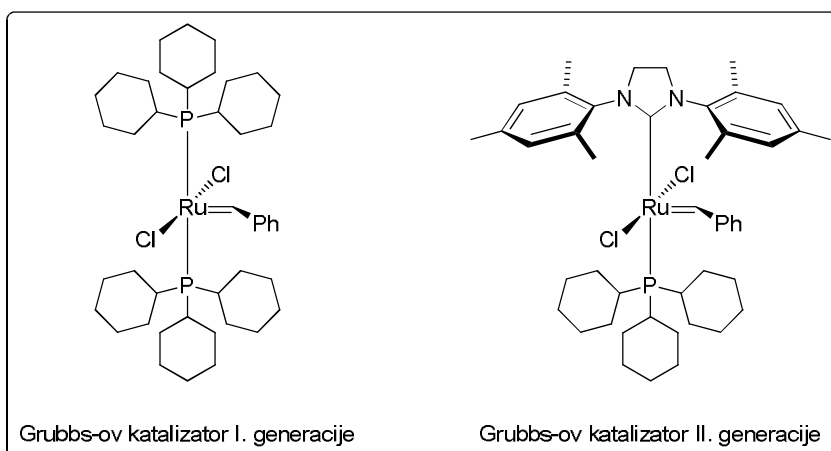
V našem primeru smo reakcijo olefinske metateze izvedli med ustrezno zaščitenim alil in vinilglicinom. Pri tem je nastal želen navzkrižno sklopljen produkt (**19** oziroma **20**), homodimer alilglicinskega derivata (**19a** oziroma **20a**) in eten, ki je izhajal kot plin. Vinilglicinski derivat pa zaradi slabe reaktivnosti ni tvoril homodimera (**19b** oziroma **20b**; slika 19). Slaba reaktivnost vinilnega derivata je najverjetneje posledica steričnih in elektronskih vplivov, različna reaktivnost reaktantov pa je za reakcijo navzkrižne olefinske metateze ugodna, saj je v tem primeru selektivnost reakcije večja. K večji selektivnosti prav tako pripomore prebitek manj reaktivnega reaktanta, zato smo pri izvedbi reakcije uporabili 1,7–1,8 ekvivalenta vinilglicinskega derivata (103–105).

Produkti navzkrižne olefinske metateze so lahko tako Z kot tudi termodinamsko bolj ugodni E izomeri. Razmerje med nastalima geometrijskima izomeroma E in Z je odvisno od steričnih vplivov in od reaktivnosti produkta, ki lahko preko sekundarne metateze izomerizira (103). V našem primeru smo z NMR zaznali le E izomer, stereoselektivnost reakcije pa pripisujemo steričnim vplivom, saj lahko glede na študije ostalih raziskovalcev sklepamo, da naš produkt ne vstopa v reakcijo sekundarne metateze (105).



Slika 19: Produkti navzkrižne olefinske metateze derivatov alil in vinilglicina.

Olefinsko metatezo je možno izvesti s široko paleto različnih katalizatorjev, od katerih so komercialno dostopni razni Grubbs-ovi in Schrock-ovi katalizatorji. Odločili smo se za uporabo Grubbs-ovega katalizatorja II. generacije, ki je bolj reaktiven od Grubbs-ovega katalizatorja I. generacije in omogoča izvedbo reakcije tudi s sterično bolj oviranimi alkeni, hkrati pa ohranja odpornost na vpliv vlage in zmerno stabilnost na zraku (103,106,107). Strukturi obeh omenjenih Grubbs-ovih katalizatorjev sta predstavljeni na sliki 20.

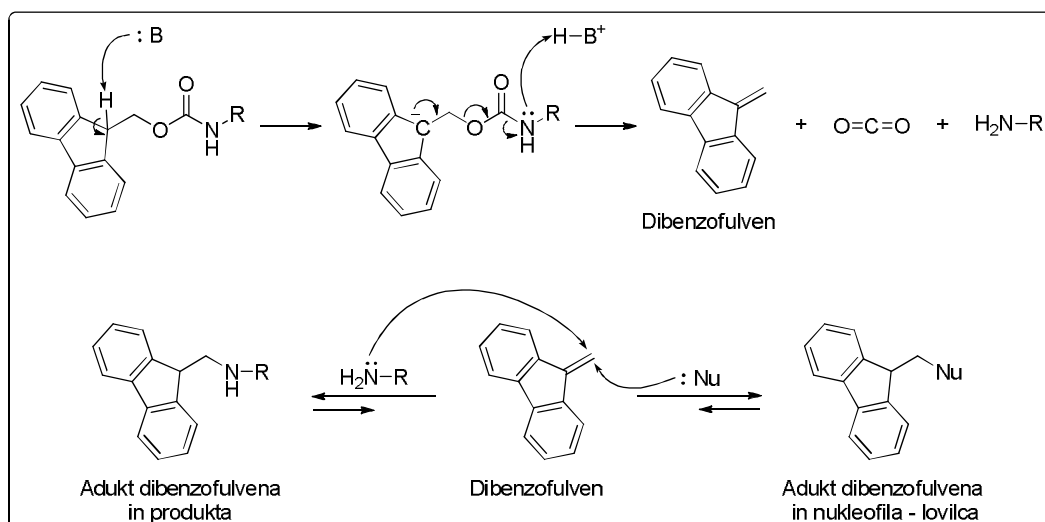


Slika 20: Struktura Grubbs-ovega katalizatorja I. in II. generacije.

Reakcija navzkrižne olefinske metateze v našem primeru ni popolnoma potekla, saj je v reakcijski zmesi zraven produktov ter nezreagirane vinilglicinskega derivata ostalo še nekaj nezreagirane alilglicinskega derivata. Izolacijo želenega produkta smo izvedli s kolonsko kromatografijo, pri čemer smo hkrati izolirali še nezreagirani izhodni spojini ter ju s tem reciklirali. Izkoristek reakcije je bil nizek in je znašal le 21,7 % oziroma 29,8 %, kar je precej manj kot v primeru ostalih raziskovalcev, ki so izvajali isto reakcijo med podobno zaščitnim alil in vinilglicinom in dobili izkoristke od 49 % do 64 % (104,105). Razlog zakaj je naš izkoristek toliko nižji ni povsem jasen, lahko pa bi bil posledica uporabe katalizatorja drugega proizvajalca, ki ni nujno enake kvalitete. Domnevamo, da bi lahko izkoristek nekoliko izboljšali, če alilglicinskega derivata ne bi dodali vsega naenkrat, temveč bi ga dodajali postopoma po več delih (103). Prav tako bi lahko nekoliko spremenili sintezno pot in pri reakciji olefinske metateze namesto spojine **16** oziroma **18** uporabili alilglicin, ki bi imel zaščiteno le aminske skupino. Takšen alilglicinski derivat bi bil zaradi manjših steričnih ovir bolj reaktiven, kar je za selektivnost in izkoristek reakcije ugodno, prosto karboksilno skupino produkta pa bi lahko zaščitili v naslednji stopnji. Ob uporabi Grubbsovega katalizatorja II. generacije preko nezaščitene karboksilne skupine predvidoma ne bi potekale stranske reakcije, lahko pa bi se zgodilo, da bi bil nastali produkt zmes geometrijskih izomerov E in Z, kar bi predstavljalo še dodatne težave (99,103).

5.8 ODSTRANITEV ZAŠČITNE SKUPINE Fmoc (SINTEZA SPOJINE **21**)

Dialkilni D-glutamatni fragment v analogih dipeptida γ -D-Glu-(2*S*,6*R*)-*mezo*-DAP smo v dveh stopnjah sintetizirali iz (*R*)-4-[[*(9H*-fluoren-9-il)metoksi]karbonilamino]-5-*tert*-butoksi-5-oksopentanojske kisline, ki smo ji najprej odstranili zaščitno skupino Fmoc ter s tem dobili spojino **21**. Fmoc se lahko odstrani z bazo, ki odcepi kisli proton na mestu 9 fluorenskega obroča. Temu sledi premik elektronov ter odcepitev zaščite v obliki dibenzofulvena in ogljikovega dioksida. Nastali dibenzofulven lahko nato reagira z odščiteno aminske skupino in z njo tvori stabilen adukt. Zato moramo v reakcijsko zmes dodati dober nukleofil, ki kot lovilec (angl. »scavenger«) reagira namesto produkta (slika 21). V primeru uporabe nukleofilne baze kot odščitnega sredstva, je lahko lovilec kar baza sama (108).



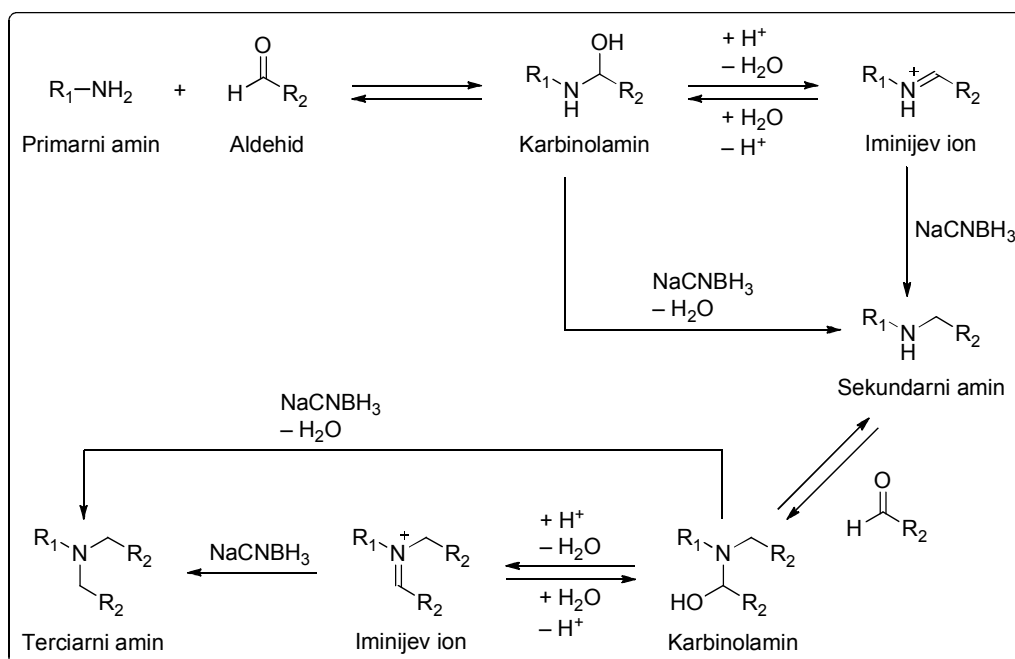
Slika 21: Mehanizem odščite Fmoc z bazo in tvorba aduktov z nastalim dibenzofulvenom (prirejeno po (108)).

Za odstranitev zaščitne skupine Fmoc smo uporabili katalitično količino 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-ena (DBU). Ker je DBU nenukleofilna baza, smo kot lovilec dibenzofulvena v reakcijsko zmes dodali 1-oktantiol. 1-oktantiol, DBU in med reakcijo nastali adukt fluorenilmetil oktil tioeter, so topni v dietil etru, zato smo lahko produkt izolirali s tritracijo z etrom ter s spiranjem nastale oborine z zmesjo etra in heksana (108). Izolacija ni potekala kot bi si želeli, saj smo imeli velike težave z nastankom oborine, ki je le stežka nastala po dolgotrajni tritraciji. Prav tako se glede na tankoplastno kromatografijo nismo uspeli povsem znebiti DBU. Toda uporabljeni orositveni reagent ninhidrin z amini reagira zelo intenzivno in v NMR spektru prisotnosti DBU nismo zaznali. Ne glede na težave smo uspeli pripraviti zadovoljivo čist produkt **21** z visokim izkoristkom (94,2 %).

5.9 REDUKTIVNO AMINIRANJE (SINTEZA SPOJINE **22**)

Iz spojine **21** in dodecil aldehida smo z reduktivnim aminiranjem pripravili dialkilni D-glutamatni fragment (spojino **22**), pri čemer smo kot reducent uporabili natrijev cianoborhidrid. Pri izvajanju reakcije smo morali biti previdni, saj je natrijev cianoborhidrid zelo toksičen, prav tako pa lahko iz njega izhaja toksičen vodikov cianid. Mehanizem reakcije je predstavljen na sliki 22 in poteka na naslednji način. Najprej poteče kislinsko katalizirana adicija aminske skupine primarnega amina na karbonilno skupino aldehida. Pri tem nastane karbinolamin, ki se lahko z eliminacijo vode pretvori v imin oziroma iminijev ion. Sledi redukcija z natrijevim cianoborhidridom, ki iminijev ion ali pa

kar karbinolamin pretvori v sekundarni amin. S sekundarnim aminom in novo molekulo dodecil aldehida nato še enkrat poteče ista reakcija, pri čemer nastane terciarni amin (109,110).



Slika 22: Mehanizem reakcije reduktivnega aminiranja med primarnim aminom in aldehidom z reducentom $NaCNBH_3$ (prirejeno po (109,110)).

Produkt reakcije ni bil čist, zato smo ga očistili s kolonsko kromatografijo. Pri tem smo v mobilno fazo dodali trietilamin, ki je želeni produkt pretvoril v neionizirano obliko in s tem preprečil njegovo zadrževanje na startu. Uspeli smo izolirati čisti dialkilirani produkt z izkoristkom reakcije 60,5 %.

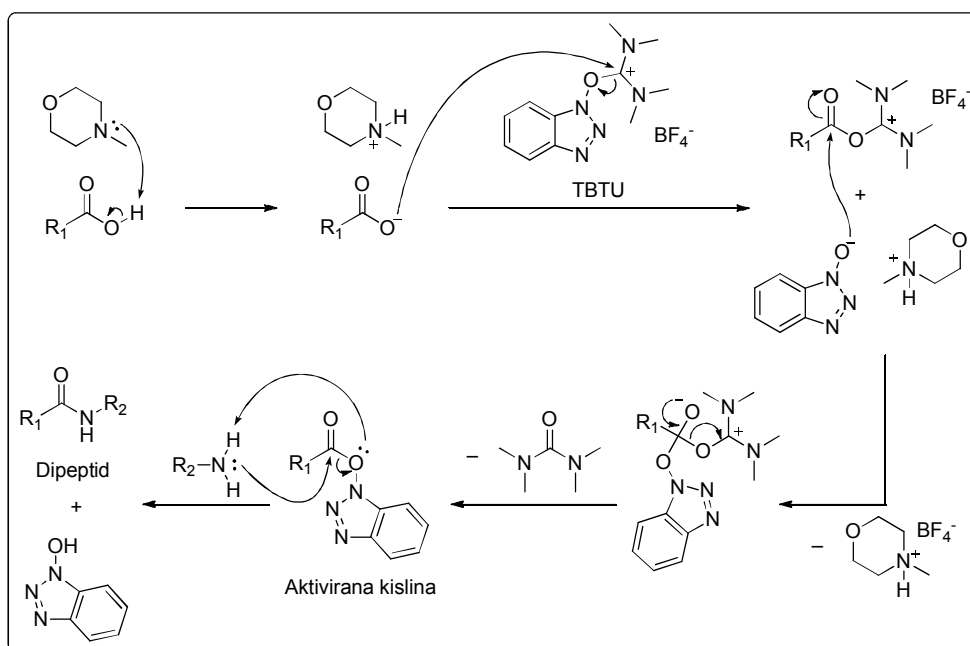
5.10 ODSTRANITEV Fmoc IN TVORBA PEPTIDNE VEZI (SINTEZA SPOJIN 23 IN 25)

Dialkilni derivat D-glutaminske kisline (spojino 22) smo preko tvorbe peptidne vezi pripeli na naša rigidizirana analoga aminokisline *mezo*-DAP. V ta namen smo morali najprej selektivno odstraniti zaščitno skupino Fmoc iz ortogonalno zaščitene spojine 19 in 20.

Kot v primeru sinteze spojine 21 (poglavje 5.8) smo odščitno najprej poskusili izvesti z DBU in 1-oktantiolom. Ta postopek tokrat ni uspel, saj smo med koncentriranjem reakcijske zmesi pri povišani temperaturi izgubili praktično ves produkt. Glede na kromatograme dobljene s tankoplastno kromatografijo smo sklepali, da je med segrevanjem nastal adukt med produktom in dibenzofulvenom, ki je očitno bolj stabilen

kot adukt dibenzofulvena z 1-oktantiolom. Zato smo pri naslednjem poskusu namesto 1-oktantiola kot lovilec dibenzofulvena uporabili *N*-(2-merkaptetil)aminometil-polistiren, ki ima nukleofilno tiolno skupino vezano na polistirenski nosilec in smo ga po reakciji lahko odstranili na preprost način, s filtracijo. Toda tudi v tem primeru izolacija želenega produkta ni uspela in ponovno smo ves produkt izgubili pri rotavapiranju. Sklepali smo, da je tokrat pri povišani temperaturi odščitena aminska skupina napadla nek elektrofilni center v molekuli, pri čemer je prišlo do intramolekularne ciklizacije, a tega kasneje nismo dokazali. Zaradi nestabilnosti nastale odščitene spojine smo se odločili, da je ne bomo izolirali, temveč bomo pripenjanje spojine **22** izvedli kar v isti reakcijski zmesi.

Ponovno smo spojinama **19** in **20** odstranili zaščitno skupino Fmoc z uporabo DBU ob prisotnosti *N*-(2-merkaptetil)aminometil-polistirena in po končani reakciji nastali adukt z dibenzofulvenom odnučali s pomočjo presesalne erlenmajerice. Vzporedno ob izvajanju te reakcije pa smo v drugi bučki izvedli aktivacijo karboksilne kisline na spojnini **22** z reagentom TBTU (*O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronijev tetrafluoroborat) ob prisotnosti nenukleofilne baze *N*-metilmorfolin. Aktivirano kislino smo nato združili s filtratom prve reakcijske zmesi in po končani reakciji ter izolaciji s kolonsko kromatografijo dobili želeni produkt (spojini **23** in **25**). Izkoristek sinteze spojine **23** je znašal le 24,3 %, zato smo to sintezo ponovili še enkrat, spojino **25** pa smo uspeli pripraviti z zadovoljivim izkoristkom 52,1 %. Mehanizem aktivacije kisline in tvorbe peptidne vezi je prikazan na sliki 23.



Slika 23: Mehanizem tvorbe peptidne vezi s TBTU in *N*-metilmorfolinom (prirejeno po (111,112)).

5.11 ODSTRANITEV *TERC*-BUTILNIH ESTROV IN ZAŠČITNE SKUPINE Boc (SINTEZA SPOJIN **24** IN **26**)

Končni spojini **24** in **26**, ki sta *N,N*-dialkilna analoga dipeptida γ -D-Glu-(2*S*,6*R*)-*mezo*-DAP, smo sintetizirali z odstranitvijo *terc*-butilnih estrov in zaščitne skupine Boc iz spojin **23** in **25**. Odščito smo izvedli s trifluoroocetno kislino v topilu DKM. Po končani reakciji je sledila enostavna izolacija z odparevanjem topila pod znižanim tlakom ter trituracijo z dietil etrom. Reakcija odščite je potekla brez zapletov in z visokim izkoristkom (85,8 % oziroma 92,0 %).

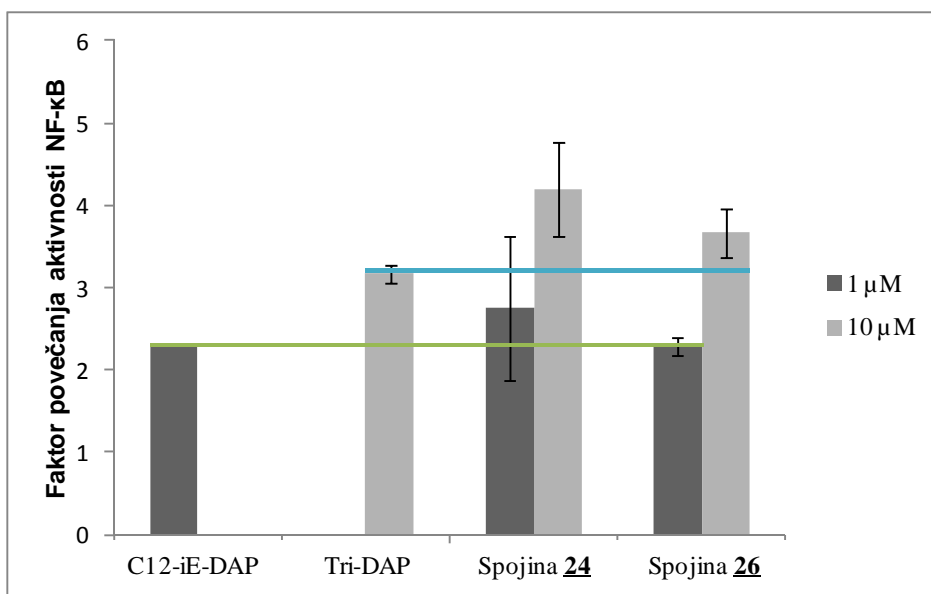
Končni spojini sta amfoterni, saj vsebujeta dva bazična in tri kisle centre. Če bi bili ti spojini po zadnji stopnji sinteze onesnaženi z nečistočami bi ju le s težka očistili. Zato smo se že v predhodnih stopnjah prepričali, da imamo ustrezno čiste vmesne produkte in napravili HPLC analizo spojin **12**, **14**, **16**, **18**, **19**, **20**, **23** ter **25**. Ugotovili smo, da so te spojine zelo čiste, saj je analiza pokazala 94,1–96,6 % čistost. Po pričakovanju sta bili tako tudi končni spojini zelo čisti in sicer je bila glede na HPLC spojina **24** 95,1 % čista in spojina **26** 94,9 % čista. Strukturo končnih spojin **24** in **26** pa smo potrdili z ¹H in ¹³C NMR spektroskopijo, masno spektrometrijo, masno spektrometrijo visoke ločljivosti in infrardečo spektroskopijo.

5.12 BIOLOŠKO VREDNOTENJE SPOJIN NA CELIČNI LINIJI RAMOS-BLUE

Novo sintetizirana *N,N*-dialkilna analoga dipeptida γ -D-Glu-(2*S*,6*R*)-*mezo*-DAP smo dali biološko ovrednotiti na Katedro za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo, kjer so njuno agonistično delovanje testirali na celični liniji Ramos-BlueTM. Ramos-BlueTM je linija limfocitov B, ki izražajo receptorje NOD1 in vsebujejo gen za »izločeno zarodno alkalno fosfatazo« (angl. »secreted embryonic alkaline phosphatase« – SEAP), ki je inducibilen z NF- κ B. Agonisti receptorjev NOD1 v teh celicah povečajo izražanje NF- κ B, kar ima za posledico povečanje transkripcije in translacije encima SEAP, ki je okrnjena oblika placentalne alkalne fosfataze. Ta encim celice izločajo v supernatant in ga lahko enostavno pomerimo z reagentom QUANTI-BlueTM, ki ob reakciji z alkalnimi fosfatazami spremeni barvo iz rožnate v vijolično-modro.

Celice Ramos-BlueTM smo stimulirali s C12-iE-DAP, Tri-DAP ter spojinama **24** in **26**. Po stimulaciji smo z reagentom QUANTI-BlueTM v supernatantu celičnega medija spektrofotometrično pomerili koncentracijo encima SEAP, s čimer je bila posredno

izmerjena aktivnost NF- κ B. Kot negativno kontrolo smo uporabili celice z dodanimi vsemi reagenti razen agonista. Vsem meritvam, tudi negativni kontroli, smo odšteli vrednost meritve pripadajočega slepega vzorca, ki je vseboval vse komponente vzorca razen celic. Celice v negativni kontroli so intrinzično izražale nekaj NF- κ B oziroma izločale nekaj encima SEAP in naše rezultate testiranja smo podali kot faktor povečanja aktivnosti NF- κ B glede na negativno kontrolo. Rezultati testiranja so prikazani na sliki 24.



Slika 24: Graf – Povečanje aktivnosti NF- κ B v celicah Ramos-Blue™ ob stimulaciji z agonisti receptorjev NOD1.

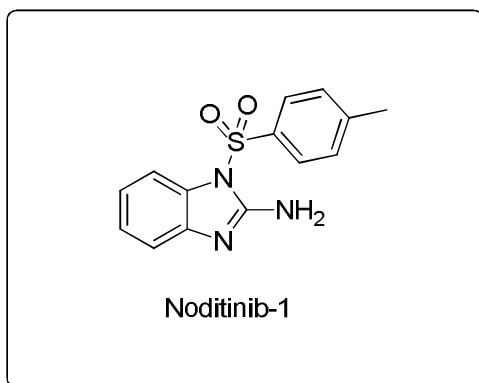
Meritve so pokazale, da se pri koncentraciji 1 μ M aktivnost spojine **26** ne razlikuje signifikantno od aktivnosti C12-iE-DAP. Pri isti koncentraciji je spojina **24** v povprečju izkazovala večjo aktivnost kot C12-iE-DAP, a na podlagi teh rezultatov zaradi velike standardne deviacije ne moremo trditi, da je boljši agonist. Pri koncentraciji 10 μ M pa je bila tako aktivnost spojine **24** kot tudi aktivnost spojine **26** signifikantno večja od aktivnosti tripeptida Tri-DAP.

Z uvedbo dialkilnih verig in dvojne vezi smo torej uspeli povečati aktivnost dipeptida iE-DAP, ki drugače izkazuje nižjo aktivnost kot tripeptid Tri-DAP (v celicah HEK293T pri koncentraciji 10 ng/mL iE-DAP poveča izražanje NF- κ B za faktor ~ 4, Tri-DAP pa za faktor ~ 6) (36). To je tudi v skladu s pričakovanji, saj uvajanje lipofilnih verig na α -amino skupino v D-Glu delu molekule zaradi boljšega prehajanja čez celične membrane poveča agonistično delovanje na receptorjih NOD1, ki se nahajajo v citoplazmi. Domnevamo, da je k boljšemu delovanju pripomogla tudi rigidizacija z dvojno vezjo, ki zmanjša število

možnih prostorskih konformacij, kar lahko povzroči boljše ujemanje agonista s tarčnim mestom na receptorju.

Na podlagi povprečnih vrednosti povečanja aktivnosti NF- κ B sklepamo, da je za agonistično delovanje na receptorjih NOD1 bolj ugodna uvedba dvojne vezi na mesto β - γ kot na mesto γ - δ v DAP delu molekule, toda tega zaradi prevelike standardne deviacije ne moremo potrditi. Zato bi bilo smiselno izvesti še več meritev aktivnosti pri istih ter tudi pri različnih koncentracijah, iz katerih bi prav tako lahko določili maksimalne aktivnosti in vrednosti EC₅₀, kar bi bili še boljši parametri za primerjavo aktivnosti naših agonistov. Zanimivo bi bilo tudi primerjati aktivnost novo sintetiziranih agonistov **24** in **26** z aktivnostjo njunega hidrogeniranega derivata, s čimer bi lahko potrdili ali ovrgli hipotezo, da je dvojna vez za delovanje bolj ugodna kot enojna. Prav tako bi bilo ob stimulaciji receptorjev NOD1 z našima agonistoma smiselno izmeriti še profil izražanja nekaterih citokinov in kemokinov, kar bi dalo še več informacij o uspešnosti našega dela.

Celično linijo Ramos-Blue™ smo izpostavili agonistom tudi ob prisotnosti visoko selektivnega antagonist receptorjev NOD1, Noditiniba-1 (ML130, CID-1088438; slika 25) (113). Ob njegovi prisotnosti je izražanje NF- κ B kljub stimulaciji z agonisti padlo na praktično enak nivo kot pri negativni kontroli, kar je dokaz, da naša agonista delujeta selektivno na receptorje NOD1 (rezultati niso prikazani).



Slika 25: Struktura selektivnega antagonist receptorjev NOD1 Noditiniba-1.

Za dobro karakterizacijo naših novo sintetiziranih spojin je torej potrebnih še več testiranj, glede na dobljene rezultate pa lahko potrdimo, da smo uspeli sintetizirati selektivna agonista receptorjev NOD1, katerih aktivnost je primerljiva z nekaterimi že znanimi agonisti ali celo večja. Pri tem ima velik potencial za nadaljnje raziskave in modifikacije predvsem spojina **24**, ki je izmed vseh testiranih spojin nakazovala na najmočnejše delovanje.

6. SKLEP

Uspešno smo načrtovali in sintetizirali dva analoga dipeptida γ -D-Glu-(2*S*,6*R*)-*mezo*-DAP (iE-DAP), spojini **24** in **26**, ki imata na aaminsko skupino v glutamatnem delu molekule pripeti dve *n*-dodecilni verigi in DAP del molekule rigidiziran z dvojno vezjo na mestu β - γ ali γ - δ .

Pri sintezi spojin **7** in **8** sta zraven želenega β,γ -nenasičenega kinetičnega produkta kot glavna stranska produkta nastala še *Z* in *E* α,β -nenasičena termodinamska produkta (**7a** in **7b** oziroma **8a** in **8b**), izkoristek reakcije pa je znašal le 30,3 % oziroma 33,2 %. Stranskih produktov bi se v tem primeru lahko znebili z izvajanjem reakcije pri tlaku nižjem od 0,03 mbar ob čim nižji temperaturi prve bučke in z zamenjavo druge bučke s stekleno cevko ter segrevanjem le-te na višjo temperaturo, s čimer bi tudi zvišali izkoristek reakcije. Pri izvedbi reakcije navzkrižne olefinske metateze, s katero smo sintetizirali spojini **19** in **20**, smo prav tako imeli slab izkoristek (21,7 % oziroma 29,8 %). Razlog za tako nizek izkoristek ni povsem jasen, sklepamo pa, da bi ga lahko izboljšali z uporabo katalizatorja drugega proizvajalca in z modifikacijo izvedbe reakcije, pri čemer bi alilglicinski derivat v reakcijsko zmes dodajali postopoma in po več delih. Lahko bi tudi nekoliko spremenili sintezno pot in namesto spojine **16** oziroma **18** uporabili alilglicin, ki bi imel zaščiteno le aaminsko skupino. V tem primeru bi zaradi zmanjšanja steričnih ovir pričakovali večjo reaktivnost alilglicinskega reaktanta in posledično boljši izkoristek. Negativna stran takšne sintezne poti pa je manjša stereoselektivnost in s tem možnost nastanka geometrijskega izomera *Z* kot stranskega produkta.

Na večje težave pri sintezi smo naleteli ob odstranitvi zaščitne skupine Fmoc iz spojin **19** in **20**, kjer tako ob uporabi 1-oktantiola kot tudi *N*-(2-merkptoetil)aminometil-polistirena kot lovilca dibenzofulvena zaradi stranskih reakcij nismo uspeli izolirati želenega produkta. Zato smo ta korak izpustili in naslednjo stopnjo sinteze izvedli kar v isti reakcijski zmesi, pri čemer smo iz nje z nučanjem s pomočjo presesalne erlenmajerice najprej odstranili adukt med uporabljenim lovilec (N-(2-merkptoetil)aminometil-polistiren) in dibenzofulvenom. Na ta način smo uspešno sintetizirali spojini **23** in **25** z izkoristkoma 24,3 % in 52,1 % preko dveh stopenj. Ostale reakcije v sintezni poti so potekle brez večjih posebnosti in z visokimi ali vsaj zadovoljivimi izkoristki.

Novo sintetizirani spojini **24** in **26** smo biološko ovrednotili na celični liniji Ramos-Blue™ in ugotovili, da sta spojini selektivna agonista na receptorjih NOD1, ki izkazujeta delovanje močnejše od tripeptida Tri-DAP in s tem tudi od dipeptida iE-DAP. Predvidevamo, da je vzrok za večjo aktivnost tako uvedba lipofilnih verig, ki omogoči lažje prehajanje čez celično membrano, kot tudi rigidizacija z uvedbo dvojne vezi, ki zmanjša število možnih prostorskih konformacij in s tem predvidoma omogoči boljše ujemanje agonista s tarčnim mestom na receptorju. Prav tako sklepamo, da je za delovanje bolj ugodna dvojna vez na mestu β - γ kot na mestu γ - δ v DAP delu molekule in da je zato spojina **24** boljši agonist kot spojina **26**, a tega zaradi velike standardne devijacije ne moremo potrditi.

Glede na rezultate lahko predvsem spojina **24** in tudi spojina **26**, služita kot osnova za razvoj novih imunomodulatornih učinkovin, ki bi preko receptorjev NOD1 pozitivno modulirale imunski odziv. Takšne učinkovine bi lahko uporabili za zdravljenje različnih bolezni povezanih z nepravilnostmi v delovanju receptorjev NOD1, kot protimikrobne učinkovine s posrednim delovanjem, kot adjuvanse v cepivih in kot protitumorne učinkovine.

V nadaljnjih raziskavah bi bilo smiselno s spojinama **24** in **26** izvesti še več bioloških testiranj in jima določiti maksimalno aktivnost in EC_{50} ter ugotoviti kako njuno delovanje vpliva na izražanje nekaterih citokinov in kemokinov. Prav tako bi bilo zanimivo primerjati njuno aktivnost z aktivnostjo njenega hidrogeniranega derivata, s čimer bi lahko potrdili ali ovrgli hipotezo, da rigidizacija z uvedbo dvojne vezi v DAP del molekule ugodno vpliva na delovanje. Ker naši končni spojini v svoji strukturi vsebujeta fragment podoben aminokislini DAP, sta tudi potencialna inhibitorja nekaterih encimov udeleženih pri sintezi bakterijske celične stene in s tem potencialni osnovi za razvoj novih kemoterapevtikov s selektivno toksičnostjo. Zato bi bilo smiselno tudi preveriti, če spojini **24** in **26** inhibirata encime DAP dekarboksilazo, DAP dehidrogenazo, DAP epimerazo, MurE in MurF.

7. LITERATURA

1. Vozelj M. Temelji imunologije. 1. izdaja. DZS. Ljubljana. 2000: 1–37, 75, 76, 229–326.
2. Male D., Brostoff J., Roth D. B. RI. Immunology. 7th ed. Elsevier Mosby. Edinburgh. 2006: 8, 129, 143, 259–61, 522, 523.
3. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. Nature reviews. Immunology. 2010;10(12):826–37.
4. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell. 2006;124(4):783–801.
5. Janeway C a, Medzhitov R. Innate immune recognition. Annual review of immunology. 2002;20(2):197–216.
6. Werts C, Girardin SE, Philpott DJ. TIR, CARD and PYRIN: three domains for an antimicrobial triad. Cell death and differentiation. 2006;13(5):798–815.
7. Braun BJ, Slowik A, Leib SL, Lucius R, Varoga D, Wruck CJ, et al. The formyl peptide receptor like-1 and scavenger receptor MARCO are involved in glial cell activation in bacterial meningitis. Journal of neuroinflammation. 2011;8(1):11.
8. Panaro M a, Acquafredda a, Sisto M, Lisi S, Maffione a B, Mitolo V. Biological role of the N-formyl peptide receptors. Immunopharmacology and immunotoxicology. 2006;28(1):103–27.
9. Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. Nature immunology. 2006;7(12):1250–7.
10. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. Immunity. 2011;34(5):637–50.
11. Creagh EM, O’Neill L a J. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. Trends in immunology. 2006;27(8):352–7.
12. Beutler B a. TLRs and innate immunity. Blood. 2009;113(7):1399–407.
13. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. Nature reviews. Immunology. 2004;4(7):499–511.
14. Choe J, Kelker MS, Wilson IA. Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. Science (New York, N.Y.). 2005;309(5734):581–5.
15. Gay NJ, Gangloff M, Weber ANR. Toll-like receptors as molecular switches. Nature reviews. Immunology. 2006;6(9):693–8.

16. Yoneyama M, Fujita T. RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunological reviews*. 2009;227(1):54–65.
17. Yoneyama M, Onomoto K, Fujita T. Cytoplasmic recognition of RNA. *Advanced drug delivery reviews*. 2008;60(7):841–6.
18. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology*. 2011;30(1):16–34.
19. Cui S, Eisenächer K, Kirchhofer A, Brzózka K, Lammens A, Lammens K, et al. The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I. *Molecular cell*. 2008;29(2):169–79.
20. Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, et al. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity*. 2005;23(1):19–28.
21. Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*. 2006;441(7089):101–5.
22. Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, et al. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*: 1950. 2005;175(5):2851–8.
23. Komuro A, Horvath CM. RNA- and virus-independent inhibition of antiviral signaling by RNA helicase LGP2. *Journal of virology*. 2006;80(24):12332–42.
24. Rothenfusser S, Goutagny N, DiPerna G, Gong M, Monks BG, Schoenemeyer A, et al. The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 2005;175(8):5260–8.
25. Satoh T, Kato H, Kumagai Y, Yoneyama M, Sato S, Matsushita K, et al. LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(4):1512–7.
26. Geddes K, Magalhães JG, Girardin SE. Unleashing the therapeutic potential of NOD-like receptors. *Nature reviews. Drug discovery*. 2009;8(6):465–79.
27. Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nature reviews. Immunology*. 2006;6(1):9–20.
28. Le Bourhis L, Benko S, Girardin SE. Nod1 and Nod2 in innate immunity and human inflammatory disorders. *Biochemical Society transactions*. 2007;35(Pt 6):1479–84.
29. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*. 2010;140(6):821–32.

30. Magalhaes JG, Sorbara MT, Girardin SE, Philpott DJ. What is new with Nods? Current opinion in immunology. 2011;23(1):29–34.
31. Tattoli I, Travassos LH, Carneiro L a, Magalhaes JG, Girardin SE. The Nodosome: Nod1 and Nod2 control bacterial infections and inflammation. Seminars in immunopathology. 2007;29(3):289–301.
32. Inohara N, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, et al. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. The Journal of biological chemistry. 1999;274(21):14560–7.
33. Bertin J, Nir WJ, Fischer CM, Tayber OV, Errada PR, Grant JR, et al. Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB. The Journal of biological chemistry. 1999;274(19):12955–8.
34. Hysi P, Kabesch M, Moffatt MF, Schedel M, Carr D, Zhang Y, et al. NOD1 variation, immunoglobulin E and asthma. Human molecular genetics. 2005;14(7):935–41.
35. Askari N, Correa RG, Zhai D, Reed JC. Expression, purification, and characterization of recombinant NOD1 (NLRC1): A NLR family member. Journal of biotechnology. 2012;157(1):75–81.
36. Fujimoto Y, Fukase K. Structures, synthesis, and human Nod1 stimulation of immunostimulatory bacterial peptidoglycan fragments in the environment. Journal of natural products. 2011;74(3):518–25.
37. Fritz JH, Girardin SE, Fitting C, Werts C, Mengin-Lecreulx D, Caroff M, et al. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. European journal of immunology. 2005;35(8):2459–70.
38. Cheng G, Sun J, Fridlender ZG, Wang L-CS, Ching L-M, Albelda SM. Activation of the nucleotide oligomerization domain signaling pathway by the non-bacterially derived xanthone drug 5'6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (Vadimezan). The Journal of biological chemistry. 2010;285(14):10553–62.
39. Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LAM, Antignac A, Jéhanno M, Viala J, et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. Science (New York, N.Y.). 2003;300(5625):1584–7.
40. Philpott DJ, Girardin SE, Sansonetti PJ. Innate immune responses of epithelial cells following infection with bacterial pathogens. Current opinion in immunology. 2001;13(4):410–6.
41. Girardin SE, Tournebize R, Mavris M, Page AL, Li X, Stark GR, et al. CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. EMBO reports. 2001;2(8):736–42.

42. Swaan PW, Bensman T, Bahadduri PM, Hall MW, Sarkar A, Bao S, et al. Bacterial peptide recognition and immune activation facilitated by human peptide transporter PEPT2. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2008;39(5):536–42.
43. Laroui H, Yan Y, Narui Y, Ingersoll S a, Ayyadurai S, Charania M a, et al. L-Ala- γ -D-Glu-meso-diaminopimelic acid (DAP) interacts directly with leucine-rich region domain of nucleotide-binding oligomerization domain 1, increasing phosphorylation activity of receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2 and its interacti. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(35):31003–13.
44. Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, et al. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nature immunology*. 2004;5(11):1166–74.
45. Kaparakis M, Turnbull L, Carneiro L, Firth S, Coleman H a, Parkington HC, et al. Bacterial membrane vesicles deliver peptidoglycan to NOD1 in epithelial cells. *Cellular microbiology*. 2010;12(3):372–85.
46. Lee J, Tattoli I, Wojtal K a, Vavricka SR, Philpott DJ, Girardin SE. pH-dependent internalization of muramyl peptides from early endosomes enables Nod1 and Nod2 signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(35):23818–29.
47. Hasegawa M, Fujimoto Y, Lucas PC, Nakano H, Fukase K, Núñez G, et al. A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF-kappaB activation. *The EMBO journal*. 2008;27(2):373–83.
48. Inohara N, Nuñez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nature reviews. Immunology*. 2003;3(5):371–82.
49. van Heel DA, Hunt KA, Ghosh S, Hervé M, Playford RJ. Normal responses to specific NOD1-activating peptidoglycan agonists in the presence of the NOD2 frameshift and other mutations in Crohn's disease. *European journal of immunology*. 2006;36(6):1629–35.
50. Fritz JH, Le Bourhis L, Sellge G, Magalhaes JG, Fsihi H, Kufer T a, et al. Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity*. 2007;26(4):445–59.
51. Agnihotri G, Ukani R, Malladi SS, Warshakoon HJ, Balakrishna R, Wang X, et al. Structure-activity relationships in nucleotide oligomerization domain 1 (Nod1) agonistic γ -glutamyl-diaminopimelic acid derivatives. *Journal of medicinal chemistry*. 2011;54(5):1490–510.
52. Watanabe T, Asano N, Fichtner-Feigl S, Gorelick PL, Tsuji Y, Matsumoto Y, et al. NOD1 contributes to mouse host defense against *Helicobacter pylori* via induction of type I IFN and activation of the ISGF3 signaling pathway. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(5):1645–62.

53. Boughan PK, Argent RH, Body-Malapel M, Park J-H, Ewings KE, Bowie AG, et al. Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and epidermal growth factor receptor: critical regulators of beta-defensins during *Helicobacter pylori* infection. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(17):11637–48.
54. Uehara A, Sugawara Y, Kurata S, Fujimoto Y, Fukase K, Kusumoto S, et al. Chemically synthesized pathogen-associated molecular patterns increase the expression of peptidoglycan recognition proteins via toll-like receptors, NOD1 and NOD2 in human oral epithelial cells. *Cellular microbiology*. 2005;7(5):675–86.
55. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science (New York, N.Y.)*. 1998;281(5383):1680–3.
56. Micheau O, Lens S, Gaide O, Alevizopoulos K, Tschopp J. NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Molecular and cellular biology*. 2001;21(16):5299–305.
57. Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science (New York, N.Y.)*. 1996;274(5288):782–4.
58. Pradipta AR, Fujimoto Y, Hasegawa M, Inohara N, Fukase K. Characterization of natural human nucleotide-binding oligomerization domain protein 1 (Nod1) ligands from bacterial culture supernatant for elucidation of immune modulators in the environment. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(31):23607–13.
59. Schleifer KH, Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological reviews*. 1972;36(4):407–77.
60. Hasegawa M, Kawasaki A, Yang K, Fujimoto Y, Masumoto J, Breukink E, et al. A role of lipophilic peptidoglycan-related molecules in induction of Nod1-mediated immune responses. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(16):11757–64.
61. Girardin SE, Travassos LH, Hervé M, Blanot D, Boneca IG, Philpott DJ, et al. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(43):41702–8.
62. da Silva Correia J, Miranda Y, Austin-Brown N, Hsu J, Mathison J, Xiang R, et al. Nod1-dependent control of tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(6):1840–5.
63. Slika s shematskim prikazom strukture peptidoglikana. Dostopno preko: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mureine.svg> (5. 11. 2012).
64. Jakopin Ž. Načrtovanje in sinteza substituiranih 1,2,4-oksadiazolov in saharinov kot gradnikov potencialnih biološko aktivnih spojin. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo. 2010:

65. Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nature immunology*. 2003;4(7):702–7.
66. Wolfert M a, Roychowdhury A, Boons G-J. Modification of the structure of peptidoglycan is a strategy to avoid detection by nucleotide-binding oligomerization domain protein 1. *Infection and immunity*. 2007;75(2):706–13.
67. Correa RG, Milutinovic S, Reed JC. Roles of NOD1 (NLRC1) and NOD2 (NLRC2) in innate immunity and inflammatory diseases. *Bioscience reports*. 2012;608:597–608.
68. Yokota K, Miyazaki T, Hemmatazad H, Gay RE, Kolling C, Fearon U, et al. The pattern-recognition receptor nucleotide-binding oligomerization domain--containing protein 1 promotes production of inflammatory mediators in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis and rheumatism*. 2012;64(5):1329–37.
69. Nishio H, Kanno S, Onoyama S, Ikeda K, Tanaka T, Kusuhara K, et al. Nod1 ligands induce site-specific vascular inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31(5):1093–9.
70. Rosenzweig HL, Galster KT, Planck SR, Rosenbaum JT. NOD1 expression in the eye and functional contribution to IL-1beta-dependent ocular inflammation in mice. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2009;50(4):1746–53.
71. McGovern DPB, Hysi P, Ahmad T, van Heel D a, Moffatt MF, Carey A, et al. Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Human molecular genetics*. 2005;14(10):1245–50.
72. Macaluso F, Nothnagel M, Parwez Q, Petrasch-Parwez E, Bechara FG, Epplen JT, et al. Polymorphisms in NACHT-LRR (NLR) genes in atopic dermatitis. *Experimental dermatology*. 2007;16(8):692–8.
73. Weidinger S, Klopp N, Rummeler L, Wagenpfeil S, Novak N, Baurecht H-J, et al. Association of NOD1 polymorphisms with atopic eczema and related phenotypes. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2005;116(1):177–84.
74. Carneiro LAM, Magalhaes JG, Tattoli I, Philpott DJ, Travassos LH. Nod-like proteins in inflammation and disease. *The Journal of pathology*. 2008;214(2):136–48.
75. Girardin SE, Jéhanno M, Mengin-Lecreulx D, Sansonetti PJ, Alzari PM, Philpott DJ. Identification of the critical residues involved in peptidoglycan detection by Nod1. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(46):38648–56.
76. Shaw PJ, Barr MJ, Lukens JR, McGargill MA, Chi H, Mak TW, et al. Signaling via the RIP2 adaptor protein in central nervous system-infiltrating dendritic cells promotes inflammation and autoimmunity. *Immunity*. 2011;34(1):75–84.

77. Labro MT. Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or “immuno-fairy tales”? *Clinical microbiology reviews*. 2000;13(4):615–50.
78. Yokota Y, Mine Y, Wakai Y, Watanabe Y, Nishida M, Goto S, et al. Immunoactive peptides, FK-156 and FK-565. II. Restoration of host resistance to microbial infection in immunosuppressed mice. *The Journal of antibiotics*. 1983;36(8):1051–8.
79. Finlay BB, Hancock REW. Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? *Nature reviews. Microbiology*. 2004;2(6):497–504.
80. Hamill P, Brown K, Jenssen H, Hancock REW. Novel anti-infectives: is host defence the answer? *Current opinion in biotechnology*. 2008;19(6):628–36.
81. Mine Y, Yokota Y, Wakai Y, Fukada S, Nishida M, Goto S, et al. Immunoactive peptides, FK-156 and FK-565. I. Enhancement of host resistance to microbial infection in mice. *The Journal of antibiotics*. 1983;36(8):1045–50.
82. Hofner P, Gyulai Z, Kiss ZF, Tiszai A, Tizslavicz L, Tóth G, et al. Genetic polymorphisms of NOD1 and IL-8, but not polymorphisms of TLR4 genes, are associated with *Helicobacter pylori*-induced duodenal ulcer and gastritis. *Helicobacter*. 2007;12(2):124–31.
83. Chen GY, Shaw MH, Redondo G, Núñez G. The innate immune receptor Nod1 protects the intestine from inflammation-induced tumorigenesis. *Cancer research*. 2008;68(24):10060–7.
84. Cox RJ, Sutherland a, Vederas JC. Bacterial diaminopimelate metabolism as a target for antibiotic design. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2000;8(5):843–71.
85. Caplan JF, Zheng R, Blanchard JS, Vederas JC. Vinylogous amide analogues of diaminopimelic acid (DAP) as inhibitors of enzymes involved in bacterial lysine biosynthesis. *Organic letters*. 2000;2(24):3857–60.
86. Williams RM, Fegley GJ, Gallegos R, Schaefer F, Pruess DL. Asymmetric Syntheses of (2*S*,3*S*,6*S*)-, (2*S*,3*S*,6*R*)-, and (2*R*,3*R*,6*S*)-2,3-Methano-2,6-diaminopimelic Acids. Studies Directed to the Design of Novel Substrate-based Inhibitors of L,L-Diaminopimelate Epimerase. *Tetrahedron*. 1996;52(4):1149–64.
87. Cox RJ. The DAP pathway to lysine as a target for antimicrobial agents. *Natural product reports*. 1996;13(1):29–43.
88. Barreteau H, Kovac A, Boniface A, Sova M, Gobec S, Blanot D. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS microbiology reviews*. 2008;32(2):168–207.
89. Green DW. The bacterial cell wall as a source of antibacterial targets. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2002;6(1):1–19.

90. Afzali-ardakani A, Rapoport H. L-Vinylglycine. *The Journal of Organic Chemistry*. 1980;45(24):4817–20.
91. Iselin B. Derivate von L-Methionin-sulfoxyd und ihre Verwendung für Peptidsynthesen. *Helvetica Chimica Acta*. 1961;44(1):61–78.
92. Gu X, Ying J, Agnes RS, Navratilova E, Davis P, Stahl G, et al. Novel design of bicyclic beta-turn dipeptides on solid-phase supports and synthesis of [3.3.0]-Bicyclo([2,3])-leu-enkephalin analogues. *Organic letters*. 2004;6(19):3285–8.
93. Kaul R, Surprenant S, Lubell WD. Systematic study of the synthesis of macrocyclic dipeptide beta-turn mimics possessing 8-, 9-, and 10- membered rings by ring-closing metathesis. *The Journal of organic chemistry*. 2005;70(10):3838–44.
94. Tišler M. *Organska kemija*. 3. izdaja. DZS. Ljubljana. 1991: 239, 244.
95. Adams R, Bachmann WE, Fieser LF, Johnson JR, Snyder HR, Henne AL, et al. *Organic Reactions*. Vol. II. John Wiley & Sons. New York. 1944: 358.
96. Cabbage JW, Guo Y, McCulla RD, Jenks WS. Thermolysis of alkyl sulfoxides and derivatives: a comparison of experiment and theory. *The Journal of organic chemistry*. 2001;66(26):8722–36.
97. Küchenthal C-H, Migenda J, Polednia M, Maison W. An improved protocol for the preparation of (S)-vinylglycine from (S)-methionine. *Amino acids*. 2010;39(2):443–8.
98. Sollner Dolenc M, Pečar S. *Vaje iz farmacevtske kemije III*. 2. izdaja. Fakulteta za farmacijo. Ljubljana. 2000: 86, 90.
99. Trnka TM, Grubbs RH. The development of L2X2Ru=CHR olefin metathesis catalysts: an organometallic success story. *Accounts of chemical research*. 2001;34(1):18–29.
100. Casey CP. 2005 Nobel Prize in Chemistry. Development of the Olefin Metathesis Method in Organic Synthesis. *Journal of Chemical Education*. 2006;83(2):192.
101. Grubbs RH. Olefin metathesis. *Tetrahedron*. 2004;60(34):7117–40.
102. Vougioukalakis GC, Grubbs RH. Ruthenium-based heterocyclic carbene-coordinated olefin metathesis catalysts. *Chemical reviews*. 2010;110(3):1746–87.
103. Chatterjee AK, Choi T-L, Sanders DP, Grubbs RH. A general model for selectivity in olefin cross metathesis. *Journal of the American Chemical Society*. 2003;125(37):11360–70.
104. Roychowdhury A, Wolfert MA, Boons G-J. Synthesis and proinflammatory properties of muramyl tripeptides containing lysine and diaminopimelic acid

- moieties. *Chembiochem: a European journal of chemical biology*. 2005;6(11):2088–97.
105. Roy Chowdhury A, Boons G-J. The synthesis of diaminopimelic acid containing peptidoglycan fragments using metathesis cross coupling. *Tetrahedron Letters*. 2005;46(10):1675–8.
106. Scholl M, Ding S, Lee CW, Grubbs RH. Synthesis and activity of a new generation of ruthenium-based olefin metathesis catalysts coordinated with 1,3-dimesityl-4,5-dihydroimidazol-2-ylidene ligands. *Organic letters*. 1999;1(6):953–6.
107. Kawai T, Shida Y, Yoshida H, Abe J, Iyoda T. Cross-metathesis of vinyl aromatic heterocycles: comparison of Grubbs catalyst and Schrock catalyst. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 2002;190(1-2):33–43.
108. Sheppeck JE, Kar H, Hong H. A convenient and scaleable procedure for removing the Fmoc group in solution. *Tetrahedron Letters*. 2000;41(28):5329–33.
109. Tripathi R, Verma S, Pandey J, Tiwari V. Recent Development on Catalytic Reductive Amination and Applications. *Current Organic Chemistry*. 2008;12(13):1093–115.
110. Tarasevich V a, Kozlov NG. Reductive amination of oxygen-containing organic compounds. *Russian Chemical Reviews*. 1999;68(1):55–72.
111. 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. *Journal of the Iranian Chemical Society*. 2007;4(3):364–9.
112. Valeur E, Bradley M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chemical Society reviews*. 2009;38(2):606–31.
113. Correa RG, Khan PM, Askari N, Zhai D, Gerlic M, Brown B, et al. Discovery and characterization of 2-aminobenzimidazole derivatives as selective NOD1 inhibitors. *Chemistry & biology*. 2011;18(7):825–32.