

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



BRANKA VUKOVIĆ

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

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

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

Diplomsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Žige Jakopina, mag. farm. in somentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo ter na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem svojemu mentorju doc. dr. Žigi Jakopinu, mag. farm. in somentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, mag. farm., za ves vložen trud, strokovno pomoč, nasvete, čas ter potrpežljivost tekom izdelave diplomske naloge.

Hvala tudi mami in prijateljem, ki so mi skozi študijska leta stali ob strani.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja doc. dr. Žige Jakopina, mag. farm., in somentorice prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm.

Branka Vuković

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Iztok Grabnar, mag. farm.

Članica diplomske komisije: doc. dr. Nina Kočevar Glavač, mag. farm.

VSEBINA

VSEBINA	I
POVZETEK.....	IV
KLJUČNE BESEDE.....	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
1. UVOD.....	1
1.1. IMUNSKI SISTEM.....	1
1.2. BAKTERIJSKA CELIČNA STENA.....	4
1.2.1. Muramil dipeptid.....	5
1.3. RECEPTOR NOD2.....	6
1.3.1. Receptorji za prepoznavo molekulskih vzorcev (PRR).....	6
1.3.1.1. Receptorji NOD2 in njihova prepoznavna ligandov	8
1.4. ANALOGI MURAMIL DIPEPTIDA.....	10
1.4.1. Dezmuramildipeptidi.....	12
2. NAČRT ZA DELO.....	16
3. MATERIALI IN METODE.....	17
3.1. MATERIALI.....	17
3.2. METODE.....	17
3.2.1. Kromatografske metode	17
3.2.2. Spektroskopske metode.....	18
3.2.3. Določanje tališča	19
3.2.4. Biološko testiranje spojin	19
4. EKSPERIMENTALNI DEL	20
4.1. REAKCIJSKI SHEMI.....	20
4.2. Sinteza 2-(((2 <i>S</i>)-1-(((2 <i>R</i>)-1,5-dietoksi-1,5-dioksopentan-2-il)amino)-1-oksopropan-2-il)amino)-2-oksoetanaminijevega klorida (4).....	21
4.2.1. Sinteza (2 <i>R</i>)-1,5-dietoksi-1,5-dioksopentan-2-aminijevega klorida (1).....	21
4.2.2. Sinteza (2 <i>R</i>)-dietil 2-((2 <i>S</i>)-2-((<i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)propanamido)pentandioata (2).....	22
4.2.3. Sinteza (2 <i>R</i>)-dietil 2-((2 <i>S</i>)-2-(2-((<i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)acetamido)propanamido)pentandioata (3)	23
4.2.4. Sinteza 2-(((2 <i>S</i>)-1-(((2 <i>R</i>)-1,5-dietoksi-1,5-dioksopentan-2-il)amino)-1-oksopropan-2-il)amino)-2-oksoetanaminijevega klorida (4)	25
4.3. Sinteza (2 <i>R</i>)-dietil 2-((2 <i>S</i>)-2-(2-(indol-3-karbonsamido)acetamido)propanamido)pentandioata (5).....	26

4.4. Sinteza (2 <i>R</i>)-dietil 2-((2 <i>S</i>)-2-(2-(5-fluoroindol-2-karbonsamido)acetamido)propanamido)pentandioata (6).....	28
4.5. Sinteza (2 <i>R</i>)-dietil 2-((2 <i>S</i>)-2-(2-(5-bromoindol-2-karbonsamido)acetamido)propanamido)pentandioata (8).....	30
4.5.1. Sinteza 5-bromoindol-2-karbonsilne kisline (7).....	30
4.5.2. Sinteza (2 <i>R</i>)-dietil 2-((2 <i>S</i>)-2-(2-(5-bromoindol-2-karbonsamido)acetamido)propanamido)pentandioata (8).....	31
4.6. Sinteza (2 <i>R</i>)-dietil 2-((2 <i>S</i>)-2-(2-(5-nitroindol-2-karbonsamido)acetamido)propanamido)pentandioata (10).....	33
4.6.1. Sinteza 5-nitroindol-2-karbonsilne kisline (9).....	33
4.6.2. Sinteza (2 <i>R</i>)-dietil 2-((2 <i>S</i>)-2-(2-(5-nitroindol-2-karbonsamido)acetamido)propanamido)pentandioata (10).....	34
4.7. Sinteza (2 <i>R</i>)-dietil 2-((2 <i>S</i>)-2-(2-(5-dodekanamidoindol-2-karbonsamido)acetamido)propanamido)pentandioata (11).....	35
4.8. Sinteza (2 <i>R</i>)-dietil 2-((2 <i>S</i>)-2-(2-(5-fenilindol-2-karbonsamido)acetamido)propanamido)pentandioata (14).....	37
4.8.1. Sinteza etil 5-fenilindol-2-karbonsilata (12)	37
4.8.2. Sinteza 5-fenilindol-2-karbonsilne kisline (13).....	38
4.8.3. Sinteza (2 <i>R</i>)-dietil 2-((2 <i>S</i>)-2-(2-(5-fenilindol-2-karbonsamido)acetamido)propanamido)pentandioata (14).....	39
4.9. Sinteza (2 <i>R</i>)-dietil 2-((2 <i>S</i>)-2-(2-(1-metilindol-2-karbonsamido)acetamido)propanamido)pentandioata (15).....	41
4.10. Sinteza (2 <i>R</i>)-dietil 2-((2 <i>S</i>)-2-(2-(1-(4-fluorobenzil)indol-2-karbonsamido)acetamido)propanamido)pentandioata (16).....	43
4.11. Sinteza zmesi diastereoizomerov (2 <i>R</i>)-dietil 2-((2 <i>S</i>)-2-(2-(1-(<i>terc</i> -butoksikarbonil)indolin-2-karbonsamido)acetamido)propanamido)pentandioata (18)	45
4.11.1. Sinteza 1-(<i>terc</i> -butoksikarbonil)-indolin-2-karbonsilne kisline (17)	45
4.11.2. Sinteza zmesi diastereoizomerov (2 <i>R</i>)-dietil 2-((2 <i>S</i>)-2-(2-(1-(<i>terc</i> -butoksikarbonil)indolin-2-karbonsamido)acetamido)propanamido)pentandioata (18)	47
4.12. Sinteza zmesi diastereoizomerov 2-((2-(((2 <i>S</i>)-1-(((2 <i>R</i>)-1,5-dietoksi-1,5-dioksopentan-2-il)amino)-1-oksopropan-2-il)amino)-2-oksoetil)karbamoil)indolin-1-ijevega klorida (19).....	49
4.13. Sinteza (2 <i>R</i>)-dietil 2-((2 <i>S</i>)-2-(2-(2-okso-2-(fenilamino)acetamido)acetamido)propanamido)pentandioata (22)	50
4.13.1. Sinteza etil-2-okso-2-(fenilamino)acetata (20).....	50
4.13.2. Sinteza 2-okso-2-(fenilamino)ocetne kisline (21)	52
4.13.3. Sinteza (2 <i>R</i>)-dietil 2-((2 <i>S</i>)-2-(2-(2-okso-2-(fenilamino)acetamido)acetamido)propanamido)pentandioata (22)	53

4.14. Sinteza (2R)-dietil 2-((2S)-2-(2-cinamamidoacetamido)propanamido)pentandioata (23) ...	55
4.15. Sinteza (2R)-dietil 2-((2S)-2-(2-(pirol-2-karboksamido)acetamido)propanamido)pentandioata (24).....	57
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	59
5.1. SINTEZNI POSTOPKI.....	59
5.1.1. Tvorba amidne vezi.....	59
5.1.2. Zaščita aminske skupine v obliki karbamata in njena odščita.....	63
5.1.3. Sinteza in hidroliza estrov	65
5.1.4. Suzukijeva reakcija	66
5.2. BIOLOŠKO TESTIRANJE DEZMURAMILDIPEPTIDOV	67
6. SKLEPI.....	70
7. LITERATURA	71
PRILOGA	i

POVZETEK

Imunski sistem je obrambni mehanizem organizma s kompleksno strukturo, ki spada med najpomembnejše nosilce našega zdravja, saj ščiti organizem pred različnimi tujki, ki povzročajo bolezni. Zaradi njegove zapletene zgradbe obstaja veliko različnih tarč, na katere lahko vplivamo z učinkovinami in tako vplivamo na delovanje imunskega sistema. Ena izmed možnih tarč so receptorji z nukleotid vezočo oligomerizacijsko domeno 2 (NOD2), ki se nahajajo znotraj celice in kot ligande vežejo fragmente peptidoglikana, med drugim tudi muramil dipeptid in njegove analoge. Aktivacija receptorja NOD2 povzroči razne biološke učinke, ki vključujejo tudi aktivacijo transkripcijskega faktorja NF- κ B in sproščanje številnih citokinov, ki so pomembni tako pri prirojenem kot tudi pri pridobljenem imunskem sistemu.

V diplomskem delu smo načrtovali in sintetizirali nove agoniste receptorja NOD2, ki bi lahko delovali kot adjuvansi. Izhajali smo iz že znanega agonista receptorja NOD2 (2R)-dietil 2-((2S)-2-(2-(indol-2-karboksamido)acetamido)propanamido)pentandioata, katerega strukturo smo poskušali optimizirati in tako sintetizirali 13 končnih spojin. Sintetizirali smo acilirane analoge tripeptida Gly-L-Ala-D-Glu, kjer smo na tripeptid vezali razne karboksilne kisline, ki so vsebovale indolni obroč in podobne skupine, in sicer tako, da smo med tripeptidom in ustreznimi karboksilnimi kislinami s pomočjo sklopitvenega reagenta 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorida (EDC-HCl) tvorili amidno vez. Biološko testiranje, pri katerem so izmerili relativne aktivnosti NF- κ B v celicah HEK-Blue™ NOD2 po dodatku novo sintetiziranih spojin, je pokazalo, da je bila najboljši agonist receptorjev NOD2 spojina **14**, pri kateri je bil indolni obroč preko mesta 2 z amidno vezjo vezan na tripeptid, na mestu 5 indola pa je bila vezana fenilna skupina. Spojina je izkazovala dobro agonistično aktivnost glede na muramil dipeptid, ki je bil uporabljen kot pozitivna kontrola, in to kljub temu, da je bil prisoten še stranski produkt, ki je za razliko od spojine **14** na mestu 5 indola namesto fenilne skupine vseboval bromo skupino (spojina **8**, ki izkazuje šibko agonistično aktivnost). Dokaj dobro agonistično aktivnost je imela tudi spojina **23**, ki je vsebovala cinamoilni fragment in tako spojin **14** in **23** služita kot dobra osnova za nadaljnjo optimizacijo in testiranja za določitev njune uporabnosti kot adjuvansa.

ABSTRACT

The immune system is the defense mechanism of an organism with a complex structure and is one of the most important assurers of our health since it protects the organism against various disease-causing invaders. Due to its complex structure, there is a large variety of targets that can be influenced by active ingredients and thus influence the functioning of the immune system. One of the possible targets are nucleotide-binding oligomerization domain receptors 2 (NOD2), which are located within the cell and bind peptidoglycan fragments as ligands, including muramyl dipeptide and its analogues. Activation of NOD2 receptor causes various biological effects, including activation of the transcription factor NF- κ B and release of many cytokines, which are important in both innate as well as adaptive immune system.

In the thesis we designed and synthesized new NOD2 receptor agonists, which could act as adjuvants. We started from (2*R*)-diethyl 2-((2*S*)-2-(2-(indole-2-carboxamido)acetamido)propanamido)pentanedioate, already known to function as NOD2 receptor agonist, and we tried to optimize its structure, resulting in the synthesis of 13 final compounds. We synthesized acylated tripeptide Gly-L-Ala-D-Glu analogs, where we bound various carboxylic acids containing the indole ring and similar groups to the tripeptide by forming the amide bond between tripeptide and adequate carboxylic acids using the coupling reagent 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC-HCl). Biological testing, where the relative activity of NF- κ B in the HEK-Blue™ NOD2 cells was measured after the addition of synthesized compounds, showed that the best NOD2 receptor agonist was compound **14**, in which the indole ring was linked through amide bond to tripeptide at position 2 and the phenyl group was bound to the position 5 on the indole ring. The compound showed good agonistic activity with respect to muramyl dipeptide, which was used as a positive control, despite the presence of side product with bromo group at position 5 of indole ring (compound **8**, which has weak agonistic activity) instead of phenyl group in compound **14**. Also, compound **23** that contained cinnamoyl fragment had a fairly good agonistic activity and thus we conclude that compounds **14** and **23** are good basis for further optimization and testing to determine their usefulness as adjuvants.

KLJUČNE BESEDE

imunomodulator, receptor NOD2, dezmuramildipeptid, tripeptid Gly-L-Ala-D-Glu, aktivacija NF- κ B, prirojena imunost

SEZNAM OKRAJŠAV

ATP	adenozin trifosfat; <i>angl. adenosine triphosphate</i>
BOC	<i>terc</i> -butiloksikarbonil; <i>angl. N-tert-butoxycarbonyl</i>
CARD	domena kaspazne aktivacije; <i>angl. caspase recruitment domain</i>
CDCl₃	devteriran kloroform
CTL	citotoksični limfocit T
d	dublet
DAMP	molekulski vzorci povezani z nevarnostjo; <i>angl. danger associated molecular patterns</i>
DMAP	4-dimetilaminopiridin
DMSO-d₆	devteriran dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina; <i>angl. deoxyribonucleic acid</i>
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid; <i>angl. 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide</i>
eq	ekvivalent
HOBt	1-hidroksibenzotriazol
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti; <i>angl. high performance liquid chromatography</i>
HR-MS	masna spektrometrija visoke ločljivosti; <i>angl. high resolution mass spectrometry</i>
IFN	interferon
IKK	kinaza I κ B; <i>angl. IκB kinase</i>
IL	interlevkin

IR	infrardeča spektroskopija
IRF3	faktor regulacije interferona 3; <i>angl. interferon regulatory factor 3</i>
k	kvartet
LRR	domena, bogata z levcinom; <i>angl. leucine-rich repeat</i>
m	multiplet
MDP	muramil dipeptid
MHC	poglavitni kompleks tkivne skladnosti; <i>angl. major histocompatibility complex</i>
MF	mobilna faza
Mr	relativna molekulska masa
MS	masna spektroskopija
NF-κB	jedrni faktor κ B; <i>angl. nuclear factor κB</i>
NLR	NOD-u podoben receptor; <i>angl. NOD-like receptor</i>
NMR	jedrska magnetna resonanca; <i>angl. nuclear magnetic resonance</i>
NOD	nukleotid vezoča oligomerizacijska domena; <i>angl. nucleotide-binding oligomerization domain</i>
PAMP	molekulski vzorci povezani z mikrobi; <i>angl. pathogen associated molecular patterns</i>
PBMC	mononuklearne celice periferne krvi; <i>angl. peripheral blood mononuclear cells</i>
Rf	retencijski faktor
RIP-2	protein-2, ki interagira z receptorjem; <i>angl. receptor-interacting protein-2</i>
PMA	forbol-12-miristat-13-acetat; <i>angl. phorbol-12-myristate-13-acetate</i>
PRR	receptorji za prepoznavo molekulskih vzorcev; <i>angl. pattern recognition receptors</i>

RNA	ribonukleinska kislina; <i>angl. ribonucleic acid</i>
s	singlet
SEAP	izločena zarodna alkalna fosfataza; <i>angl. secreted embryonic alkaline phosphatase</i>
T	temperatura
t_R	retencijski čas
TBTU	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametil- <i>O</i> -(benzotriazol-1-il)-uronijev tetrafluoroborat
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoplastna kromatografija; <i>angl. thin layer chromatography</i>
TLR	Toll-u podoben receptor; <i>angl. Toll-like receptor</i>
TNF-α	tumor nekrotizirajoči faktor alfa
δ	kemijski premik

1. UVOD

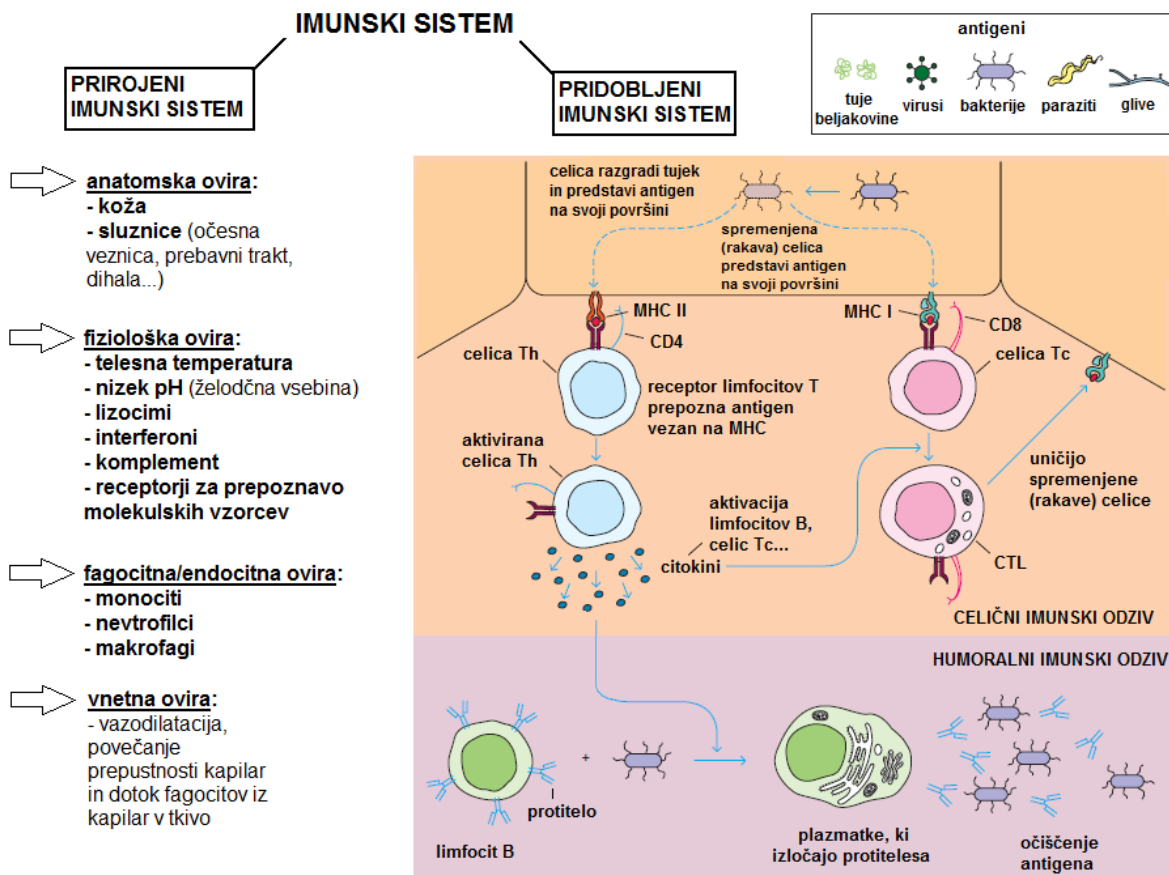
Ljudje so že pred poznavanjem imunskega sistema in njegovega delovanja začeli uporabljati številna tradicionalna zdravila, s katerimi so skušali povečati odpornost proti nalezljivim boleznim. V tradicionalnih zdravilih za zdravljenje okužb in vnetnih bolezni so navadno učinkovine s protimikrobnim in imunomodulatornim učinkom. Imunomodulatorji lahko zmanjšajo imunski odziv (imunosupresivno delovanje) ali pa ga povečajo oziroma obnavljajo njegovo oslABLJENO funkcijo (imunostimulatorno delovanje). Imunostimulatorno delujejo tudi adjuvansi, ki jih dodajamo cepivom z namenom povečanja imunskega odziva na antigene. Ker pa imajo tradicionalne imunomodulatorne učinkovine omejeno učinkovitost in neželene stranske učinke, je razvoj novih, izboljšanih in tarčnih imunoterapevtikov izjemno pomemben.

1.1. IMUNSKI SISTEM

Naloga imunskega sistema je ubraniti organizem pred patogenimi mikroorganizmi, njihovimi toksini in rakavimi celicami. Imunski sistem je funkcionalno razdeljen na prepoznavanje tujega antigena (prepoznavna funkcija) in odziv nanj (izvršna funkcija). Prepoznavanje je izjemno specifično, saj imunski sistem lahko prepozna majhne razlike v kemijski strukturi, ki ločijo določene patogene mikroorganizme od nepatogenih, lahko pa razlikuje tudi med tujimi in lastnimi celicami ali beljakovinami. Ko imunski sistem prepozna antigen, aktivira različne celice in molekule, ki sodelujejo pri efektorskem odzivu in antigen odstranijo ali nevtralizirajo.

Imunski sistem delimo na prirojeno in pridobljeno imunost, ki sta odvisni ena od druge (slika 1). Manj specifična komponenta imunskega sistema je prirojena imunost, ki predstavlja prvo linijo obrambe proti okužbi in obsega štiri tipe obrambnih ovir: anatomsko (koža, sluznice), fiziološko (telesna temperatura, nizek pH, lizocimi, interferoni, komplement, razni receptorji), fagocitno/endocitno (monociti, nevtrofilci, makrofagi) in vnetno oviro. Večina tujkov, s katerimi se srečajo zdravi posamezniki, je navadno hitro očiščenih v nekaj dneh z obrambnimi mehanizmi prirojenega imunskega odziva. Nasprotno od prirojene imunosti pa je pridobljena imunost visokospecifična. Do pridobljenega imunskega odziva proti nekemu antigenu navadno pride v petih do šestih

dneh po začetni izpostavljenosti le-temu, ponovna izpostavljenost enakemu antigenu pa ima za posledico spominski odziv – imunski odziv se po drugem izzivu pojavi hitreje kot prvič, je močnejši in pogosto učinkovitejši.



Slika 1: Delitev imunskega sistema

Pri pridobljenem imunskem odzivu sodelujejo limfociti B, limfociti T in antigen predstavitevne celice, ki vključujejo monocite, makrofage, dendritične celice in nekatere epiteljske celice. Limfociti B nastanejo in dozoriyo znotraj kostnega mozga in ko ga zapustijo, na svoji membrani izrazijo protitelesa, ki predstavljajo edinstven vezavni receptor za antigen. Ko se limfocit B prvič sreča z antigenom, ki se ujema z njegovim protitelesom, se antigen in protitelo povežeta in to povzroči hitro delitev celice, njene hčerinske celice pa se diferencirajo v spominske celice B in efektorske celice B, imenovane plazmatke. Limfociti T nastanejo v kostnem mozgu in dozoriyo v timusu. Na svoji membrani izražajo receptorje, ki lahko za razliko od limfocitov B prepoznavajo le antigen, ki je vezan na beljakovino celične membrane na površini antigen predstavitevne celice, imenovano poglavitni kompleks tkivne skladnosti razreda I in II (MHC I in

MHC II). Poznamo celice T pomagalke (Th), ki imajo na svoji površini membranski glikoprotein CD4, in citotoksične celice T (Tc), ki imajo na svoji površini membranski glikoprotein CD8. Celice Th prepoznajo in interagirajo z molekulskim kompleksom antigen–MHC II, se aktivirajo in postanejo efektorske celice ter pričnejo izločati razne citokine, ki so pomembni pri usmerjanju imunskega odziva (so mediatorji imunskega odziva) (preglednica I). Celice Tc, ki prepoznajo molekulski kompleks antigen–MHC I, se pod vplivom citokinov delijo in diferencirajo v citotoksične limfocite T (CTL). Celice Th nastopajo v več oblikah, in sicer kot celice pomagalke tipov Th0, Th1 in Th2. Prepoznavna mikrobnega antigena navadno sproži Th1 vnetni citokinski odziv, saj celice Th1 aktivirajo makrofage in CTL (1,2).

Preglednica I: Pregled nekaterih pomembnejših citokinov

Citokin	Celice, ki ga izločajo	Delovanje
Interlevkin (IL-1)	monociti, makrofagi, endotelijske in epiteljske celice	mediator vnetja, vpliv na hipotalamus (povišana telesna temperatura), sinteza beljakovin akutne faze v jetrih, zgodnja aktivacija limfocitov T, spodbujanje nastajanja IL-6
Tumorje nekrotizirajoči faktor- α (TNF- α)	makrofagi	mediator vnetja, sinteza beljakovin akutne faze v jetrih, spodbujanje nastajanja IL-6, kaheksija, aktivacija nevtrofilcev, apoptoza mnogih celic
Interlevkin 6 (IL-6)	makrofagi in endotelijske celice	sinteza beljakovin akutne faze v jetrih, diferencijski faktor limfocitov B (omogoča dokončno dozorevanje), vpliv na limfocite T, sprožitev dozorevanja trombocitov
Interlevkin 10 (IL-10)	makrofagi in celice Th2	mediator vnetja, zmanjša izražanje citokinov Th1 (IFN- γ , IL-2, IL-3, TNF- α), uravnava delovanje imunskega sistema v prebavilih
Interlevkin 12 (IL-12)	makrofagi in dendritične celice	diferenciacija limfocitov T, sinteza IFN- γ
Interferona tipa I (IFN- α in IFN- β)	IFN- α izločajo makrofagi, IFN- β pa fibroblasti	obramba pred virusnimi okužbami (indukcija sinteze protivirusnih beljakovin, spodbujanje celičnega imunskega odziva), povečano izražanje MHC I
Interlevkin 8 - kemokin (IL-8)	makrofagi	kemotaktični faktor za nevtrofilce, sodeluje pri angiogenezi
Interlevkin 18 (IL-18)	makrofagi	sinteza IFN- γ
Interferon tipa II (IFN- γ)	makrofagi	spodbujanje Th1, aktivacija makrofagov, spodbuja izražanje MHC I in MHC II na celicah

1.2. BAKTERIJSKA CELIČNA STENA

Bakterijska celična stena je dinamična struktura, ki obdaja citoplazemsko membrano in daje celici integriteto, uravnava osmotski tlak citoplazme, določa obliko celice ter jo ščiti pred zunanjimi vplivi. Glavna sestavina celične stene večine bakterij je peptidoglikan. Gramnegativne bakterije vsebujejo tanko plast peptidoglikana (približno 10 nm), ki predstavlja le 5–10 % mase celične stene, medtem ko peptidoglikan pri grampozitivnih bakterijah predstavlja kar 90 % mase celične stene in je debelejši ter sestavljen iz več plasti (približno 20–80 nm).

Peptidoglikan je zgrajen iz številnih polisaharidnih verig, ki tvorijo ogrodje in so med seboj prečno povezane s kratkimi peptidi. Polisaharidne verige sestavljajo izmenične enote *N*-acetilglukozamina in *N*-acetilmuraminske kisline, ki sta med seboj povezani z β -1,4 glikozidno vezjo. *N*-acetilmuraminske kisline so povezane s kratkimi peptidi, ki so med seboj prečno povezani in tako tvorijo mrežo okoli bakterijske celice. Kratki peptid je sestavljen iz štirih do petih aminokislin, in sicer L-alanina, D-glutaminske kisline, L-lizina ali mezo-diaminopimelinske kisline in D-alanina. Pri vseh gramnegativnih bakterijah in pri nekaterih paličastih grampozitivnih bakterijah je tretja aminokislina kratkega peptida mezo-diaminopimelinska kislina, pri večini grampozitivnih bakterij pa L-lizin. Tretja aminokislina kratkega peptida je preko transpeptidnega mostička prečno vezana s četrto aminokislino sosednjega kratkega peptida, transpeptidna povezava pa lahko vsebuje tudi eno ali več dodatnih aminokislin (pri grampozitivnih bakterijah je pogost pentaglicinski mostiček). Tako pri gramnegativnih kot tudi pri grampozitivnih bakterijah lahko pride do sprememb v aminokislinski sestavi kratkega peptida. Namesto prve aminokisline L-alanina ponavadi najdemo L-serin ali glicin, druga aminokislina D-glutaminska kislina pa je lahko zamenjana z amidirano glutaminsko kislino, glicinom, amidiranim glicinom ali amidiranim alaninom. Najpogostejša je sprememba tretje aminokisline, kjer namesto L-lizina ali mezo-diaminopimelinske kisline najdemo tudi L-ornitin, hidroksi-lizin in ostale zamenjave (3, 4, 5).

1.2.1. Muramil dipeptid

Muropeptidi so razgradni produkti peptidoglikana, ki se sprostijo ob stiku bakterije z gostiteljevim obrambnim sistemom (lizocimi, amidaze) ali po antibiotičnem zdravljenju. Sestavljeni so iz ene ali več enot *N*-acetilmuraminske kisline, ki je vezana z vsaj eno aminokislino (6).

Pomemben muropeptid je *N*-acetilmuramil-L-alanil-D-izoglutamin (muramil dipeptid, MDP), minimalen del peptidoglikana, skupen grampozitivnim in gramnegativnim bakterijam, ki je od leta 1970 znan kot najmanjši strukturni fragment peptidoglikana, ki izkazuje adjuvantno aktivnost (7). MDP deluje imunomodulatorno tako, da stimulira monocite in makrofage in na ta način okrepi gostiteljev prirojeni obrambni mehanizem proti bakterijskim, virusnim in parazitskim okužbam ter tumorjem. Aktivacija makrofagov ima za posledico povečano produkcijo reaktivnih kisikovih zvrsti (superoksid, peroksid), ki so ključni za uničenje patogenov in izkazujejo tudi protitumorno delovanje. Aktivirani makrofagi imajo tudi zvišano produkcijo vnetnih citokinov, kot sta IL-1 β in TNF- α , ki aktivirata nevtrofilce, limfocite B in limfocite T, ki odstranijo patogene, delujeta pa tudi na centralni živčni sistem in sprožita fiziološke odzive, kot sta zvišana telesna temperatura in spanje, ki prav tako pripomoreta v boju proti okužbi. MDP z imunomodulatornim učinkom torej vpliva na prirojeno odpornost in tudi na vnetne procese (8).

Receptor z nukleotid vezočo oligomerizacijsko domeno 2 (NOD2) so potrdili kot receptor, ki prepozna MDP (9, 10). Prepoznavanje preko receptorja NOD2 pa je povezano z adjuvantnim učinkom MDP. Makrofagi pri odzivu na MDP proizvedejo minimalne količine vnetnih citokinov, medtem ko MDP v kombinaciji z nekaterimi spojinami privede do močnega sinergističnega delovanja in močno povečane produkcije vnetnih citokinov. *In vitro* so na različnih celicah, kot so mononuklearne celice periferne krvi (PBMC), izolirani monociti, monocitne celične linije pa tudi v polni krvi ter *in vivo* na podganah pokazali, da pride do močnega sinergističnega delovanja med MDP in lipopolisaharidom, ki je agonist receptorja TLR4. MDP deluje sinergistično tudi z drugimi agonisti receptorjev TLR, kot so lipoteihoična kislina (agonist receptorja TLR2), aktivacijski lipopeptid makrofagov (MALP-2) in Pam3CSK, kar so proučevali na človeških PBMC in različnih monocitnih celičnih linijah, nasprotno pa niso odkrili sinergističnega učinka med MDP in lipoteihoično

kislino v človeški polni krvi (6, 11, 12, 13, 14). Sam MDP je sicer močan induktor TNF- α mRNA, a je za njeno translacijo v beljakovino potrebna prisotnost lipopolisaharida (15).

Pri večini bakterij je MDP *N*-acetiliran, pri mikobakterijah in sorodnih bakterijah iz razreda *Actinomyces* pa ga encim NamH (hidroksilaza *N*-acetilmuraminske kisline) pretvori v *N*-glikolirano obliko, ki se je izkazala še za boljšega aktivatorja receptorjev NOD2 (16).

1.3. RECEPTOR NOD2

Receptor NOD2 spada v veliko skupino receptorjev za prepoznavo molekulskih vzorcev (PRR), natančneje v družino NOD-u podobnih receptorjev (NLR).

1.3.1. Receptorji za prepoznavo molekulskih vzorcev (PRR)

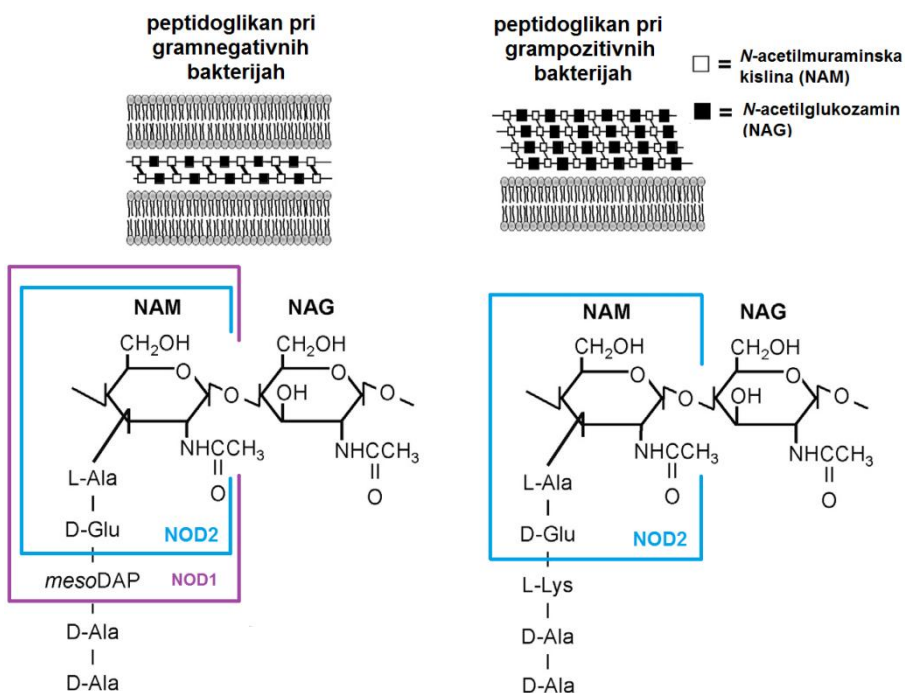
PRR se nahajajo v celičnih membranah in citosolu, in ko le-ti prepoznajo molekulske vzorce povezane z mikrobi (PAMP) ali molekulske vzorce povezane z nevarnostjo (DAMP), se aktivirajo obrambne reakcije gostitelja. Primeri PAMP so deli mikrobov, kot so lipopolisaharid pri gramnegativnih bakterijah, lipoteihoična kislina pri grampozitivnih bakterijah, peptidoglikan, lipoproteini, mikrobna ribonukleinska kislina (RNA) in deoksiribonukleinska kislina (DNA), medtem ko med DAMP sodijo endogeni celični produkti, povezani s poškodbo tkiva, kot so beljakovine toplotnega šoka in okvarjene nukleinske kisline (17, 5). Glede na lokalizacijo, molekulsko strukturo in vzorce, ki jih prepoznajo, delimo PRR na več družin. Na celični površini ali na membranah endosomov se nahajata družina TLR in družina receptorjev lektina tipa C, v citoplazmi pa najdemo družino NOD-u podobnih receptorjev (NLR), družino RIG-u podobnih helikaznih receptorjev, ki zaznajo virusno RNA ter citosolne senzorcje DNA, RNA-polimerazo III in druge (18).

Receptorji iz družine NLR so pomembni pri prirojenem imunskem odzivu, kot tudi pri vnetju, saj so odkrili, da so polimorfizmi in mutacije NLR povezani s povečano dovzetnostjo za nekatere vnetne bolezni. Pri ljudeh je bilo do sedaj odkritih 22 NLR. Vsi receptorji iz te družine so zgrajeni iz treh domen, in sicer sta za večino značilni C-terminalna domena, bogata z levcinom (LRR), ki zazna ligand in centralna domena

(NACHT), ki je odgovorna za oligomerizacijo receptorja, medtem ko glede na tretjo *N*-terminalno efektorsko domeno družino NLR delimo v štiri poddružine (17, 18):

- NLRA: transaktivator razreda II vsebuje kislo transaktivacijsko domeno,
- NLRB: NAIP vsebuje ponovitveno domeno bacilovirusnega inhibitorja,
- NLRC: receptor z nukleotid vezočo oligomerizacijsko domeno 1 (NOD1), NOD2, NLRC3, NLRC4, NLRC5 vsebujejo domeno kaspazne aktivacije (CARD) in NLRX1 brez *N*-terminalne domene,
- NLRP: NLRP1 - NLRP14 vsebujejo piridinsko domeno.

Najbolj raziskana receptorja iz družine NLR sta topna proteina NOD1 in NOD2, ki v citosolu zaznavata prisotnost peptidoglikanskih komponent. Receptorji NOD1 so izraženi v različnih tkivih in celicah, njihovi ligandi pa so fragmenti bakterijske celične stene, ki vsebujejo mezo-diaminopimelinsko kislino. Za razliko od receptorjev NOD1 pa je ekspresija receptorjev NOD2 omejena predvsem na monocite, kot ligand pa prepoznajo MDP in njegove analoge (slika 2). Razlika med njima je tudi v sestavi, in sicer receptorji NOD1 vsebujejo eno domeno CARD, receptorji NOD2 pa dve (19, 20, 21). Pri našem delu se bomo osredotočili na receptorje NOD2 in njihove možne ligande.



Slika 2: Del peptidoglikana, ki ga zaznajo receptorji NOD

1.3.1.1. Receptorji NOD2 in njihova prepoznavna ligandov

Receptor NOD2 v citosolu preko C-terminalnega dela domene LRR prepozna MDP, ki ga drugi PRR, kot so NOD1, TLR2 in TLR4, ne zaznajo (9, 10). Novejša odkritja kažejo, da za prepoznavanje MDP morda ni odgovorna domena LRR, saj so ugotovili, da je za prepoznavo MDP dovolj le centralna domena NACHT (22). Ko se MDP sprosti iz peptidoglikana, mora skozi plazemsko membrano vstopiti v citosol gostiteljeve celice. V celico ga lahko prenesejo transporterji plazemske membrane in eden takih je transporter hPepT, ki je izražen v epiteljskih in fagocitnih celicah in specifično prenaša MDP (stereoizomer L-Ala-D-Glu), ne pa tudi ostalih muropeptidov, ki aktivirajo receptorje NOD2 in NOD1 (23). Vezavno mesto MDP na receptorju NOD2 za zdaj še ni natančno poznano, bilo pa je izvedenih nekaj študij, ki so proučevale vezavo med MDP in receptorjem NOD2. V eni izmed študij so pokazali, da se na prečiščeni rekombinantni protein NOD2 najprej veže adenozin trifosfat (ATP), kar hidrolizira ATP, temu pa sledi neposredna vezava MDP na receptor NOD2 ter oligomerizacija v signalni kompleks. Odkrili so, da sta vezava proteina NOD2 na MDP in oligomerizacija proteina NOD2 okrepljeni z vezavo ATP (22). V drugi študiji, ki prav tako kaže na neposredno povezavo med MDP in receptorjem NOD2, so pokazali tudi, da stereokemija aminokislina Glu ni ključna za prepoznavo, saj se je receptor NOD2 z visoko afiniteto vezal na MDP, ki je vseboval D-Glu ali L-Glu. Pokazali so tudi, da je interakcija med receptorjem NOD2 in MDP najboljša v pH območju 5.0 - 6.0, in da ATP ni nujno potreben za vezavo (24).

V perifernih krvnih celicah so najvišje ravni izraženega proteina NOD2 zasledili v monocitih, granulocitih, dendritičnih celicah in Panethovih celicah ter v manjšem obsegu v limfocitih T (25). Receptor NOD2 je v citosolu prisoten v neaktivni obliki, in ko se nanj vežejo fragmenti peptidoglikana, pride najprej do konformacijskih sprememb domene LRR, nato pa do oligomerizacije domene NACHT in do interakcije med domeno CARD receptorja NOD2 in domeno CARD proteina-2, ki interagira z receptorjem (RIP-2). Interakcija CARD-CARD povzroči poliubikvitinacijo (sekundarna modifikacija proteina) in razgradnjo inhibitorja kinaze κB γ (IKK γ), ki mu rečemo tudi esencialni modulator NF- κB (NEMO), kar vodi v aktivacijo kinaze I κB (kompleks IKK - IKK α in IKK β). Kinaza I κB je encimski kompleks, ki je vpleten pri celičnem odzivu na vnetje in je ključen za aktivacijo transkripcijskega faktorja NF- κB . Inhibitorni protein I $\kappa\text{B}\alpha$ (inhibitor κB)

inaktivira transkripcijski faktor NF- κ B, tako da prikrije signale jedrske lokalizacije za proteine NF- κ B, ki tako ostanejo v neaktivnem stanju v citoplazmi. Aktiviran kompleks IKK specifično fosforilira inhibitorni protein I κ B α in temu sledi njegova proteasomska razgradnja. Transkripcijski faktor NF- κ B je tako prost in se translocira v jedro, kjer povzroči ekspresijo vsaj 150 genov, ki sprožijo prirojeni imunski odziv, pri čemer pride do transkripcije številnih citokinov in kemokinov, kot so pro-IL-1 β , pro-IL-18, IL-8, IL-6, TNF- α , MIP2, CCL2 in tudi do apoptoze (5, 26).

Aktivacija receptorja NOD2 pa ima poleg aktivacije transkripcijskega faktorja NF- κ B tudi druge biološke učinke. Receptor NOD2 preko interakcije z beljakovino ATG16L1 sproži tvorbo avtofagosomov, avtofagija pa je prav tako ključna pri obrambi pred bakterijskimi, virusnimi in parazitskimi okužbami (27). Poleg tega receptorje NOD2 aktivirajo tudi virusi z enoverižno RNA, kot so respiratorni sincicijski virus (RSV), virus vezikularnega stomatitisa (VSV) in virus gripe. Sledi izločanje IFN I, ki je odvisno od faktorja regulacije interferona 3 (IRF3) in protivirusna odpornost. Pri tej signalni poti ne sodeluje RIP-2, ampak je za aktivacijo IRF3 potrebna mitohondrijska protivirusna signalna beljakovina (MAVS), ki se nahaja v mitohondriju, kjer je 7 % vseh receptorjev NOD2. Ugotovili so, da je produkcija IFN I potrebna za produkcijo IL-10, ki je protivnetni citokin, ključen za supresijo vnetja v črevesju (27, 28). Receptor NOD2 je tudi ključni senzor komenzalne mikroflore v črevesju (signalizacija nadzira število in sestavo komenzalne mikroflore) ter regulator gostiteljeve črevesne homeostaze in vnetja (zaščitna odpornost) (27).

Imunski sistem je zaradi različnih razlogov lahko okvarjen, in v tem primeru ne deluje pravilno, in sicer lahko deluje prešibko (nastanejo bolezni imunske pomankljivosti), včasih pa reagira tudi proti tujkom, proti katerim ne bi smel (npr. proti alergenom ali lastnemu tkivu), kar vodi do nastanka alergij (preobčutljivostnih reakcij) ali avtoimunih bolezni. Mutacije proteina NOD2 so povezane s povečano dovzetnostjo za nekatere kronične vnetne bolezni, kot so Crohnova bolezen, Blau sindrom, atopični dermatitis in sarkoidoza z zgodnjim začetkom in večjim številom malignih obolenj (zgodnji pojav raka dojke, ne-Hodgkinov limfom, melanom, pljučni rak) ter negativnimi izidi po kirurški transplantaciji, mehanizem teh povezav pa še ni povsem pojasnjen. Pri bolnikih s Crohnovo boleznijo (kronična vnetna bolezen gastrointestinalnega trakta) so odkrili večjo pogostnost ene izmed treh mutacij receptorja NOD2 in pri teh bolnikih je zaznavanje MDP

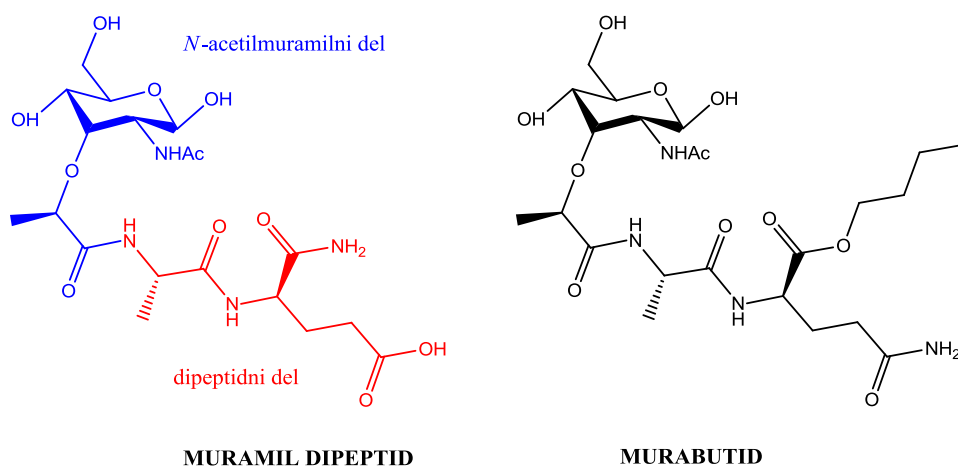
preko receptorjev NOD2 okvarjeno (17, 19, 25). Poleg vpliva na prirojeni imunski sistem, pa lahko receptor NOD2 aktivira tudi pridobljeni imunski sistem, tako da deluje kot adjuvans pri tvorbi protiteles, bodisi neposredno ali pa z vplivom na povečano tvorbo imunostimulatornih spojin (citokini IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12p70, IFN- γ). Ugotovili so, da je receptor NOD2 potreben za izražanje podskupine črevesnih protimikrobnih beljakovin (α -defenzini pri ljudeh), ki v večini nastanejo v Panethovih celicah in imajo pomembno protimikrobno aktivnost pri okužbah s patogenimi bakterijami. Receptor NOD2 ima torej ključno in specifično vlogo pri zaščiti pred bakterijskimi okužbami (29). Crohnova bolezen je povezana z visokimi koncentracijami vnetnih citokinov, kot so TNF- α , IL-1 β , IL-6 in IL-12. Protitelesa proti TNF- α , IL-6 in IL-12, kot tudi neposredna inhibicija NF- κ B (znani tarči NF- κ B sta gena IL-1 β in TNF- α) trenutno predstavljajo razmeroma učinkovite terapije te bolezni. Zmanjšanje izražanja genov za vnetne mediatorje bi lahko bila alternativna strategija pri zdravljenju teh vnetnih odzivov, nasprotno pa sta citokina TNF- α in IL-1 β pomembna mediatorja prirojenega imunskega odziva in mora biti z imunomodulatorji dosežena ustrezna homeostaza. Inhibitorji receptorjev NOD2 bi torej lahko bile potencialne spojine za zdravljenje raznih kroničnih vnetnih bolezni, medtem ko bi bili agonisti receptorjev NOD2, na katere se bomo pri našem delu tudi osredotočili, lahko potencialni adjuvansi.

1.4. ANALOGI MURAMIL DIPEPTIDA

Do povezave med MDP in receptorjem NOD2, kot je znano, pride znotraj celice in zato ima ekstracelularno prisoten MDP v odsotnosti emulgirajočih lipidnih spojin, kot so liposomi ali parafinsko olje, slabo imunostimulatorno delovanje (9). MDP ima nekatere pomanjkljivosti, kot so hidrofilnost, hitro izločanje, pirogenost, artritogenost in sprožitev avtoimunskih odzivov, zaradi česar ni klinično uporaben kot imunomodulator (19, 30). Z namenom izboljšanja farmakoloških lastnosti in zmanjšanja toksikološkega profila MDP so bili sintetizirani že številni derivati. Murabutid je varen in apirogen derivat MDP, ki aktivira receptorje NOD2, okrepi antigenske odzive, okrepi gostiteljevo odpornost proti mikrobnim okužbam in nespecifično odpornost proti tumorjem in ima še druge biološke učinke, a zaradi hitre eliminacije in slabe biološke uporabnosti po peroralnem dajanju ni uporaben kot imunomodulator (slika 3). Klinično fazo razvoja so dosegli tudi derivati, kot

so temurtid, nor-MDP, glukozaminil-MDP (GMDP), romurtid in muramil tripeptid fosfatidiletanolamin (MTP-PE) (31, 32). Kljub temu, da ima sam MDP slabo protitumorno aktivnost, so se nekateri derivati MDP izkazali kot zanimivi kandidati za potencialne protitumorne učinkovine. Acilacija MDP z mikolnimi kislinami, hidroksimaščobnimi kislinami in kinonilalkanojskimi kislinami je privedla do spojin s protitumorno aktivnostjo (33).

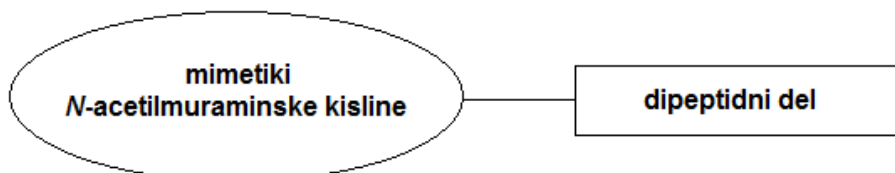
Ker za zdaj še ni podatkov o tem, kateri del v strukturi MDP je odgovoren za vezavo, je načrtovanje novih imunomodulatorjev oteženo. Odnos med strukturo in delovanjem že dobro znanih imunomodulatornih spojin je tako edini način za racionalno načrtovanje novih učinkovin.



Slika 3: MDP in njegov analog murabutid

Ugotovili so, da je za aktivacijo receptorja NOD2 in imunomodulatorno aktivnost potreben nespremenjen dipeptidni del MDP (10). Dipeptidni del je v naravi prisoten v obliki izomerov L-Ala in D-Glu, njegova stereokemija pa je pomembna pri prepoznavanju receptorja NOD2. Cottagnoud in sodelavci so proučevali vpliv stereokemije dipeptidnega dela na vnetni odziv pri zajcih, ki so bili okuženi z bakterijskim meningitisom (bakterija *Streptococcus pneumoniae*) ter tudi *in vitro* na človeških PBMC-jih in ugotovili, da sta *N*-acetilmuramil-L-Ala-D-Glu ter *N*-acetilmuramil-L-Ala-L-Glu sprožila izločanje TNF- α , *N*-acetilmuramil-D-Ala-D-Glu pa je bil povsem neaktiven. Torej je za imunomodulatorno delovanje ključna predvsem prisotnost L-alanina (34). Receptor NOD2 prepozna tudi daljše peptidne dele, če je na tretjem mestu peptida aminokislina lizin ali ornitin. Ugotovili so, da pri zaznavanju receptorja NOD2 za interakcijo ni pomembna dolžina tretje

aminokislina v peptidni verigi, ampak kemijske značilnosti α -karboksilne skupine (26). *N*-acetilmuramilni del je prav tako pomemben, ni pa ključen za imunomodulatorno delovanje, zato je njegova derivatizacija ali pa nadomeščanje z različnimi acilnimi skupinami (mimetiki) pomemben pristop pri načrtovanju in sintezi novih imunološko aktivnih analogov MDP (9, 33).

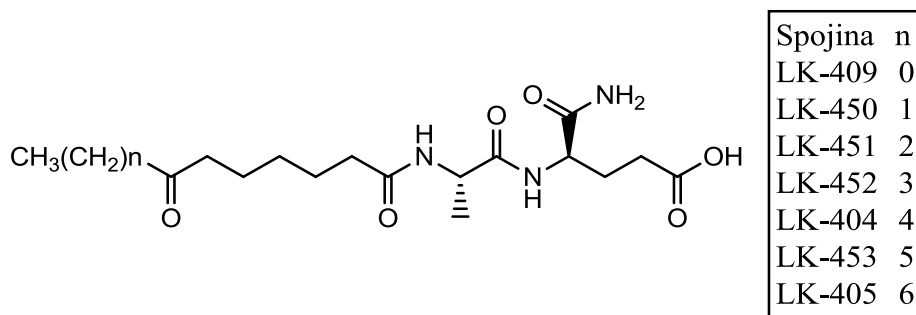


Slika 4: Načrtovanje analogov MDP

1.4.1. Dezmuramildipeptidi

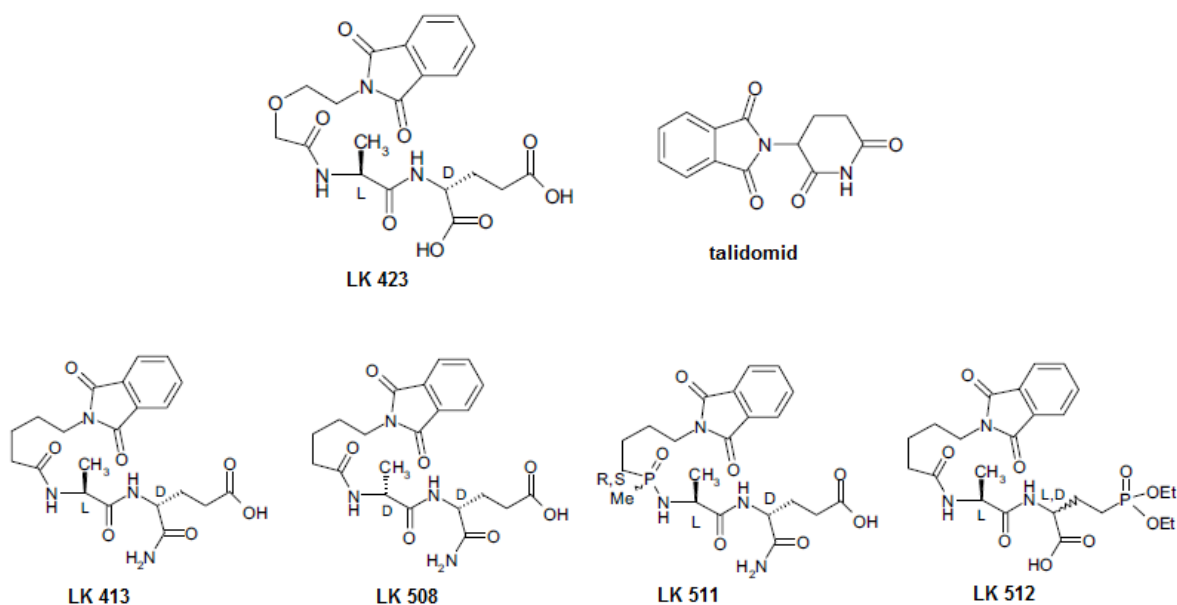
Dezmuramildipeptidi so derivati MDP brez sladkornega dela, zaradi česar so bolj lipofilni in lahko v celico vstopajo s pasivnim transportom, ki je odvisen od lipofilnosti spojine, bolj lipofilni analogi MDP pa imajo hkrati tudi večjo adjuvantno aktivnost (33, 35). Sintetiziranih je bilo že veliko dezmuramildipeptidov in pokazali so, da le-ti okrepijo gostiteljevo obrambo proti mikrobnim okužbam, nekateri pa so kazali močno protivirusno aktivnost, adjuvantno aktivnost in izjemno antitumorno aktivnost (32).

Sollner in sodelavci so sintetizirali dezmuramildipeptide, kjer so kot zamenjavo za *N*-acetilmuramilni del uporabili različne 7-oksoacilne skupine z naraščajočim številom metilnih skupin in posledično naraščajočo lipofilnostjo (slika 5). Ohranili so samo karbonilno skupino *N*-acetilmuramilnega dela na 7. mestu. Ugotovili so, da je bil analog MDP brez karbonilne skupine na 7. mestu acilnega dela neaktiven in tako sklepali, da ta skupina prispeva k prepoznavanju in vezavi ter posledični imunološki aktivnosti MDP. Imunološko aktivnost novih dezmuramildipeptidov so testirali na miših, ki so jim okvarili imunsko funkcijo s ciklofosfamidom in jih nato okužili z glivo *Candida albicans* ter ugotovili, da je število preživelih miši odvisno od lipofilnosti proučevanih spojin. Spojina **LK-409** je v primerjavi z MDP ohranila aktivnost na imunski sistem, prišlo pa je do popolne izgube pirogenosti, kar kaže na to, da *N*-acetilmuraminski del tudi prispeva k pirogenosti MDP. Še bolj lipofilen analog **LK-404** je bil najbolj aktiven, še dodatno povečanje lipofilnosti pa je zmanjšalo biološko aktivnost (36).



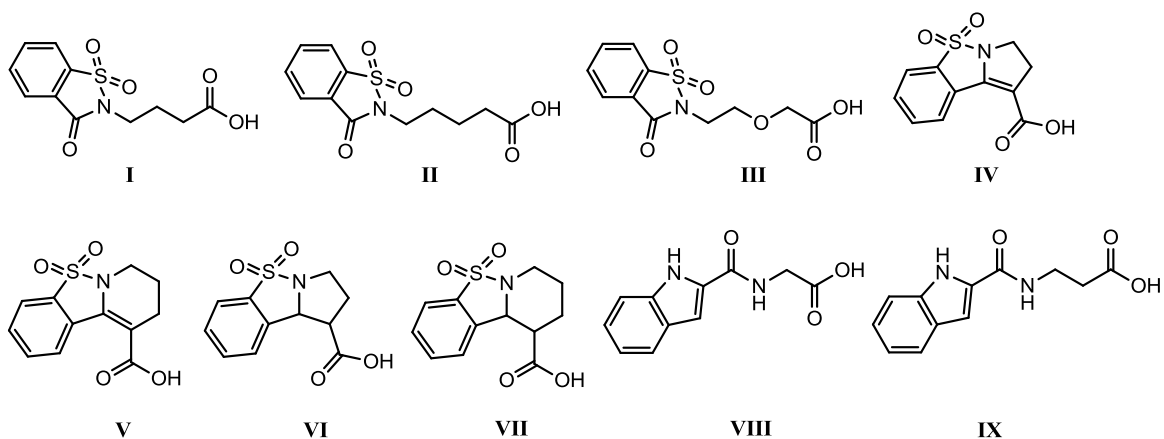
Slika 5: Dezmuramildipeptidi s 7-oksoacilnim fragmentom

Kot primerna zamenjava za *N*-acetilmuramilni del so se izkazali tudi lipofilni ftalimidni analogi (slika 6). Sedativ talidomid, ki vsebuje ftalimidni del, ima imunomodulatorno aktivnost, saj lahko odvisno od tipa celic okrepi ali zmanjša produkcijo TNF- α , prav tako pa lahko tudi nekatere druge spojine s ftalimidnim fragmentom vplivajo na imunski sistem. Kot obetavna spojina s protivnetnim učinkom se je izkazala spojina **LK-423**, za katero so ugotovili, da prehaja plazemsko membrano s pasivnim transportom. Sintetizirali so tudi razne derivate (**LK-413**, **LK-508**, **LK-511**, **LK-512**), ki so sorodni spojinam **LK-423** in tudi njihovo aktivnost glede na MDP ocenili *in vitro* na človeških PBMC-jih, aktiviranih z ionomicinom in forbol-12-miristat-13-acetatom (PMA). Vsi so enako kot spojina **LK-423** povzročili produkcijo citokinov, nobeden pa ni imel citotoksičnega učinka (33, 37).



Slika 6: Dezmuramildipeptidi s ftalimidnim fragmentom

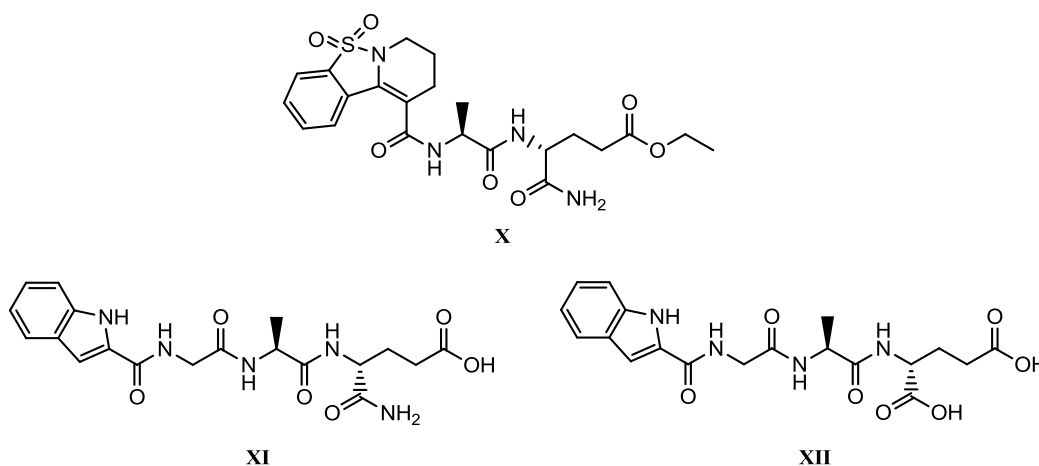
Za nadomestitev *N*-acetilmuramilnega dela so Jakopin in sodelavci uporabili devet različnih mimetikov (slika 7). Uporabili so aciklične karboksilne kisline različnih dolžin, ki so vsebovale saharin, kjer so poskušali ohraniti specifično lego karbonilne skupine (spojine **I-III**). Konformacijsko restrikcijo saharinskih analogov so dosegli tako, da so alkilno stran verige vključili v pirido- ali pirolo-kondenziran(1,2)benzizotiazolni obročni sistem (spojine **IV-VII**). Nato so uporabili pristop kombiniranja dveh farmakoforov v eno spojino in dobili indol-2-ilkarboksamidni del kot zamenjavo za *N*-acetilmuramilni del (spojini **VIII in IX**). Indol-2-ilkarboksamidni del je prisoten v enem izmed prvih poročanih selektivnih antagonistov receptorja H4 (histaminski receptor). Ker ima ta receptor ključno vlogo pri alergiji in vnetju so domnevali, da bi vezava takega dela na dipeptid lahko proizvedla nove imunomodulatorne učinkovine.



Slika 7: Mimetiki *N*-acetilmuramilnega dela

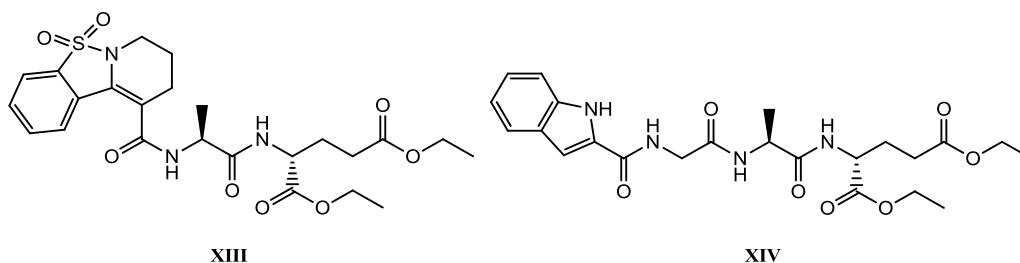
Mimetičke *N*-acetilmuramilnega dela so združili z različnimi dipeptidi, L-Ala-D-iGln, L-Ala-D-Glu in še z mimetikom dipeptida, ki je vseboval 1,2,4-oksadiazol. Za dodatno povečanje lipofilnosti spojin so na dipeptidnem delu tvorili benzilne, metilne ali etilne estre in sklepali, da bi to lahko olajšalo pasivni transport tovrstnih spojin skozi plazemsko membrano. Sintetizirali so 26 novih dezmuramildipeptidov, med katerimi so bili tudi razni izomeri dipeptidnega dela, da bi preverili tudi vpliv stereokemije tega dela na delovanje. Nove spojine so najprej ovrednotili *in vitro*, tako da so proučevali njihov učinek na sproščanje citokinov inducirano z lipopolisaharidom, na celicah THP-1 (celična linija, ki enako kot človeški monociti izraža mRNA, ki kodira za proteine NOD2, CD14, TLR2 in TLR4) glede na pozitivni kontroli MDP in murabutid. Nadalje pa so izbrane spojine glede njihovih imunomodulatornih značilnosti ovrednotili še na človeških PBMC-jih, aktiviranih

s PMA ali z LPS. Spojina **X** je znatno okrepila produkcijo vnetnih citokinov TNF- α , IL-6, IL-1 β in IL-8 (imunostimulatorno delovanje), spojini **XI** in **XII** pa sta izkazovali imunosupresivno delovanje (slika 8). Nobena izmed spojin ni bila tako učinkovita kot MDP ali murabutid, verjetno predvsem zaradi odsotnosti *N*-acetilmuramilnega dela za prepoznavanje in vezavo na receptor ali pa zaradi manjše celične permeabilnosti. Pri proučevanju stereoselektivnosti so ugotovili, da je bil aktiven samo L-izomer alanina, L-iGln pa je bil v nekaterih primerih celo bolj aktiven od D-izomera (38).



Slika 8: Dezmuramidipeptidi s saharinskim in indolnim fragmentom

Izboljšane derivate so pripravili s sintezo še bolj lipofilnih molekul, tako da so tvorili etilne estre na dipeptidnem delu in takšne dipeptide združili z mimetiki *N*-acetilmuramilnega dela **II**, **III**, **IV** in **VIII** ter dobili sedem končnih spojin. Njihovo NOD2 agonistično aktivnost so preverili na celični liniji HEK293-NOD2 (celice, ki prekomerno izražajo gen NOD2) in na človeških PBMC-jih, aktiviranih s PMA. Spojini **XIII** in **XIV** (slika 9) sta povečali transkripcijsko aktivnost NF- κ B in delovali kot agonista receptorjev NOD2, zato sta zanimivi za nadaljnje študije, s katerimi bi določili njuno uporabnost kot adjuvansa (32).



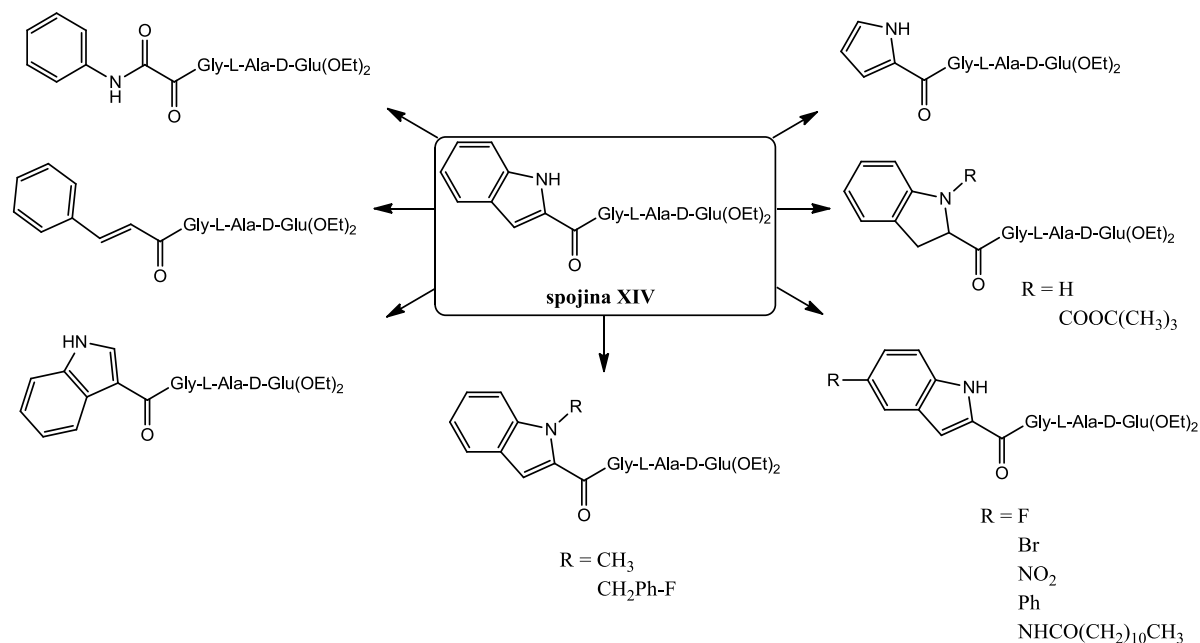
Slika 9: Dezmuramidipeptida s saharinskim in indolnim fragmentom ter zaesterenim dipeptidnim delom

2. NAČRT ZA DELO

V okviru diplomske naloge bomo sintetizirali več novih dezmuramildipeptidov, jih fizikalno-kemijsko in spektroskopsko ovrednotili ter določili njihovo imunomodulatorno aktivnost.

(2*R*)-dietil 2-((2*S*)-2-(2-(indol-2-karboksamido)acetamido)propanamido)pentandioat (spojina **XIV**) deluje kot agonist receptorjev NOD2, zato bomo pri našem delu to spojino uporabili kot spojino vodnico in jo poskušali optimizirati.

Tripeptidni del spojine vodnice Gly-L-Ala-D-Glu(OEt)₂ bomo ohranili nespremenjen, optimizirali pa bomo njen indolni obroč, ki je preko mesta 2 z amidno vezjo vezan na tripeptid in sintetizirali 13 končnih spojin. Pri eni spojini bomo spremenili le mesto, preko katerega je indolni obroč vezan na tripeptid, in ga vezali preko mesta 3, pri drugih pa bomo na mesto 1 ali 5 indolnega obroča vezali razne skupine ali pa nadomestili sam indolni obroč. Spremembe so prikazane na sliki 10. Najprej bomo sintetizirali tripeptidni del, nato pa med njim in ustreznimi karboksilnimi kislinami tvorili amidno vez.



Slika 10: Optimizacija spojine vodnice

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

- **Reagenti in topila**

Pri eksperimentalnem delu v laboratoriju smo uporabljali kemikalije in topila naslednjih proizvajalcev: Acros Organics (Belgija), Carlo Erba (Italija), Gram-mol (Hrvaška), Fluka (Švica), Janssen (ZDA), Merck (Nemčija), Panreac (Španija) ter Sigma-Aldrich (ZDA).

- **Laboratorijska oprema**

- magnetno mešalo z grelnikom : IKA Labortechnik RCT basic
- rotavapor : Büchi Rotavapor R-114 ter Büchi Waterbath B-480, Švica
- tehtnica : Mettler Toledo PG 803
- analitska tehtnica : Mettler Toledo AG245
- UV svetilka : Lamag UV-CABINET II, Nemčija
- žarilna pištola : SKILL 1800 Watt
- sušilnik : Instrumentaria sterimatic ST-11

- **Nomenklatura in risanje spojin**

Za risanje in poimenovanje spojin smo uporabili računalniški program ChemBioDraw Ultra 12.0, proizvajalca CambridgeSoft.

3.2. METODE

3.2.1. Kromatografske metode

- **Tankoplastna kromatografija**

Tankoplastno kromatografijo (TLC) smo izvajali na ploščicah Silica gel 60 F₂₄₅, z 0,22 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu velikosti 20 x 20 cm, proizvajalca Merck (Nemčija). Kot mobilno fazo smo uporabili različna topila. S pomočjo tankoplastne kromatografije smo pri eksperimentalnem delu spremljali potek reakcij, izolacij le-teh ter jo uporabljali pri kolonski kromatografiji. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabili UV svetilko z valovnima dolžinama $\lambda = 254$ nm in $\lambda = 366$ nm, in orositveni reagent ninhidrin za detekcijo aminov in karbamatov.

- **Mobilne faze**

Pri tankoplastni kromatografiji smo uporabili naslednje mobilne faze:

MF1: diklorometan/metanol = 9/1

MF2: heksan/etilacetat = 1/1

MF3: heksan/etilacetat = 2/1

- **Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti**

HPLC analize smo izvajali na instrumentu Agilent Technologies HP 1100 z UV-VIS detektorjem G1365B (254 nm), kolono Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm delci) ob uporabi predkolone in pri pretoku 1 mL/min. Kot eluent smo izbrali zmes 0,1 % raztopine trifluoroocetne kisline v vodi in acetonitrila, pri čemer smo spreminjali gradient, in sicer med 1–30 minuto – gradient od 30 % do 80 % acetonitrila ter med 30–33 minuto – gradient od 80 % do 90 % acetonitrila.

3.2.2. Spektroskopske metode

- **Jedrska magnetna resonanca (NMR)**

¹H in ¹³C NMR spektri so bili posneti na spektrometru Bruker AVANCE III na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. ¹H Spektri so bili posneti pri 400 MHz pri temperaturi 295 K, ¹³C spektri pa pri 100 MHz prav tako pri 295 K. Kot topilo smo uporabili devterirano topilo DMSO-d₆ oziroma CDCl₃ ter TMS (Si(CH₃)₄) kot interni standard. Dobljene spektre smo računalniško obdelali s programom MestRec 8.4.6. proizvajalca Mestrelab Research.

- **Infrardeča spektroskopija (IR)**

IR spektri so bili posneti na spektrometru Nexus FT-IR na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Dobljene spektre smo računalniško obdelali s programom Omnic E.S.P. 5.2.

- **Masna spektrometrija (MS)**

Masni spektri ter HR-MS spektri so bili posneti na spektrometru Q-TOF Premier proizvajalca Waters-Micromass (Velika Britanija) z ESI tehniko na Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

3.2.3. Določanje tališča

Tališča spojin smo določali s talilnim mikroskopom z ogrevalno mizico Wagner & Munz Polytherm A ter termometrom 52 II Thermometer proizvajalca Fluke (ZDA) na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Tališča niso korigirana.

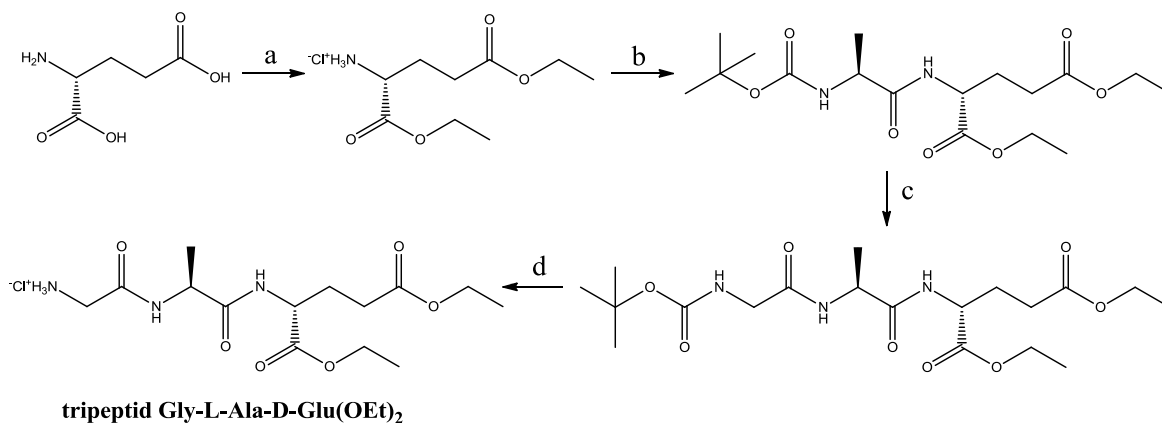
3.2.4. Biološko testiranje spojin

Sintetizirane agoniste receptorjev NOD2 smo dali biološko ovrednotiti na Katedro za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani. Za testiranje so uporabili celice HEK-Blue™ NOD2 in reagent QUANTI-Blue™ proizvajalca InvivoGen. 180 µL suspenzije celic HEK-Blue™ NOD2 (~ 400000 celic) je bilo dodanih 20 µL 200 µM raztopine naših agonistov, ali 200 µM raztopine MDP, pri čemer je bil kot topilo uporabljen gojitveni medij. Testiranje je bilo izvedeno v dveh paralelkah (test A in test B). Spojine pri testiranih koncentracijah niso bile citotoksične. 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" (secreted embryonic alkaline phosphatase – SEAP). Absorbanca vzorcev je bila izmerjena pri 655 nm po 30 minutni inkubaciji v mediju za analizo.

4. EKSPERIMENTALNI DEL

4.1. REAKCIJSKI SHEMI

Reakcijska shema 1:



a: SOCl₂, etanol, 0 °C, nato segrevanje do refluksa

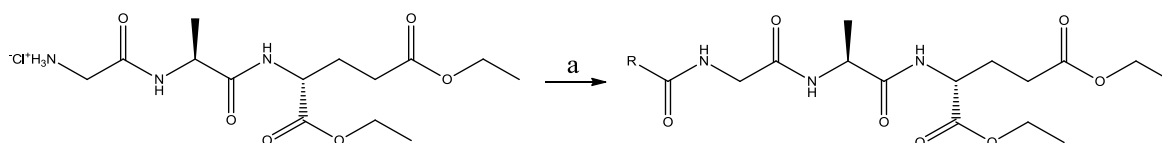
b: BOC-L-alanin, TBTU, *N*-metilmorfolin, DMAP, diklorometan

c: 1.) diklorometan/trifluoroocetna kislina (5:1, v/v);

2.) BOC-glicin, TBTU, *N*-metilmorfolin, DMAP, diklorometan

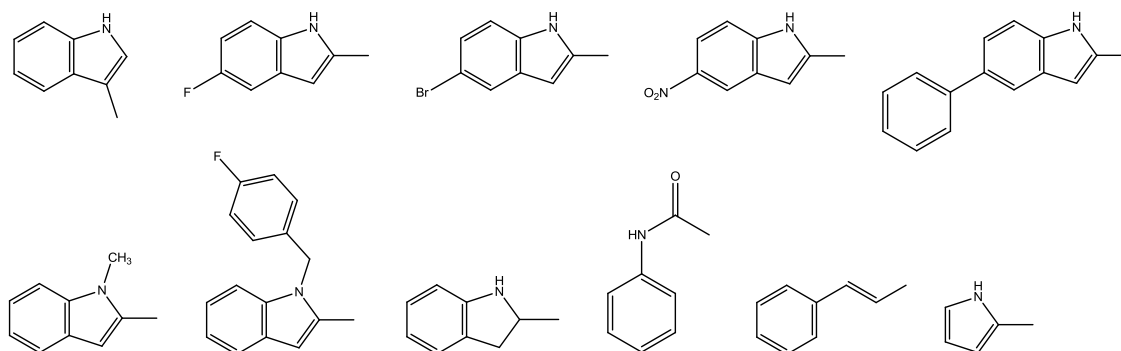
d: HCl_(g), dietil eter, etanol

Reakcijska shema 2:



a: R-COOH, trietilamin, EDC-HCl, HOBt, DMAP, diklorometan

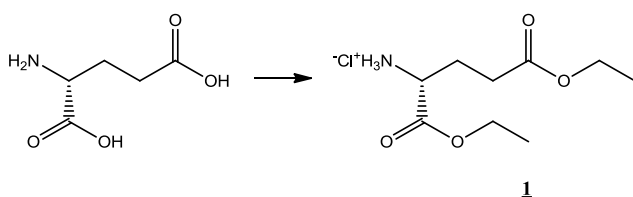
R:



4.2. Sinteza 2-(((2S)-1-(((2R)-1,5-dietoksi-1,5-dioksopentan-2-il)amino)-1-oksopropan-2-il)amino)-2-oksoetanaminijevega klorida (**4**)

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

Reakcija:



Postopek:

V 100 mL bučko smo natehtali 2,94 g (20 mmol) D-glutaminske kisline, jo raztopili v 40 mL etanola in ohladili na ledeni kopeli. Nato smo ob mešanju počasi dodali 3,19 mL (2,2 eq; 44 mmol) tionil klorida in ko smo vsega dodali, smo ledeno kopel odstranili. Bučko smo prenesli na oljno kopel in 2 uri segrevali pri temperaturi refluxa (80 °C), nato pa topilo odpareli pod znižanim tlakom ter dobili 4,86 g spojine **1**.

Rezultati:

Izgled: bel prašek

Izkoristek: 100,00 % (4,86 g)

MS (ESI): 204,1 [M-Cl]⁻

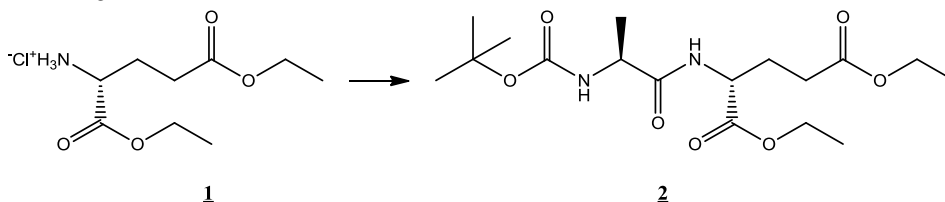
Mr (izračunana): 239,70

HR-MS: 204,1233 (izračunana: 204,1236)

Elementna sestava: C₉H₁₈ClNO₄

4.2.2. Sinteza (2R)-dietil 2-((2S)-2-((terc-butoksikarbonil)amino)propanamido)pentandioata (2)

Reakcija:



Postopek:

V 50 mL bučko smo natehtali 1,58 g (8,34 mmol) BOC-L-alanina in 2,94 g (1,1 eq; 9,17 mmol) TBTU ter ju raztopili v 30 mL diklorometana. Nato smo dodali 2,61 mL (3 eq; 25,02 mmol) *N*-metilmorfolina in pustili mešati. Po 15 minutah smo dodali 2,00 g (8,34 mmol) spojine **1** in nekaj kristalov DMAP ter pustili mešati. Po 72 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in po naslednjem postopku izvedli izolacijo: Reakcijski zmesi smo dodali še 20 mL diklorometana in spirali z 2 × 20 mL 0,5M HCl, 20 mL destilirane vode, 2 × 20 mL nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata, 20 mL destilirane vode in 20 mL nasičene raztopine natrijevega klorida. V organsko fazo smo dali žličko natrijevega sulfata in prefiltrirali, nato pa smo jo odpareli pod znižanim tlakom ter dobili 1,25 g spojine **2**.

Rezultati:

Izgled: bel prašek

Izkoristek: 40,16 % (1,25 g)

Rf: 0,52 (MF1: diklorometan/metanol = 9/1; ninhidrin)

IR (cm⁻¹): 2979, 1733, 1665, 1510, 1449, 1367, 1247, 1163, 1095, 1021, 857, 782, 587, 575

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1,15 - 1,20 (m, 9H, 2 × CH₂CH₃ in CH₃-Ala), 1,37 (s, 9H, BOC), 1,78 - 1,88 (m, 1H, H-β-Glu), 1,95 - 2,04 (m, 1H, H-β-Glu), 2,33 (t, 2H, *J* = 7,2 Hz, CH₂-γ-Glu), 3,96 (t, 1H, *J* = 7,2 Hz, CH-Glu), 4,01 - 4,11 (m, 4H, 2 × CH₂CH₃), 4,21 - 4,26 (m, 1H, CH-Ala), 6,89 (d, 1H, *J* = 7,2 Hz, NH-Ala), 8,13 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz, NH-Glu)

MS (ESI): 375,2 [M+H]⁺

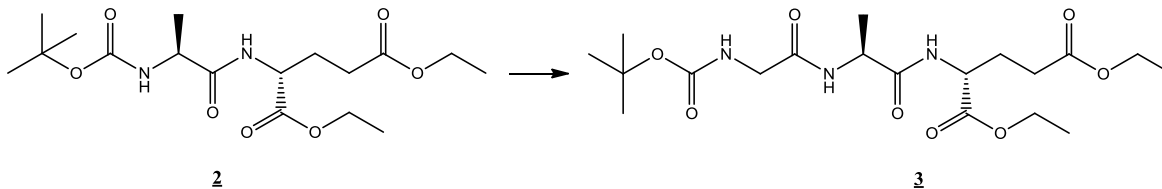
Mr (izračunana): 374,43

HR-MS: 375,2135 (izračunana: 375,2131)

Elementna sestava: C₁₇H₃₀N₂O₇

4.2.3. Sinteza (2R)-dietil 2-((2S)-2-(2-((terc-butoksikarbonil)amino)acetamido)propanamido)pentandioata (3)

Reakcija:



Postopek:

V 50 mL bučko smo natehtali 1,05 g (2,8 mmol) spojine **2**, jo raztopili v 8 mL diklorometana ter ohladili na ledeni kopeli. Nato smo dodali 1,5 mL trifluoroocetne kisline in pustili mešati. Po 3 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Zmes smo raztopili v 15 mL dietil etra, ki smo ga nato odpareli pod znižanim tlakom in to ponovili še dvakrat. Suh preostanek smo raztopili v 10 mL diklorometana, dodali 0,584 mL (2 eq; 5,6 mmol) *N*-metilmorfolina in vse skupaj prelili v bučko, kjer smo predhodno aktivirali BOC-glicin in dodali še nekaj kristalov DMAP ter pustili mešati. Po 120 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in po naslednjem postopku izvedli izolacijo: Reakcijski zmes smo dodali še 20 mL diklorometana in spirali z 2 × 20 mL 0,5M HCl, 20 mL destilirane vode, 2 × 20 mL nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata, 20 mL destilirane vode in 20 mL nasičene raztopine natrijevega klorida. V organsko fazo smo dali žličko natrijevega sulfata in prefiltrirali, nato pa smo jo odpareli pod znižanim tlakom ter dobili 1,19 g spojine **3**.

Aktivacija BOC-glicina: V 100 mL bučko smo natehtali 0,49 g (2,8 mmol) BOC-glicina, ga raztopili v 20 mL diklorometana, dodali 0,99 g (1,1 eq; 3,08 mmol) TBTU in 0,292 mL (2,8 mmol) *N*-metilmorfolina ter pustili mešati 1 uro.

Rezultati:

Izgled: bel prašek

Izkoristek: 98,66 % (1,19 g)

Rf: 0,69 (MF1: diklorometan/metanol = 9/1; ninhidrin)

T_{tališča}: 73 - 77 °C

IR (cm⁻¹): 3295, 1732, 1712, 1702, 1687, 1641, 1514, 1449, 1392, 1367, 1322, 1279, 1249, 1202, 1163, 1149, 1115, 1051, 1021, 940, 865, 683, 659, 627, 581, 559

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1,15 - 1,21 (m, 9H, 2 × CH₂CH₃ in CH₃-Ala), 1,37 (s, 9H, BOC), 1,77 - 1,86 (m, 1H, H-β-Glu), 1,95 - 2,04 (m, 1H, H-β-Glu), 2,34 (t, 2H, *J* = 7,2 Hz, CH₂-γ-Glu), 3,54 (d, 2H, *J* = 6,0 Hz, NHCH₂), 4,02 - 4,10 (m, 4H, 2 × CH₂CH₃), 4,21 - 4,26 (m, 1H, CH-Glu), 4,30 - 4,35 (m, 1H, CH-Ala), 6,98 (t, 1H, *J* = 6,0 Hz, CONHCH₂), 7,88 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz, NH-Ala), 8,29 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz, NH-Glu)

HPLC (254 nm): 100,00 %, t_R = 15,10 min

MS (ESI): 432,2 [M+H]⁺

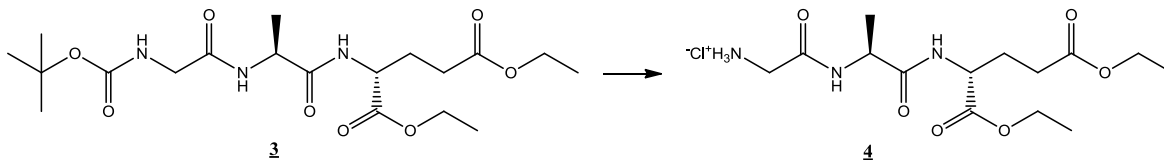
Mr (izračunana): 431,48

HR-MS: 432,2342 (izračunana: 432,2346)

Elementna sestava: C₁₉H₃₃N₃O₈

4.2.4. Sinteza 2-(((2S)-1-(((2R)-1,5-dietoksi-1,5-dioksopentan-2-il)amino)-1-oksopropan-2-il)amino)-2-oksoetanaminijevega klorida (4)

Reakcija:



Postopek:

V 50 mL bučko smo natehtali 1,10 g (2,55 mmol) spojine **3**, jo raztopili v 10 mL dietil etra in 2 mL etanola, ohladili na ledeni kopeli in nato 15 minut prepihavali s $\text{HCl}_{(g)}$ ter nato bučko zaprli z zamaškom in dodatno zaščitili s parafilmom. Po 24 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in topilo odpareli pod znižanim tlakom ter dobili 0,89 g spojine **4**.

Rezultati:

Izgled: rjava oljnata snov

Izkoristek: 94,93 % (0,89 g)

Rf: 0,10 (MF1: diklorometan/metanol : 9/1)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1,15 - 1,25 (m, 9H, $2 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$ in CH_3 -Ala), 1,79 - 1,88 (m, 1H, H_{β} -Glu), 1,96 - 2,04 (m, 1H, H_{β} -Glu), 2,35 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, CH_2 - γ -Glu), 3,38 (k, 2H, $J = 6,8$ Hz, NH_3CH_2), 4,01 - 4,10 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$), 4,19 - 4,27 (m, 1H, CH -Glu), 4,40 (t, 1H, $J = 7,2$ Hz, CH -Ala), 8,13 (s, 3H, NH_3), 8,51 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, NH -Ala), 8,64 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, NH -Glu)

HPLC (254 nm): 100,00 %, $t_R = 18,53$ min

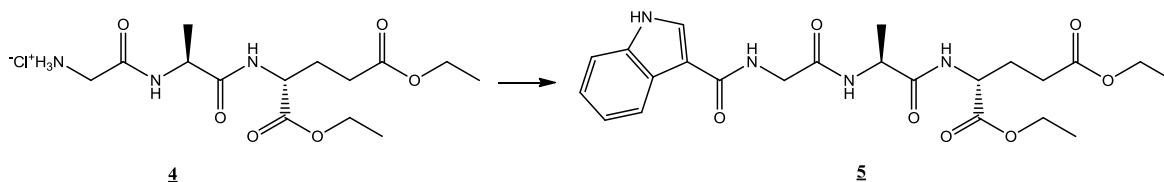
MS (ESI): 332,2 $[\text{M}-\text{Cl}]^-$

Mr (izračunana): 367,65

HR-MS: 332,1820 (izračunana: 332,1822) **Elementna sestava:** $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{ClN}_3\text{O}_6$

4.3. Sinteza (2R)-dietil 2-((2S)-2-(2-(indol-3-karboksamido)acetamido)propanamido)pentandioata (5)

Reakcija:



Postopek:

V 25 mL bučko smo natehtali 48 mg (0,131 mmol) spojine **4**, jo raztopili v 5 mL diklorometana, ohladili na ledeni kopeli in dodali 46 μ L (2,5 eq; 0,328 mmol) trietilamina. Nato smo dodali 21,0 mg (0,131 mmol) indol-3-karboksilne kisline, 25,1 mg (0,131 mmol) EDC-HCl, 17,7 mg (0,131 mmol) HOBt in nekaj kristalov DMAP ter pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 24 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in po naslednjem postopku izvedli izolacijo: Reakcijski zmesi smo dodali še 20 mL diklorometana in spirali z 2×15 mL 1M HCl, 15 mL destilirane vode, 2×15 mL nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata, 15 mL destilirane vode in 15 mL nasičene raztopine natrijevega klorida. V organsko fazo smo dali žličko natrijevega sulfata in prefiltrirali, nato pa smo jo odpareli pod znižanim tlakom ter dobili 33 mg spojine **5**.

Rezultati:

Izgled: rjavo-oranžni prašek

Izkoristek: 53,09 % (33 mg)

Rf: 0,43 (MF1: diklorometan/metanol : 9/1)

T_{tališča}: 30 - 34 °C

IR (cm⁻¹): 2962, 2361, 1260, 1088, 1017, 797, 685, 560, 573, 558

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1,06 - 1,13 (m, 6H, $2 \times$ CH₂CH₃), 1,26 (d, 3H, $J = 7,2$ Hz, CH₃-Ala), 1,90 - 1,99 (m, 1H, H- β -Glu), 2,10 - 2,14 (m, 1H, H- β -Glu), 2,28 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, CH₂- γ -Glu), 3,84 - 4,03 (m, 6H, $2 \times$ CH₂CH₃ in NHCH₂), 4,38 - 4,47 (m, 2H, CH-Glu in CH-Ala), 7,03 - 7,05 (m, 2H, Ar-H), 7,19 - 7,21 (m, 1H, Ar-H), 7,48 (s, 1H, Ar-H), 7,61 - 7,63 (m, 1H, Ar-H), 7,71 - 7,76 (m, 2H, NH-Ala in NH-Glu), 7,99 - 8,01 (m, 1H, CONHCH₂), 9,86 (s, 1H, indol-NH)

Branka Vuković:

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

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 12.98, 13.01, 16.76, 25.64, 29.37, 37.60, 42.62, 48.32, 50.92, 59.78, 60.67, 108.97, 110.93, 119.50, 120.35, 121.58, 124.44, 127.91, 135.27, 165.83, 169.77, 171.06, 171.98, 172.02

HPLC (254 nm): 97,04 %, t_R = 6,97 min

MS (ESI): 475,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

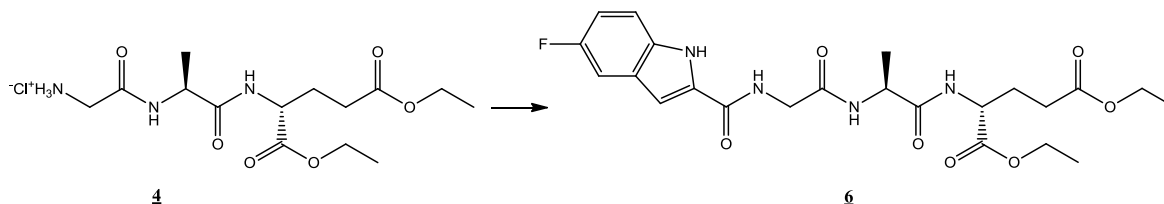
Mr (izračunana): 474,51

HR-MS: 475,2197 (izračunana: 475,2193)

Elementna sestava: $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_7$

4.4. Sinteza (2R)-dietil 2-((2S)-2-(2-(5-fluorindol-2-karboksamido)acetamido)propanamido)pentandioata (6)

Reakcija:



Postopek:

V 25 mL bučko smo natehtali 45 mg (0,122 mmol) spojine **4**, jo raztopili v 5 mL diklorometana, ohladili na ledeni kopeli in dodali 42 μ L (2,5 eq; 0,305 mmol) trietilamina. Nato smo dodali 21,9 mg (0,122 mmol) 5-fluorindol-2-karboksilne kisline, 23,4 mg (0,122 mmol) EDC-HCl, 16,5 mg (0,122 mmol) HOBt in nekaj kristalov DMAP ter pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 24 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in po naslednjem postopku izvedli izolacijo: Reakcijski zmesi smo dodali še 20 mL diklorometana in spirali z 2×15 mL 1M HCl, 15 mL destilirane vode, 2×15 mL nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata, 15 mL destilirane vode in 15 mL nasičene raztopine natrijevega klorida. V organsko fazo smo dali žličko natrijevega sulfata in prefiltrirali, nato pa smo jo odpareli pod znižanim tlakom ter dobili 25 mg spojine **6**.

Rezultati:

Izgled: rumen prašek

Izkoristek: 41,61 % (25 mg)

Rf: 0,44 (MF1: diklorometan/metanol : 9/1)

T_{tališča}: 71 - 75 °C

IR (cm⁻¹): 3269, 1731, 1641, 1545, 1447, 1375, 1330, 1213, 1110, 1020, 956, 851, 798, 764, 664, 592, 573, 564

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1,15 (t, 6H, $J = 7,2$ Hz, $2 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,37 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz, $\text{CH}_3\text{-Ala}$), 2,00 - 2,07 (m, 1H, $\text{H-}\beta\text{-Glu}$), 2,15 - 2,22 (m, 1H, $\text{H-}\beta\text{-Glu}$), 2,35 - 2,40 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-}\gamma\text{-Glu}$), 4,01 - 4,29 (m, 6H, $2 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$ in NHCH_2), 4,51 - 4,56 (m, 1H, CH-Glu), 4,69 - 4,76 (m, 1H, CH-Ala), 6,87 - 6,95 (m, 2H, Ar-H), 7,11 - 7,14 (m,

Branka Vuković:

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

2H, Ar-H), 7,28 - 7,31 (m, 1H, NH-Ala), 7,67 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz, NH-Glu), 8,04 (s, 1H, CONHCH₂), 10,41 (s, 1H, indol-NH)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.06, 14.12, 18.89, 26.93, 30.42, 38.67, 43.63, 49.17, 52.14, 60.98, 61.88, 103.39, 105.94, 106.18, 113.23, 127.54, 127.64, 131.52, 133.47, 156.84, 162.11, 169.09, 172.10, 172.83, 173.16

HPLC (254 nm): 96,30 %, $t_R = 11,25$ min

MS (ESI): 493,2 [M+H]⁺

Mr (izračunana): 492,50

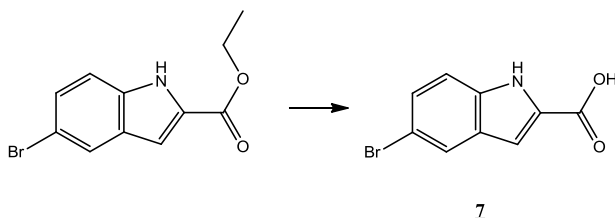
HR-MS: 493,2086 (izračunana: 493,2099)

Elementna sestava: C₂₃H₂₉FN₄O₇

4.5. Sinteza (2R)-dietil 2-((2S)-2-(2-(5-bromoindol-2-karboksamido)acetamido)propanamido)pentandioata (8)

4.5.1. Sinteza 5-bromoindol-2-karboksilne kisline (7)

Reakcija:



Postopek:

V 25 mL bučko smo natehtali 268,11 mg (1 mmol) etil-5-bromoindol-2-karboksilata, ga raztopili v 4 mL etanola, dodali 3,00 mL (6 eq; 6 mmol) 2M litijevega hidroksida in pustili mešati. Po 48 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in etanol odpareli pod znižanim tlakom. Dodali smo 20 mL vode in raztopino na ledeni kopeli nakisali z 1M HCl do pH 2-3. Izvedli smo ekstrakcijo s 3×15 mL etilacetata in organsko fazo spirali s 15 mL nasičene raztopine natrijevega klorida. V organsko fazo smo dali žličko natrijevega sulfata in prefiltrirali, nato pa smo jo odpareli pod znižanim tlakom ter dobili 210 mg spojine **7**.

Rezultati:

Izgled: umazano bel prašek

Izkoristek: 87,48 % (210 mg)

Rf: 0,20 (MF2: heksan/etilacetat = 1/1)

IR (cm⁻¹): 3421, 2587, 1655, 1570, 1532, 1477, 1435, 1408, 1364, 1328, 1291, 1253, 1220, 1196, 1137, 1112, 1050, 966, 903, 873, 828, 788, 766, 746, 732, 665, 605, 570

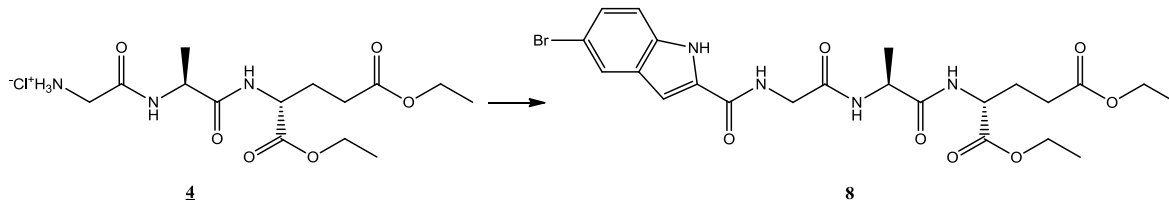
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 7,06 (s, 1H, Ar-H), 7,33 - 7,40 (m, 2H, Ar-H), 7,86 (s, 1H, Ar-H), 11,97 (s, 1H, indol-NH), 13,14 (s, 1H, COOH)

Mr (izračunana): 240,05

Elementna sestava: C₉H₆BrNO₂

4.5.2. Sinteza (2R)-dietil 2-((2S)-2-(2-(5-bromoindol-2-karboksamido)acetamido)propanamido)pentandioata (8)

Reakcija:



Postopek:

V 25 mL bučko smo natehtali 28 mg (0,076 mmol) spojine **4**, jo raztopili v 5 mL diklorometana, ohladili na ledeni kopeli in dodali 27 μ L (2,5 eq; 0,190 mmol) trietilamina. Nato smo dodali 18,2 mg (0,076 mmol) spojine **7**, 14,6 mg (0,076 mmol) EDC-HCl, 10,3 mg (0,076 mmol) HOBt in nekaj kristalov DMAP ter pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 72 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in po naslednjem postopku izvedli izolacijo: Reakcijski zmesi smo dodali še 20 mL diklorometana in ga spirali z 2×15 mL 1M HCl, 15 mL destilirane vode, 2×15 mL nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata, 15 mL destilirane vode in 15 mL nasičene raztopine natrijevega klorida. V organsko fazo smo dali žličko natrijevega sulfata in prefiltrirali, nato pa smo jo odpareli pod znižanim tlakom ter dobili 25 mg spojine **8**.

Rezultati:

Izgled: umazano bela oljnato trdna snov

Izkoristek: 59,44 % (25 mg)

Rf: 0,44 (MF1: diklorometan/metanol = 9/1)

IR (cm⁻¹): 3281, 2364, 1731, 1642, 1545, 1442, 1415, 1372, 1147, 1022, 906, 882, 800, 764, 734, 692, 669, 637, 620, 596, 590, 579, 567

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1,16 - 1,26 (m, 6H, $2 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,37 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz, $\text{CH}_3\text{-Ala}$), 1,97 - 2,20 (m, 1H, $\text{H-}\beta\text{-Glu}$), 2,39 (t, 2H, $J = 6,8$ Hz, $\text{CH}_2\text{-}\gamma\text{-Glu}$), 3,98 - 4,24 (m, 6H, $2 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$ in NHCH_2), 4,46 - 4,50 (m, 1H, CH-Glu), 4,61 - 4,65 (m, 1H, CH-Ala), 6,81 (s, 1H, Ar-H), 7,25 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz, NH-Ala), 7,39 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, NH-Glu), 7,54 (s, 1H, Ar-H), 7,65 (s, 1H, Ar-H), 7,71 (s, 1H, Ar-H), 9,42 - 9,50 (m, 1H, CONHCH_2), 10,16 (s, 1H, indol-NH)

Branka Vuković:

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

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 14.11, 14.15, 18.35, 26.76, 29.72, 30.49, 49.06, 52.23, 61.03, 61.84, 61.91, 86.25, 102.76, 113.62, 124.28, 127.45, 129.07, 145.27, 168.94, 169.63, 172.05, 172.53, 173.43

HPLC (254 nm): 94,65 %, t_R = 14,10 min

MS (ESI): 553,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Mr (izračunana): 553,40

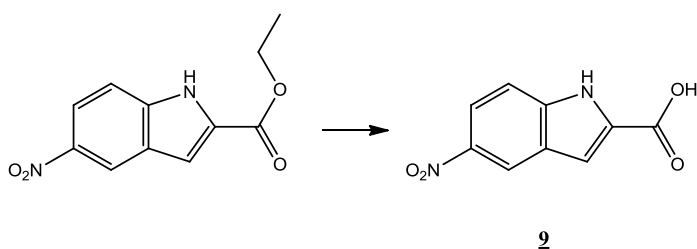
HR-MS: 553,1292 (izračunana: 553,1298)

Elementna sestava: $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{BrN}_4\text{O}_7$

4.6. Sinteza (2R)-dietil 2-((2S)-2-(2-(5-nitroindol-2-karboksamido)acetamido)propanamido)pentandioata (10)

4.6.1. Sinteza 5-nitroindol-2-karboksilne kisline (9)

Reakcija:



Postopek:

V 25 mL bučko smo natehtali 503 mg (2,15 mmol) etil-5-nitroindol-2-karboksilata, ga raztopili v 5 mL THF, dodali 6,0 mL (5,6 eq; 12 mmol) 2M litijevega hidroksida in pustili mešati. Po 24 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in THF odpareli pod znižanim tlakom. Dodali smo 15 mL vode, izvedli ekstrakcijo z 10 mL dietil etra in nato vodno fazo na ledeni kopeli nakisali s 3M HCl do pH 2-3. Vodno fazo smo ekstrahirali s 3×15 mL etilacetata in organsko fazo ekstrahirali s 15 mL nasičene raztopine natrijevega klorida. V organsko fazo smo dali žličko natrijevega sulfata in prefiltrirali, nato pa smo jo odpareli pod znižanim tlakom ter dobili 146 mg spojine **9**.

Rezultati:

Izgled: rjav prašek

Izkoristek: 32,94 % (146 mg)

Rf: 0,22 (MF2: heksan/etilacetat = 1/1)

T_{tališča}: 265 - 269 °C

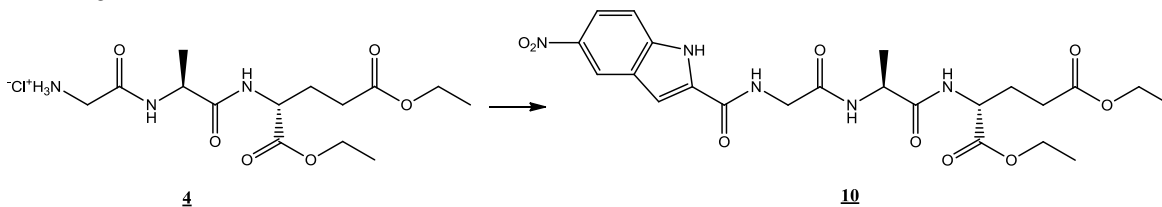
IR (cm⁻¹): 3407, 1668, 1535, 1333, 1295, 1271, 897, 819, 771, 748, 607, 576, 566, 561

Mr (izračunana): 206,15

Elementna sestava: C₉H₆N₂O₄

4.6.2. Sinteza (2R)-dietil 2-((2S)-2-(2-(5-nitroindol-2-karboksamido)acetamido)propanamido)pentandioata (10)

Reakcija:



Postopek:

V 25 mL bučko smo natehtali 74 mg (0,201 mmol) spojine **4**, jo raztopili v 5 mL diklorometana, ohladili na ledeni kopeli in dodali 70 μ L (2,5 eq; 0,503 mmol) trietilamina. Nato smo dodali 41,5 mg (0,201 mmol) spojine **9**, 38,5 mg (0,201 mmol) EDC-HCl, 27,2 mg (0,201 mmol) HOBt in nekaj kristalov DMAP ter pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 120 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in po naslednjem postopku izvedli izolacijo: Reakcijski zmesi smo dodali še 20 mL diklorometana in ga spirali z 2×15 mL 1M HCl, 15 mL destilirane vode, 2×15 mL nasičene raztopine natrijevega hidrojenkarbonata, 15 mL destilirane vode in 15 mL nasičene raztopine natrijevega klorida. V organsko fazo smo dali žličko natrijevega sulfata in prefiltrirali, nato pa smo jo odpareli pod znižanim tlakom ter dobili 35 mg spojine **10**.

Rezultati:

Izgled: umazano bel prašek

Izkoristek: 33,52 % (35 mg)

Rf: 0,53 (MF1: diklorometan/metanol = 9/1)

T_{tališča}: 146 - 150 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1,25 - 1,48 (m, 9H, $2 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$ in CH_3 -Ala), 2,15 - 2,32 (m, 2H, CH_2 - β -Glu), 2,44 - 2,52 (m, 2H, CH_2 - γ -Glu), 4,06 - 4,32 (m, 6H, $2 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$ in NHCH_2), 4,51 - 4,57 (m, 1H, CH -Glu), 4,64 - 4,71 (m, 1H, CH -Ala), 7,11 (s, 1H, Ar-H), 7,47 - 7,50 (m, 3H, Ar-H), 8,14 - 8,17 (m, 2H, NH -Ala in NH -Glu), 8,60 - 8,66 (m, 1H, CONHCH_2), 10,44 (s, 1H, indol-NH)

HPLC (254 nm): 93,92 %, $t_R = 11,04$ min

MS (ESI): 520,2 [M+H]⁺

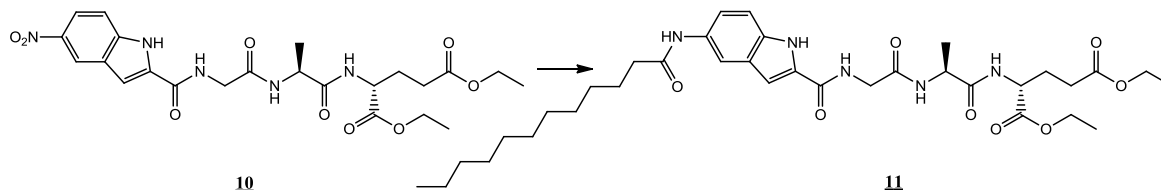
Mr (izračunana): 519,50

HR-MS: 520,2048 (izračunana: 520,2044)

Elementna sestava: C₂₃H₂₉N₅O₉

4.7. Sinteza (2R)-dietil 2-((2S)-2-(2-(5-dodekanamidoindol-2-karboksamido)acetamido)propanamido)pentandioata (11)

Reakcija:



Postopek:

V 25 mL bučko smo natehtali 30 mg (0,058 mmol) spojine **10**, jo raztopili v 5 mL etanola in 1 mL THF ter raztopino prepihali z argonom. Nato smo v bučko dodali še 10 % (m/m) paladija in suspenzijo eno uro prepihavali z vodikom. Po 3 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in paladij odfiltrirali z odsesavanjem, ga sprali z 10 mL etanola in filtrat odpareli pod znižanim tlakom. Suhemu preostanku smo dodali 5 mL THF in 7,3 mg (1,5 eq; 0,087 mmol) natrijevega hidrogenkarbonata ter ohladili na ledeni kopeli. Nato smo po kapljicah dodali še 15,2 μ L (1,1 eq; 0,064 mmol) lavroil klorida, ki smo ga predhodno raztopili v 0,5 mL THF ter pustili mešati. Po 75 minutah smo s TLC zaznali konec reakcije, topilo odpareli pod znižanim tlakom in po naslednjem postopku izvedli izolacijo: Reakcijsko zmes smo raztopili v 20 mL diklorometana in ga sprali s 5 mL destilirane vode in 5 mL nasičene raztopine natrijevega klorida. V organsko fazo smo dali žličko natrijevega sulfata in prefiltrirali, nato pa smo jo odpareli pod znižanim tlakom ter dobili 27 mg spojine **11**.

Rezultati:

Izgled: rjava oljnato trdna snov

Izkoristek: 69,47 % (27 mg)

Rf: 0,49 (MF1: diklorometan/metanol = 9/1)

IR (cm⁻¹): 2918, 1734, 1647, 1542, 1450, 1419, 1375, 1210, 1021, 866, 811, 766, 739, 676, 649, 627, 604, 596, 589, 574, 567, 557, 552

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0,85 (s, 3H, CH₃), 1,20 - 1,25 (m, 27H, 9 \times CH₂, CH₃-Ala in 2 \times CH₃), 1,67 - 1,80 (m, 2H, CH₂), 1,90 - 2,26 (m, 2H, CH₂- β -Glu), 2,27 - 2,42 (m, 2H, CH₂- γ -Glu), 3,58 - 3,85 (m, 1H, CH-Glu), 4,00 - 4,35 (m, 4H, 2 \times CH₂CH₃),

Branka Vuković:

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

4,41 - 4,78 (m, 3H, $\underline{\text{CH}}$ -Ala in $\text{NH}\underline{\text{CH}_2}$), 6,56 - 7,21 (m, 2H, Ar- $\underline{\text{H}}$), 7,52 - 8,16 (m, 6H, $2 \times \text{Ar-}\underline{\text{H}}$ in $4 \times \text{NH}$), 10,47 (s, 1H, indol- $\underline{\text{NH}}$)

HPLC (254 nm): 91,66 %, $t_R = 27,01$ min

MS (ESI): 672,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Mr (izračunana): 671,82

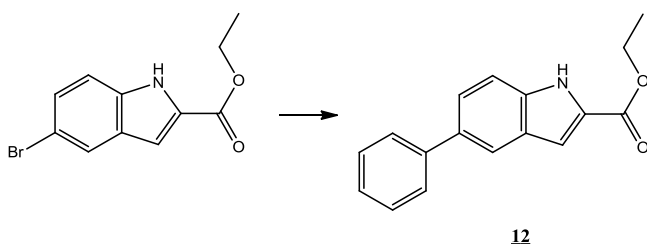
HR-MS: 672,3972 (izračunana: 672,3972)

Elementna sestava: $\text{C}_{35}\text{H}_{53}\text{N}_5\text{O}_8$

4.8. Sinteza (2R)-dietil 2-((2S)-2-(2-(5-fenilindol-2-karboksamido)acetamido)propanamido)pentandioata (14)

4.8.1. Sinteza etil 5-fenilindol-2-karboksilata (12)

Reakcija:



Postopek:

V 25 mL bučko smo natehtali 134,1 mg (0,50 mmol) etil-5-bromoindol-2-karboksilata, 69,5 mg (1,14 eq; 0,57 mmol) benzenboronske kisline in 145,3 mg (5 eq; 2,50 mmol) kalijevega fluorida ter jih raztopili v 8 mL dioksana. Raztopino smo prepihali z argonom in dodali 26,8 mg (0,05 eq; 0,025 mmol) Pd(PPh₃)₄. Bučko smo prenesli na oljno kopel in segrevali pri temperaturi refluxa (102 °C). Po 24 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in topilo odpareli pod znižanim tlakom ter dobili 97 mg spojine 12.

Rezultati:

Izgled: bel prašek

Izkoristek: 73,21 % (97 mg)

Rf: 0,80 (MF3: heksan/etilacetat =2/1)

T_{tališča}: 136 - 140 °C

IR (cm⁻¹): 3297, 1693, 1526, 1504, 1477, 1423, 1379, 1323, 1255, 1204, 1188, 1127, 1047, 1026, 975, 905, 885, 869, 814, 801, 766, 756, 737, 687, 630, 595, 558

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1,36 (t, 3H, *J* = 6,8 Hz, CH₂CH₃), 4,35 (k, 2H, *J* = 6,4 Hz, CH₂CH₃), 7,08 (s, 1H, Ar-H), 7,19 - 7,32 (m, 2H, Ar-H), 7,36 - 7,43 (m, 2H, Ar-H), 7,51 - 7,58 (m, 2H, Ar-H), 7,76 (s, 1H, Ar-H), 7,82 (s, 1H, Ar-H), 8,83 (s, 1H, indol-NH)

MS (ESI): 266,1 [M+H]⁺

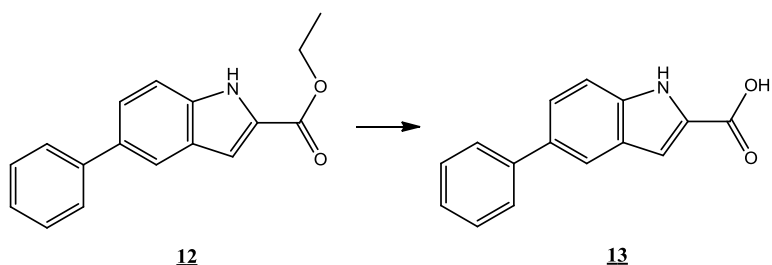
Mr (izračunana): 265,31

HR-MS: 266,1186 (izračunana: 266,1181)

Elementna sestava: C₁₇H₁₅NO₂

4.8.2. Sinteza 5-fenilindol-2-karboksilne kisline (**13**)

Reakcija:



Postopek:

V 25 mL bučko smo natehtali 58 mg (0,22 mmol) spojine **12**, jo raztopili v 5 mL THF, dodali 0,66 mL (6 eq; 1,32 mmol) 2M litijevega hidroksida in pustili mešati. Po enem tednu smo s TLC zaznali konec reakcije in THF odpareli pod znižanim tlakom. Dodali smo 20 mL vode in vodno raztopino ekstrahirali z 10 mL dietil etra. Nato smo raztopino na ledeni kopeli nakisali z 1M HCl do pH 2-3. Vodno fazo smo ekstrahirali s 3×15 mL etilacetata in organsko fazo spirali s 15 mL nasičene raztopine natrijevega klorida. V organsko fazo smo dali žličko natrijevega sulfata in prefiltrirali, nato pa smo jo odpareli pod znižanim tlakom ter dobili 34 mg spojine **13**.

Rezultati:

Izgled: umazano bel prašek

Izkoristek: 65,30 % (34 mg)

Rf: 0,27 (MF1: diklorometan/metanol = 9/1)

IR (cm⁻¹): 1222, 1194, 884, 827, 789, 762, 667, 616, 605, 582, 574, 567

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 7,05 (s, 1H, Ar-H), 7,14 (s, 1H, Ar-H), 7,33 - 7,56 (m, 4H, Ar-H), 7,67 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, Ar-H), 7,86 (s, 1H, Ar-H), 7,91 (s, 1H, Ar-H), 11,82 (s, 1H, indol-NH), 13,09 (s, 1H, COOH)

MS (ESI): 238,1 [M+H]⁺

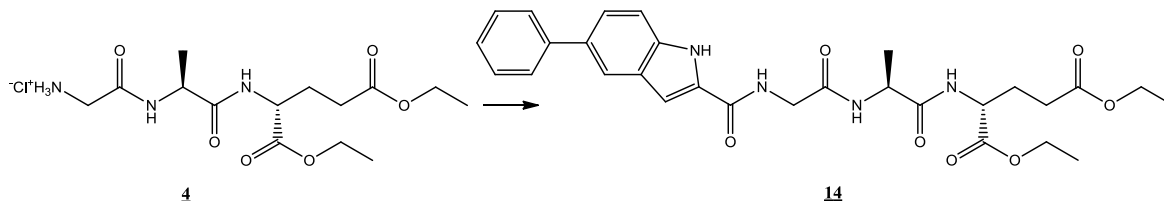
Mr (izračunana): 237,25

HR-MS: 238,0864 (izračunana: 238,0868)

Elementna sestava: C₁₅H₁₁NO₂

4.8.3. Sinteza (2R)-dietil 2-((2S)-2-(2-(5-fenilindol-2-karboksamido)acetamido)propanamido)pentandioata (14)

Reakcija:



Postopek:

V 25 mL bučko smo natehtali 31 mg (0,084 mmol) spojine **4**, jo raztopili v 5 mL diklorometana, ohladili na ledeni kopeli in dodali 29 μ L (2,5 eq; 0,210 mmol) trietilamina. Nato smo dodali 19,9 mg (0,084 mmol) spojine **13**, 16,1 mg (0,084 mmol) EDC-HCl, 11,4 mg (0,084 mmol) HOBt in nekaj kristalov DMAP ter pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 72 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in po naslednjem postopku izvedli izolacijo: Reakcijski zmesi smo dodali še 20 mL diklorometana in ga spirali z 2×15 mL 1M HCl, 15 mL destilirane vode, 2×15 mL nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata, 15 mL destilirane vode in 15 mL nasičene raztopine natrijevega klorida. V organsko fazo smo dali žličko natrijevega sulfata in prefiltrirali, nato pa smo jo odpareli pod znižanim tlakom ter dobili 34 mg spojine **14**.

Rezultati :

Izgled: rumen prašek

Izkoristek: 73,51 % (34 mg)

Rf: 0,55 (MF1: diklorometan/metanol = 9/1)

T_{tališča}: 84 - 88 °C

IR (cm⁻¹): 3282, 1732, 1639, 1543, 1417, 1261, 1207, 1094, 1018, 798, 761, 732, 697, 666, 651, 629, 622, 615, 598, 589, 576, 569, 559

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1,12 - 1,16 (m, 6H, $2 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,37 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz, $\text{CH}_3\text{-Ala}$), 2,01 - 2,20 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-}\beta\text{-Glu}$), 2,37 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-}\gamma\text{-Glu}$), 4,02 - 4,21 (m, 6H, $2 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$ in NHCH_2), 4,52 - 4,54 (m, 1H, CH-Glu), 4,70 (s, 1H, CH-Ala), 6,83 (s, 1H, Ar-H), 6,95 (s, 1H, Ar-H), 7,19 - 7,25 (m, 3H, Ar-H), 7,34 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz,

Branka Vuković:

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

Ar-H), 7,43 (s, 1H, Ar-H), 7,52 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, Ar-H), 7,61 - 7,74 (m, 2H, NH-Ala in NH-Glu), 7,97 (s, 1H, CONHCH₂), 10,35 (s, 1H, indol-NH)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.08, 14.14, 18.71, 26.90, 30.44, 30.98, 43.69, 49.16, 52.15, 60.97, 61.87, 102.86, 103.96, 112.53, 113.48, 120.21, 124.23, 124.45, 126.53, 127.23, 128.06, 128.72, 129.10, 130.61, 131.10, 133.87, 135.35, 136.36, 142.06, 162.36, 169.16, 172.13, 172.84, 173.19

HPLC (254 nm): 70 %, $t_R = 17,01$ min

Opomba: Dobili smo zmes spojine **14** (70 %) in spojine **8** (30 %).

MS (ESI): 551,3 [M+H]⁺

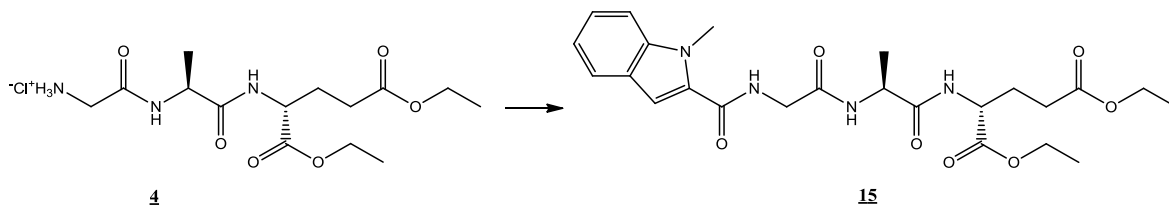
Mr (izračunana): 550,60

HR-MS: 551,2517 (izračunana: 551,2506)

Elementna sestava: C₂₉H₃₄N₄O₇

4.9. Sinteza (2R)-dietil 2-((2S)-2-(2-(1-metilindol-2-karboksamido)acetamido)propanamido)pentandioata (15)

Reakcija:



Postopek:

V 25 mL bučko smo natehtali 43 mg (0,117 mmol) spojine **4**, jo raztopili v 5 mL diklorometana, ohladili na ledeni kopeli in dodali 41 μ L (2,5 eq; 0,293 mmol) trietilamina. Nato smo dodali 20,5 mg (0,117 mmol) 1-metilindol-2-karboksilne kisline, 22,4 mg (0,117 mmol) EDC-HCl, 15,8 mg (0,117 mmol) HOBt in nekaj kristalov DMAP ter pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 24 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in po naslednjem postopku izvedli izolacijo: Reakcijski zmesi smo dodali še 20 mL diklorometana in ga spirali z 2×15 mL 1M HCl, 15 mL destilirane vode, 2×15 mL nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata, 15 mL destilirane vode in 15 mL nasičene raztopine natrijevega klorida. V organsko fazo smo dali žličko natrijevega sulfata in prefiltrirali, nato pa smo jo odpareli pod znižanim tlakom ter dobili 11 mg spojine **15**.

Rezultati:

Izgled: rumen prašek

Izkoristek: 19,24 % (11 mg)

Rf: 0,47 (MF1: diklorometan/metanol : 9/1)

T_{tališča}: 42 - 46 °C

IR (cm⁻¹): 3301, 1732, 1641, 1533, 1463, 1394, 1375, 1319, 1260, 1201, 1097, 1023, 999, 914, 844, 806, 748, 733, 646, 581, 573

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1,13 - 1,18 (m, 6H, $2 \times$ CH₂CH₃), 1,34 (d, 3H, J = 6,8 Hz, CH₃-Ala), 1,88 - 1,98 (m, 1H, H- β -Glu), 2,07 - 2,16 (m, 1H, H- β -Glu), 2,24 - 2,36 (m, 2H, CH₂- γ -Glu), 3,92 (s, 3H, NCH₃), 3,99 - 4,10 (m, 6H, $2 \times$ CH₂CH₃ in NHCH₂), 4,44 - 4,58 (m, 2H, CH-Glu in CH-Ala), 6,92 (s, 1H, Ar-H), 7,04 - 7,08 (m, 2H,

Branka Vuković:

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

Ar-H), 7,22 - 7,29 (m, 4H, Ar-H, NH-Ala in CONHCH₂), 7,53 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, NH-Glu)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.09, 14.15, 18.22, 26.86, 30.37, 31.58, 43.35, 49.00, 51.92, 60.83, 61.73, 105.02, 110.15, 120.53, 121.98, 124.31, 125.97, 130.92, 139.13, 163.14, 169.21, 171.83, 172.33, 172.98

HPLC (254 nm): 95,30 %, t_R = 12,24 min

MS (ESI): 489,2 [M+H]⁺

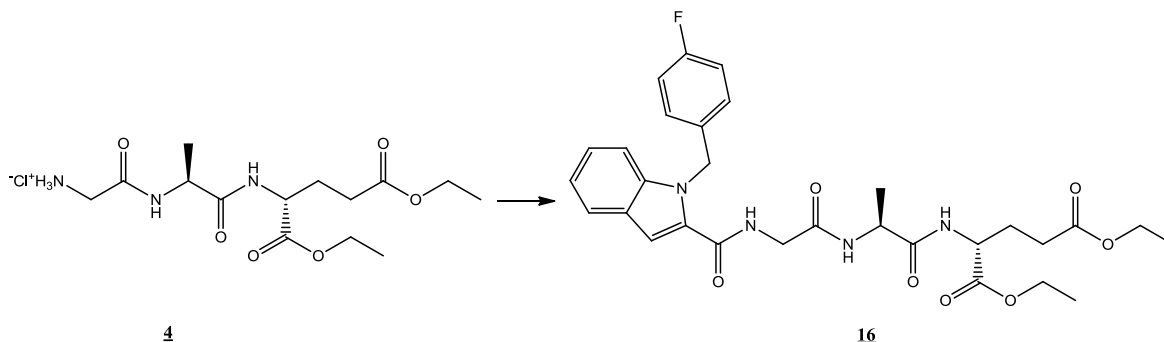
Mr (izračunana): 488,53

HR-MS: 489,2339 (izračunana: 489,2349)

Elementna sestava: C₂₄H₃₂N₄O₇

4.10. Sinteza (2R)-dietil 2-((2S)-2-(2-(1-(4-fluorobenzil)indol-2-karboksamido)acetamido)propanamido)pentandioata (16)

Reakcija:



Postopek:

V 25 mL bučko smo natehtali 43 mg (0,117 mmol) spojine **4**, jo raztopili v 5 mL diklorometana, ohladili na ledeni kopeli in dodali 41 μ L (2,5 eq; 0,293 mmol) trietilamina. Nato smo dodali 31,5 mg (0,117 mmol) 1-(4-fluorobenzil)indol-2-karboksilne kisline, 22,4 mg (0,117 mmol) EDC-HCl, 15,8 mg (0,117 mmol) HOBt in nekaj kristalov DMAP ter pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 24 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in po naslednjem postopku izvedli izolacijo: Reakcijski zmesi smo dodali še 20 mL diklorometana in ga spirali z 2×15 mL 1M HCl, 15 mL destilirane vode, 2×15 mL nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata, 15 mL destilirane vode in 15 mL nasičene raztopine natrijevega klorida. V organsko fazo smo dali žličko natrijevega sulfata in prefiltrirali, nato pa smo jo odpareli pod znižanim tlakom ter dobili 43 mg spojine **16**.

Rezultati:

Izgled: rjav prašek

Izkoristek: 63,08 % (43 mg)

Rf: 0,65 (MF1: diklorometan/metanol : 9/1)

T_{tališča}: 36 - 40 °C

IR (cm⁻¹): 3303, 2980, 1732, 1643, 1529, 1508, 1454, 1375, 1349, 1317, 1260, 1214, 1157, 1095, 1018, 975, 845, 812, 742, 694, 645, 630, 602, 584, 564, 555

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1,12 - 1,15 (m, 6H, $2 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,28 (d, 3H, $J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_3\text{-Ala}$), 1,86 - 1,94 (m, 1H, $\text{H-}\beta\text{-Glu}$), 2,07 - 2,10 (m, 1H, $\text{H-}\beta\text{-Glu}$), 2,26 - 2,31 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-}\gamma\text{-Glu}$), 3,98 - 4,06 (m, 6H, $2 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$ in NHCH_2), 4,42 - 4,53 (m, 2H,

Branka Vuković:

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

CH-Glu in CH-Ala), 5,60 (s, 2H, CH_2Ph), 6,78 - 6,83 (m, 2H, Ar-H), 6,93 - 7,00 (m, 2H, Ar-H), 7,05 - 7,07 (m, 2H, Ar-H), 7,13 (d, 1H, $J = 7,2$ Hz, Ar-H), 7,18 (t, 2H, $J = 3,2$ Hz, Ar-H), 7,29 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, NH-Ala), 7,45 (t, 1H, $J = 5,2$ Hz, CONHCH_2), 7,55 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, NH-Glu)

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 14.07, 14.14, 18.22, 26.88, 30.34, 30.97, 43.23, 47.19, 48.99, 51.88, 60.85, 61.74, 105.97, 110.70, 115.35 (d, $J = 21,3$ Hz), 120.91, 122.20, 124.65, 126.29, 128.15 (d, $J = 8,0$ Hz), 130.53, 134.10 (d, $J = 3,0$ Hz), 138.72, 161.87 (d, $J = 243,5$ Hz), 162.84, 169.22, 171.85, 172.39, 172.95

HPLC (254 nm): 95,67 %, $t_R = 18,54$ min

MS (ESI): 583,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Mr (izračunana): 582,62

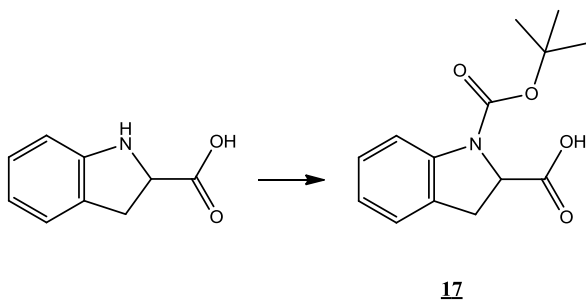
HR-MS: 583,2555 (izračunana: 583,2568)

Elementna sestava: $\text{C}_{30}\text{H}_{35}\text{FN}_4\text{O}_7$

4.11. Sinteza zmesi diastereoizomerov (2R)-dietil 2-((2S)-2-(2-(1-(*tert*-butoksikarbonil)indolin-2-karboksamido)acetamido)propanamido)pentandioata (18)

4.11.1. Sinteza 1-(*tert*-butoksikarbonil)-indolin-2-karboksilne kisline (17)

Reakcija:



Postopek:

V 50 mL bučko smo natehtali 87 mg (0,533 mmol) indolin-2-karboksilne kisline in 67,2 mg (1,5 eq; 0,800 mmol) natrijevega hidrogenkarbonata, ju raztopili v 8 mL destilirane vode in mešali na ledeni kopeli. V čašo smo natehtali 139,6 mg (1,2 eq; 0,640 mmol) BOC-anhidrida in ga raztopili v 10 mL THF. Vsebino čaše smo zlili v bučko, v kateri sta bila indolin-2-karboksilna kislina in natrijev hidrogenkarbonat ter pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 24 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in po naslednjem postopku izvedli izolacijo: Reakcijsko zmes smo ekstrahirali z 10 mL dietil etra, nato pa vodno fazo na ledeni kopeli nakisali z 0,5M HCl do pH 2-3. Vodno fazo smo ekstrahirali s 3 × 20 mL etilacetata, nato smo organsko fazo spirali z nasičeno raztopino natrijevega klorida. V organsko fazo smo dali žličko natrijevega sulfata in prefiltrirali, nato pa smo jo odpareli pod znižanim tlakom ter dobili 110 mg spojine 17.

Rezultati:

Izgled: umazano bel prašek

Izkoristek: 78,38 % (110 mg)

Rf: 0,38 (MF1: diklorometan/metanol =9/1)

T_{tališča}: 62 - 66 °C

Branka Vuković:

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

IR (cm⁻¹): 2359, 1732, 1694, 1486, 1404, 1371, 1346, 1324, 1282, 1243, 1216, 1160, 1149, 1049, 1022, 845, 762, 750, 633, 621, 612, 597, 582, 574, 558, 552

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1,53 (s, 9H, BOC), 3,03 (d, 2H, *J* = 14 Hz, CH₂-indolin), 3,52 (t, 1H, *J* = 14 Hz, CH-indolin), 6,94 (d, 1H, *J* = 7,2 Hz, Ar-H), 7,17 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz, Ar-H), 7,39 (s, 1H, Ar-H), 7,73 (d, 1H, *J* = 6,0 Hz, Ar-H), 12,94 (s, 1H, COOH)

MS (ESI): 262,1 [M-H]⁻

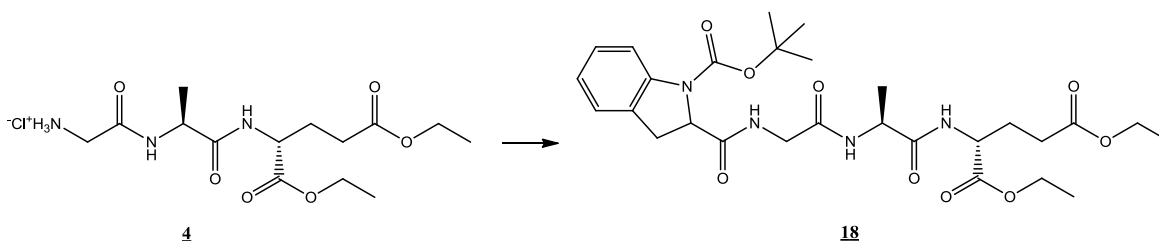
Mr (izračunana): 263,29

HR-MS: 262,1078 (izračunana: 262,1079)

Elementna sestava: C₁₄H₁₇NO₄

4.11.2. Sinteza zmesi diastereoizomerov (2R)-dietil 2-((2S)-2-(2-(1-(*tert*-butoksikarbonil)indolin-2-karboksamido)acetamido)propanamido)pentandioata (**18**)

Reakcija:



Postopek:

V 25 mL bučko smo natehtali 63 mg (0,171 mmol) spojine **4**, jo raztopili v 5 mL diklorometana, ohladili na ledeni kopeli in dodali 60 μ L (2,5 eq; 0,428 mmol) trietilamina. Nato smo dodali 45,0 mg (0,171 mmol) spojine **17**, 32,8 mg (0,171 mmol) EDC-HCl, 23,1 mg (0,171 mmol) HOBt in nekaj kristalov DMAP ter pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 72 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in po naslednjem postopku izvedli izolacijo: Reakcijski zmesi smo dodali še 20 mL diklorometana in ga spirali z 2×15 mL 0,5M HCl, 15 mL destilirane vode, 2×15 mL nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata, 15 mL destilirane vode in 15 mL nasičene raztopine natrijevega klorida. V organsko fazo smo dali žličko natrijevega sulfata in prefiltrirali, nato pa smo jo odpareli pod znižanim tlakom ter dobili 56 mg spojine **18**.

Rezultati:

Izgled: rumeno-bel prašek

Izkoristek: 56,79 % (56 mg)

Rf: 0,53 (MF1: diklorometan/metanol = 9/1)

T_{tališča}: 91 - 95 °C

IR (cm⁻¹): 669, 617, 606, 585, 571, 561

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1,14 - 1,20 (m, 6H, $2 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,31 - 1,34 (m, 3H, CH_3 -Ala), 1,49 (s, 9H, BOC), 1,86 - 1,93 (m, 1H, $\text{H}-\beta$ -Glu), 2,06 - 2,13 (m, 1H, $\text{H}-\beta$ -Glu), 2,26 - 2,34 (m, 2H, CH_2 - γ -Glu), 3,12 - 3,17 (m, 2H, indolin- CH_2), 3,39 - 3,46 (m, 1H, indolin- CH), 3,78 - 4,11 (m, 6H, $2 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$ in NHCH_2), 4,40 - 4,47 (m, 1H,

Branka Vuković:

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

CH-Glu , 4,79 (k, 1H, $J = 5,2$ Hz, CH-Ala), 6,88 - 6,92 (m, 2H, Ar- H), 7,06 - 7,13 (m, 2H, Ar- H), 7,48 - 7,52 (m, 3H, CONHCH_2 , NH-Ala in NH-Glu)

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 14.13, 14.16, 26.74, 26.82, 28.34, 30.34, 30.47, 38.63, 43.11, 49.00, 49.12, 51.91, 60.77, 61.52, 61.56, 61.90, 61.97, 115.21, 115.28, 123.28, 124.94, 127.73, 127.79, 171.59, 171.68, 172.11, 172.60, 173.10, 173.18

HPLC (254 nm): 52,68 %, $t_R = 14,74$ min in 43,71 %, $t_R = 15,08$ min

MS (ESI): 577,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$

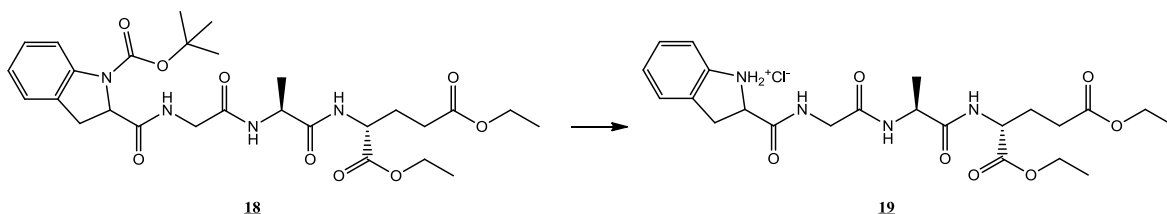
Mr (izračunana): 576,64

HR-MS: 577,2878 (izračunana: 577,2874)

Elementna sestava: $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_9$

4.12. Sinteza zmesi diastereoizomerov 2-((2-(((2S)-1-(((2R)-1,5-dietoksi-1,5-dioksopentan-2-il)amino)-1-oksopropan-2-il)amino)-2-oksoetil)karbamoil)indolin-1-ijevega klorida (**19**)

Reakcija:



Postopek:

V 25 mL bučko smo natehtali 25 mg (0,043 mmol) spojine **18**, jo raztopili v 5 mL dietil etra in 1 mL etanola, ohladili na ledeni kopeli in nato 15 minut prepihavali s HCl_(g), nakar smo bučko zaprli in pustili mešati na sobni temperaturi. Po 24 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in topilo odpareli pod znižanim tlakom ter dobili 20 mg spojine **19**.

Rezultati:

Izgled: rjav prašek

Izkoristek: 90,67 % (20 mg)

Rf: 0 (MF1: diklorometan/metanol = 9/1; ninhidrin)

T_{tališča}: 67 - 71 °C

IR (cm⁻¹): 3244, 2983, 1728, 1641, 1544, 1447, 1376, 1331, 1211, 1085, 1021, 937, 747, 604, 577, 562

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1,05 - 1,33 (m, 6H, 2 × CH₂CH₃), 1,45 (d, 3H, *J* = 7,2 Hz, CH₃-Ala), 1,87 - 1,94 (m, 1H, H-β-Glu), 2,00 - 2,10 (m, 1H, H-β-Glu), 2,17 - 2,34 (m, 2H, CH₂-γ-Glu), 3,92 - 4,14 (m, 8H, 2 × CH₂CH₃, NHCH₂, indolin-CH₂), 4,29 - 4,43 (m, 3H, CH-Glu, CH-Ala in indolin-CH), 6,96 - 7,16 (m, 4H, Ar-H), 7,35 - 7,39 (m, 3H, CONHCH₂, NH-Ala in NH-Glu), 7,53 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, indolin-NH₂)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.49, 17.94, 27.38, 31.00, 44.24, 49.49, 49.70, 50.56, 53.25, 62.58, 79.66, 113.18, 121.28, 122.86, 125.27, 128.89, 162.64, 166.33, 175.09, 175.11, 175.15

MS (ESI): 476,2 [M-HCl]

Mr (izračunana): 512,98

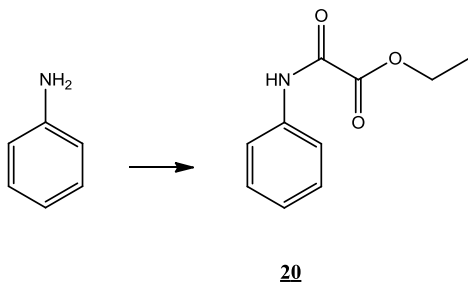
HR-MS: 476,2277 (izračunana: 476,2271)

Elementna sestava: C₂₃H₃₃ClN₄O₇

4.13. Sinteza (2R)-dietil 2-((2S)-2-(2-(2-okso-2-(fenilamino)acetamido)acetamido)propanamido)pentandioata (22)

4.13.1. Sinteza etil-2-okso-2-(fenilamino)acetata (20)

Reakcija:



Postopek:

V 50 mL bučko smo natehtali 272 mg (2,92 mmol) anilina in 403,6 mg (2,92 mmol) kalijevega karbonata, ju raztopili v 10 mL acetonitrila, ter 10 minut mešali na ledeni kopeli. Nato smo po kapljicah dodali 327 μ L (2,92 mmol) etil oksalil klorida, raztopljenega v acetonitrilu in pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 24 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in po naslednjem postopku izvedli izolacijo: Reakcijsko zmes smo raztopili v 15 mL diklorometana in organsko fazo sprali z 20 mL destilirane vode in 15 mL nasičene raztopine natrijevega klorida. V organsko fazo smo dali žličko natrijevega sulfata in prefiltrirali, nato pa smo jo odpareli pod znižanim tlakom ter dobili 255 mg spojine **20**.

Rezultati:

Izgled: rjav prašek

Izkoristek: 45,23 % (255 mg)

Rf: 0,88 (MF2: heksan/etilacetat = 1/1; ninhidrin)

T_{tališča}: 65 - 68 °C

IR (cm⁻¹): 3304, 1705, 1666, 1596, 1529, 1498, 1440, 1368, 1288, 1234, 1172, 1079, 1020, 938, 902, 870, 848, 811, 779, 756, 736, 708, 688, 653, 634, 615, 602, 593, 581, 567, 552

Branka Vuković:

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

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1,31 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, CH_2CH_3), 4,30 (k, 2H, $J = 7,2$ Hz, CH_2CH_3), 7,15 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, Ar-H), 7,36 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, Ar-H), 7,73 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar-H), 10,78 (s, 1H, NH)

MS (ESI): 194,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$

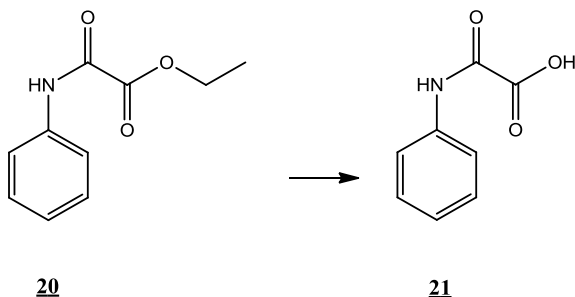
Mr (izračunana): 193,07

HR-MS: 194,0819 (izračunana: 194,0817)

Elementna sestava: $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_3$

4.13.2. Sinteza 2-okso-2-(fenilamino)ocetne kisline (**21**)

Reakcija:



Postopek:

Spojino **20** smo raztopili v 4 mL THF, dodali 3,9 mL (6 eq; 7,92 mmol) 2M litijevega hidroksida in pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 24 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in THF odpareli pod znižanim tlakom. Dodali smo 20 mL vode in raztopino na ledeni kopeli nakisali z 1M HCl do pH 2-3. Vodno fazo smo ekstrahirali s 3 × 15 mL etilacetata in organsko fazo spirali s 15 mL nasičene raztopine natrijevega klorida. V organsko fazo smo dali žličko natrijevega sulfata in prefiltrirali, nato pa smo jo odpareli pod znižanim tlakom ter dobili 151 mg spojine **21**.

Rezultati:

Izgled: umazano bel prašek

Izkoristek: 69,27 % (151 mg)

Rf: 0 (MF2: heksan/etilacetat = 1/1)

T_{tališča}: 134 - 138 °C

IR (cm⁻¹): 3307, 1760, 1684, 1598, 1547, 1496, 1446, 1346, 1312, 1245, 1208, 1165, 1029, 935, 902, 838, 755, 733, 719, 689, 622, 598, 578, 566

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 7,11 - 7,15 (m, 3H, Ar-H), 7,34 (t, 2H, J = 7,2 Hz, Ar-H), 7,75 (d, 1H, J = 7,6 Hz, NH), 10,68 (s, 1H, COOH)

MS (ESI): 164,0 [M-H]⁻

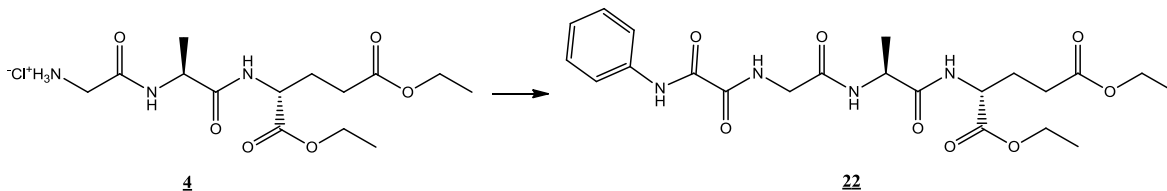
Mr (izračunana): 165,15

HR-MS: 164,0349 (izračunana: 164,0348)

Elementna sestava: C₈H₇NO₃

4.13.3. Sinteza (2*R*)-dietil 2-((2*S*)-2-(2-(2-okso-2-(fenilamino)acetamido)acetamido)propanamido)pentandioata (**22**)

Reakcija:



Postopek:

V 25 mL bučko smo natehtali 42 mg (0,114 mmol) spojine **4**, jo raztopili v 5 mL diklorometana, ohladili na ledeni kopeli in dodali 40 μ L (2,5 eq; 0,285 mmol) trietilamina. Nato smo dodali 18,8 mg (0,114 mmol) spojine **21**, 21,9 mg (0,114 mmol) EDC-HCl, 15,4 mg (0,114 mmol) HOBt in nekaj kristalov DMAP ter pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 72 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in po naslednjem postopku izvedli izolacijo: Reakcijski zmesi smo dodali še 20 mL diklorometana in ga spirali z 2×15 mL 1M HCl, 15 mL destilirane vode, 2×15 mL nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata, 15 mL destilirane vode in 15 mL nasičene raztopine natrijevega klorida. V organsko fazo smo dali žličko natrijevega sulfata in prefiltrirali, nato pa smo jo odpareli pod znižanim tlakom ter dobili 8 mg spojine **22**.

Rezultati:

Izgled: bel prašek

Izkoristek: 14,67 % (8 mg)

Rf: 0,48 (MF1: diklorometan/metanol = 9/1)

T_{tališča}: 180 - 184 °C

IR (cm⁻¹): 3282, 1735, 1665, 1643, 1604, 1527, 1446, 1404, 1372, 1202, 1177, 1096, 1021, 753, 687, 598, 586, 567

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1,17 - 1,18 (m, 6H, $2 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,34 (d, 3H, $J = 5,6$ Hz, $\text{CH}_3\text{-Ala}$), 1,93 - 2,02 (m, 1H, $\text{H-}\beta\text{-Glu}$), 2,08 - 2,18 (m, 1H, $\text{H-}\beta\text{-Glu}$), 2,27 - 2,40 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-}\gamma\text{-Glu}$), 4,04 - 4,11 (m, 6H, $2 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$ in NHCH_2), 4,43 - 4,60 (m, 2H, CH-Glu in CH-Ala), 7,01 (d, 1H, $J = 6,8$ Hz, Ar-H), 7,08 - 7,12 (m, 2H, Ar-H), 7,19 (s,

Branka Vuković:

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

1H, Ar-H), 7,29 (t, 1H, $J = 6,8$ Hz, Ar-H), 7,61 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, NH-Ala), 7,97 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz, NH-Glu), 8,33 (s, 1H, CONHCH₂), 9,34 (s, 1H, CONH)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.11, 14.16, 18.44, 26.88, 30.31, 43.52, 48.96, 51.95, 60.92, 61.82, 85.12, 120.00, 125.39, 129.13, 136.44, 156.84, 160.86, 167.45, 171.79, 172.12, 173.14

HPLC (254 nm): 98,30 %, $t_R = 9,92$ min

MS (ESI): 479,2 [M+H]⁺

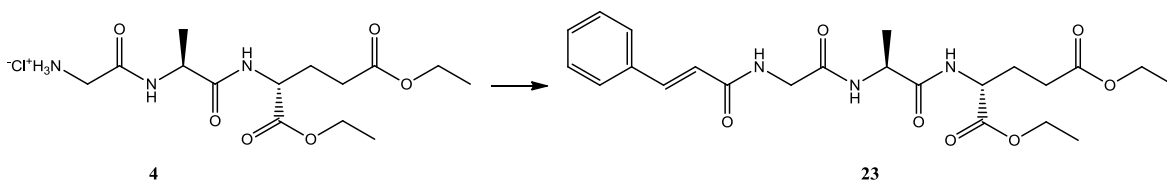
Mr (izračunana): 478,50

HR-MS: 479,2133 (izračunana: 479,2142)

Elementna sestava: C₂₂H₃₀N₄O₈

4.14. Sinteza **(2R)-dietil 2-((2S)-2-(2-cinamamidoacetamido)propanamido)pentandioata (23)**

Reakcija:



Postopek:

V 25 mL bučko smo natehtali 45 mg (0,122 mmol) spojine **4**, jo raztopili v 5 mL diklorometana, ohladili na ledeni kopeli in dodali 42 μ L (2,5 eq; 0,305 mmol) trietilamina. Nato smo dodali 18,1 mg (0,122 mmol) *trans*-cimetne kisline, 23,4 mg (0,122 mmol) EDC-HCl, 16,5 mg (0,122 mmol) HOBt in nekaj kristalov DMAP ter pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 24 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in po naslednjem postopku izvedli izolacijo: Reakcijski zmesi smo dodali še 20 mL diklorometana in ga spirali z 2 \times 15 mL 1M HCl, 15 mL destilirane vode, 2 \times 15 mL nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata, 15 mL destilirane vode in 15 mL nasičene raztopine natrijevega klorida. V organsko fazo smo dali žličko natrijevega sulfata in prefiltrirali, nato pa smo jo odpareli pod znižanim tlakom ter dobili 27 mg spojine **23**.

Rezultati:

Izgled: bel prašek

Izkoristek: 47,95 % (27 mg)

Rf: 0,41 (MF1: diklorometan/metanol : 9/1)

T_{tališča}: 101 - 105 °C

IR (cm⁻¹): 663, 631, 619, 601, 592, 586, 571, 559

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1,17 - 1,23 (m, 6H, 2 \times CH₂CH₃), 1,41 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz, CH₃-Ala), 1,98 - 2,07 (m, 1H, H- β -Glu), 2,16 - 2,23 (m, 1H, H- β -Glu), 2,36 - 2,40 (m, 2H, CH₂- γ -Glu), 4,05 - 4,16 (m, 6H, 2 \times CH₂CH₃ in NHCH₂), 4,54 - 4,59 (m, 1H, CH-Glu), 4,67 - 4,74 (m, 1H, CH-Ala), 6,59 (d, 2H, *J* = 15,6 Hz, 2 \times CH), 7,26 (s, 1H,

Branka Vuković:

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

Ar-H), 7,31 - 7,34 (m, 2H, Ar-H), 7,47 - 7,49 (m, 2H, Ar-H), 7,55 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, NH-Ala), 7,60 (s, 1H, NH-Glu), 7,66 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz, CONHCH₂)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.10, 14.15, 18.54, 26.93, 30.36, 43.52, 49.06, 51.85, 60.76, 61.68, 120.09, 120.12, 127.92, 128.81, 129.81, 134.74, 141.67, 166.70, 169.22, 171.91, 172.53, 172.56, 172.85

HPLC (254 nm): 94,75 %, $t_R = 9,72$ min

MS (ESI): 462,2 [M+H]⁺

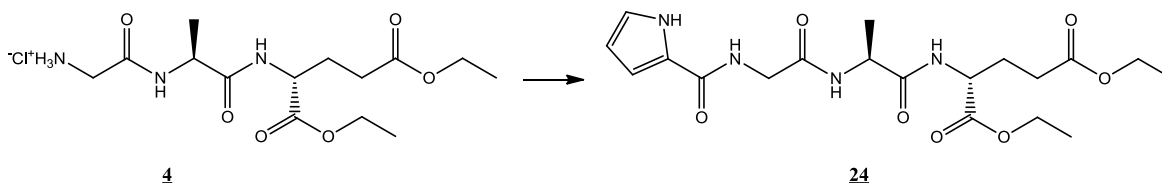
Mr (izračunana): 461,51

HR-MS: 462,2232 (izračunana: 462,2240)

Elementna sestava: C₂₃H₃₁N₃O₇

4.15. Sinteza (2R)-dietil 2-((2S)-2-(2-(pirol-2-karboksamido)acetamido)propanamido)pentandioata (24)

Reakcija:



Postopek:

V 25 mL bučko smo natehtali 43 mg (0,117 mmol) spojine **4**, jo raztopili v 5 mL diklorometana, ohladili na ledeni kopeli in dodali 41 μ L (2,5 eq; 0,293 mmol) trietilamina. Nato smo dodali 13,0 mg (0,117 mmol) pirol-2-karboksilne kisline, 22,4 mg (0,117 mmol) EDC-HCl, 15,8 mg (0,117 mmol) HOBt in nekaj kristalov DMAP ter pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 24 urah smo s TLC zaznali konec reakcije in po naslednjem postopku izvedli izolacijo: Reakcijski zmesi smo dodali še 20 mL diklorometana in ga spirali z 2×15 mL 1M HCl, 15 mL destilirane vode, 2×15 mL nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata, 15 mL destilirane vode in 15 mL nasičene raztopine natrijevega klorida. V organsko fazo smo dali žličko natrijevega sulfata in prefiltrirali, nato pa smo jo odpareli pod znižanim tlakom ter dobili 16 mg spojine **24**.

Rezultati:

Izgled: bel prašek

Izkoristek: 32,22 % (16 mg)

Rf: 0,40 (MF1: diklorometan/metanol : 9/1)

T_{tališča}: 42 - 46 °C

IR (cm⁻¹): 2359, 614, 591, 578, 566

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1,21 - 1,27 (m, 6H, $2 \times$ CH₂CH₃), 1,39 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz, CH₃-Ala), 2,00 - 2,10 (m, 1H, H- β -Glu), 2,18 - 2,24 (m, 1H, H- β -Glu), 2,39 - 2,44 (m, 2H, CH₂- γ -Glu), 4,08 - 4,18 (m, 6H, $2 \times$ CH₂CH₃ in NHCH₂), 4,51 - 4,56 (m, 1H, CH-Glu), 4,64 - 4,68 (m, 1H, CH-Ala), 6,20 - 6,21 (m, 1H, Ar-H), 6,70 - 6,72 (m, 1H, Ar-H), 6,93 - 6,94 (m, 1H, Ar-H), 7,07 (s, 1H, CONHCH₂), 7,46 (d, 1H, $J = 7,2$ Hz, NH-Ala), 7,65 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, NH-Glu), 10,27 (s, 1H, pirol-NH)

Branka Vuković:

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

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.10, 14.15, 18.49, 26.88, 30.41, 43.56, 49.06, 52.01, 60.89, 61.74, 109.84, 110.56, 122.30, 125.02, 161.84, 169.25, 171.98, 172.63, 173.20

HPLC (254 nm): 93,46 %, t_R = 5,00 min

MS (ESI): 425,2 [M+H]⁺

Mr (izračunana): 424,45

HR-MS: 425,2030 (izračunana: 425,2036)

Elementna sestava: C₁₉H₂₈N₄O₇

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

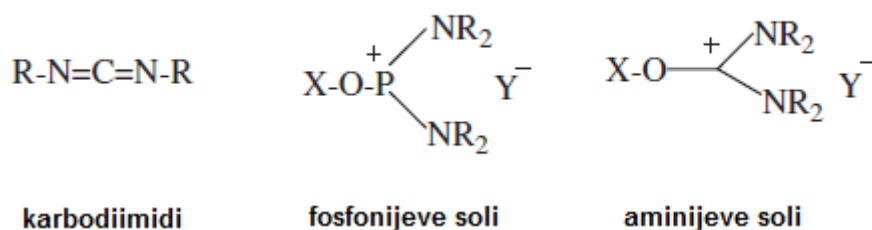
5.1. SINTEZNI POSTOPKI

Opisali bomo sintezne postopke, ki smo jih pri našem eksperimentalnem delu uporabili ter probleme, na katere smo naleteli.

5.1.1. Tvorba amidne vezi

Pri našem delu je bila tvorba amidne vezi najbolj pogosto uporabljena reakcija. Amidno vez smo tvorili med aminokislinami pri sintezi tripeptida (spojini **2** in **3**), med tripeptidom in različnimi karboksilnimi kisljinami pri sintezi končnih spojin **5**, **6**, **8**, **10**, **14**, **15**, **16**, **18**, **22**, **23** in **24** ter tudi pri sintezi spojin **20** in **11**.

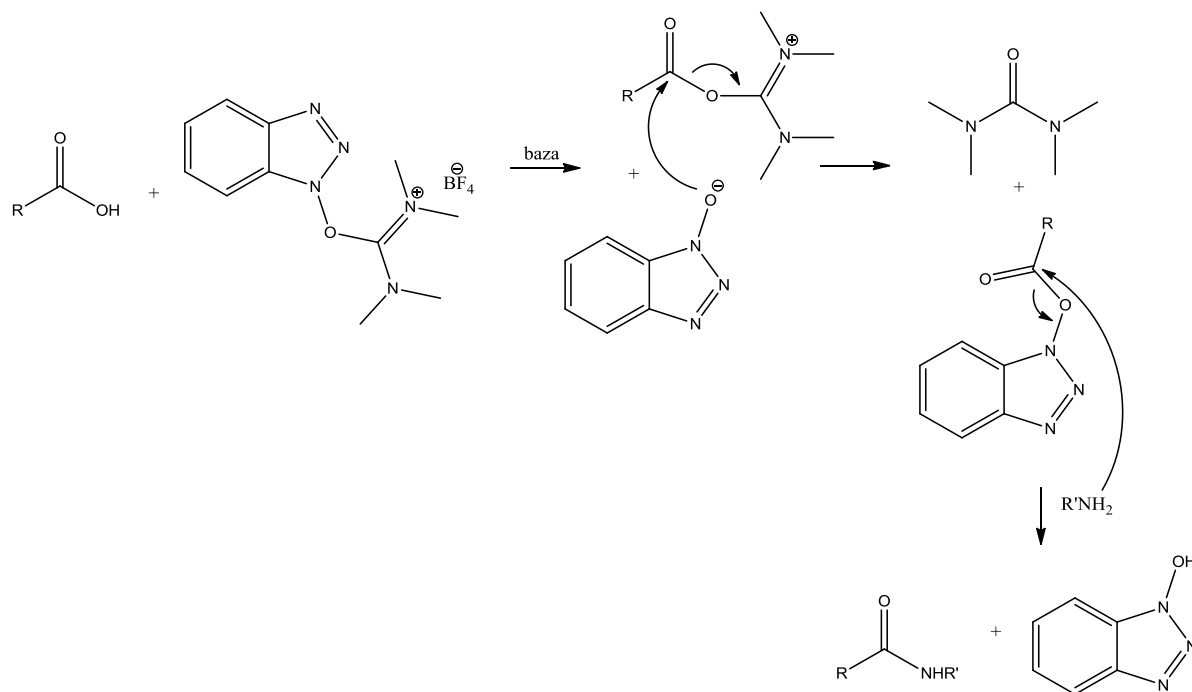
Amidna vez nastane med karboksilno in amsko skupino, ker pa je karboksilna skupina slabo reaktivna, jo je potrebno najprej aktivirati in tako pretvoriti v bolj reaktivno obliko. Za to lahko uporabimo sklopitveni reagent, s katerim »*in situ*« aktiviramo karboksilno skupino in jo pretvorimo v bolj reaktivno funkcionalno skupino, kot so kislinski kloridi, kislinski anhidridi, aktivirani estri in kislinski azidi. Prvi korak je torej aktivacija karboksilne skupine prve spojine, drugi korak pa je adicija amske skupine druge spojine na aktivirano karboksilno kislino. Mehanizem, po katerem reakcija poteče, je nukleofilna substitucija na karbonilni skupini, in sicer najprej poteče adicija amina, čemur sledi eliminacija vode. Najbolj pogosto uporabljeni sklopitveni reagenti so karbodiimidi ter fosfonijeve in aminijeve soli (slika 11) (39, 40).



Slika 11: Najpogosteje uporabljeni sklopitveni reagenti

Za sintezo spojin **2** in **3** smo izbrali sklopitveni reagent *N,N,N',N'*-tetrametil-*O*-(benzotriazol-1-il)-uronijev tetrafluoroborat (TBTU), ki se je izkazal kot učinkovit reagent za aktivacijo karboksilne kisline in tvorbo amidne vezi že pri sobni temperaturi (41). TBTU je najprej reagiral s karboksilno skupino ene spojine, pri čemer se je tvoril aktiviran

ester, ki je nato reagiral z amsko skupino druge spojine in tvorila se je amidna vez. Kot bazo smo dodali *N*-metilmorfolin, ki je ioniziral karboksilno skupino (slika 12).

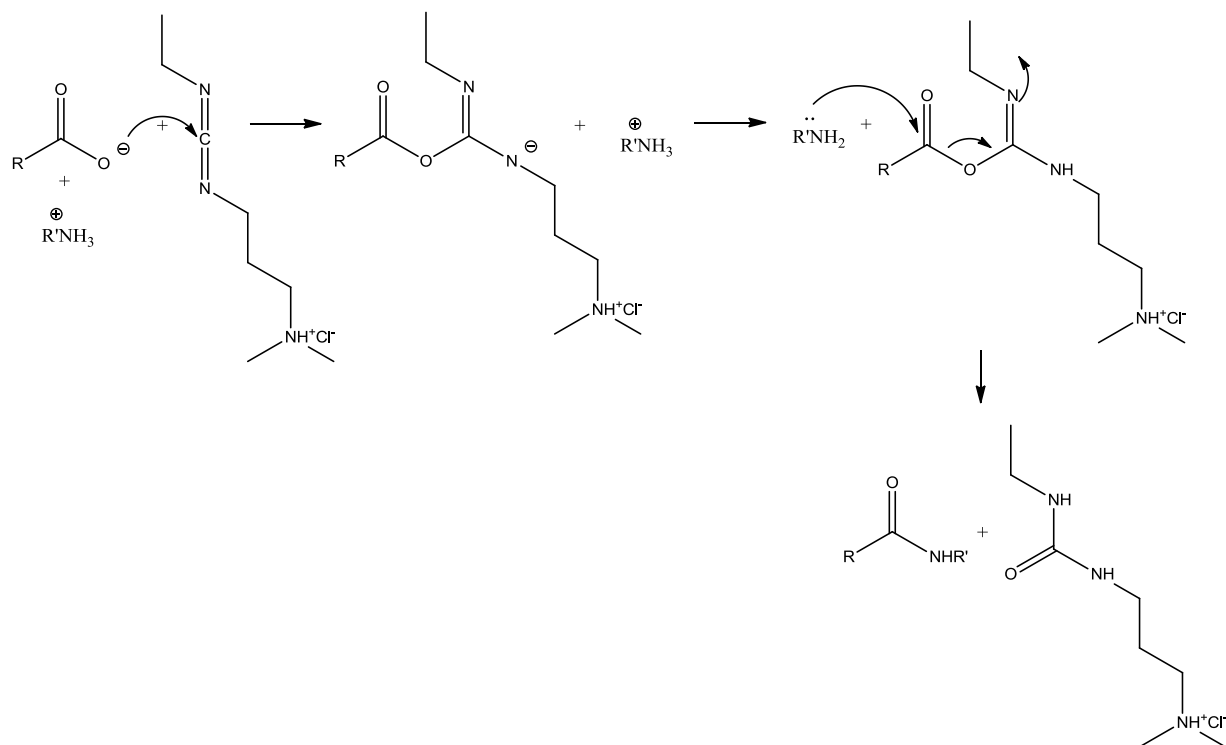


Slika 12: Aktivacija karboksilne skupine s TBTU in tvorba amidne vezi (39)

Pri sintezi spojine **2** smo amidno vez tvorili med amsko skupino (2*R*)-1,5-dietoksi-1,5-dioksopentan-2-aminijevega klorida (spojina **1**) in karboksilno skupino BOC-L-alanina, nadalje pa smo po odstranitvi BOC zaščite iz amske skupine spojine **2** tvorili še amidno vez med amsko skupino, nastalo po odščiti, in karboksilno skupino BOC-glicina ter sintetizirali spojino **3**. Obe tvorbi amidnih vezi sta potekli pri sobni temperaturi (72 ur in 120 ur), izkoristek sinteze spojine **2** (40 %) pa je bil slabši kot pa izkoristek sinteze spojine **3** (98 %). Pri sintezi spojine **3** smo BOC-glicin še pred dodatkom spojine **2** aktivirali, in sicer tako, da smo mu dodali TBTU in *N*-metilmorfolin ter pustili mešati 1 uro, šele nato pa smo v bučko dodali spojino **2**, ki smo ji že odstranili zaščito na amski skupini. To bi lahko bil razlog, da je bil izkoristek tvorbe amidne vezi v tem primeru boljši, saj smo pri sintezi spojine **2** BOC-L-alanin aktivirali manj časa (15 minut).

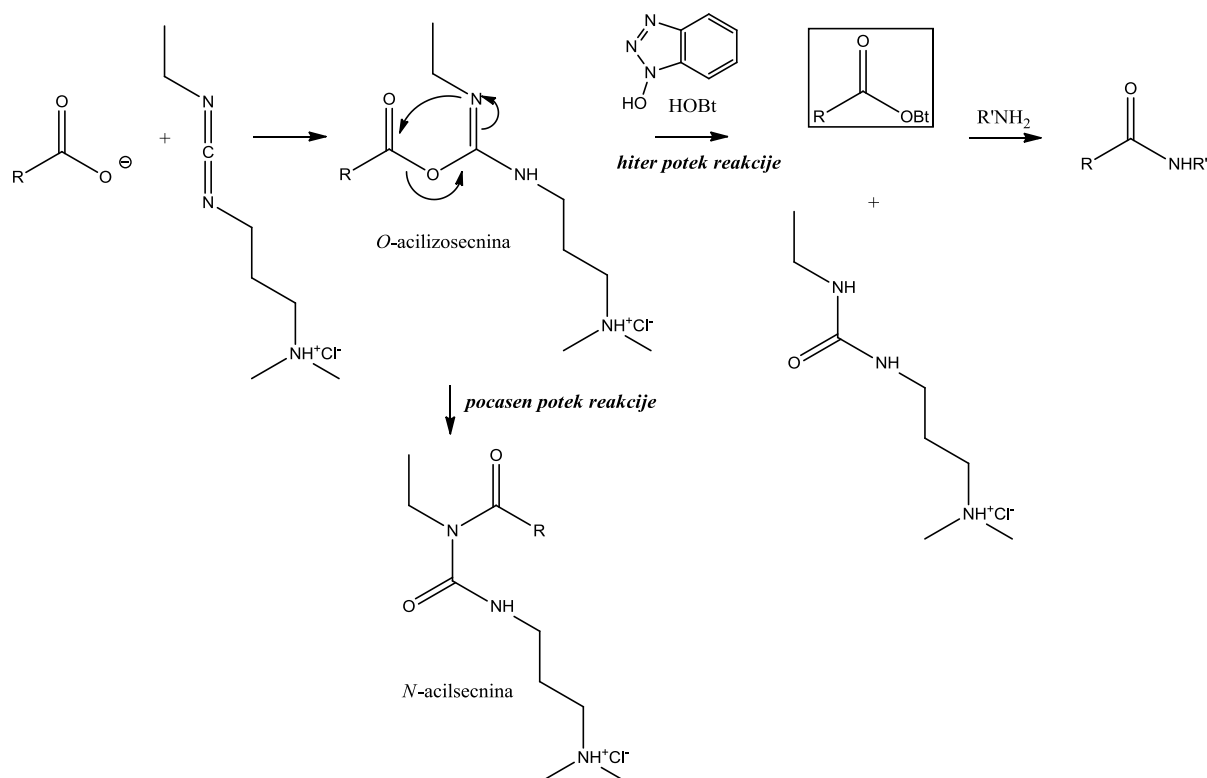
Za sintezo končnih spojin smo kot sklopitveni reagent uporabili 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid (EDC-HCl) in bazo trietilamin. EDC je s

karboksilno kislino tvoril mešan anhidrid *O*-acilsečnine, ki je nato lahko reagiral z aminske skupino tripeptida Gly-L-Ala-D-Glu(OEt)₂ in tvorila se je amidna vez (slika 13) (39).



Slika 13: Aktivacija karboksilne skupine s pomočjo EDC in tvorba amidne vezi (39)

Pri reakciji s karbodiimidom pogosto pride do nastanka stranskih produktov, kot so produkti racemizacije in nereaktivna *N*-acilsečnina. Stranske reakcije lahko v precejšnji meri zmanjšamo tako, da najprej s sklopitvenim reagentom aktiviramo karboksilno kislino pri 0 °C, šele nato pa dodamo amin ali pa s pomočjo pomožnih nukleofilov oziroma katalizatorjev, ki jih dodamo v reakcijsko zmes. Ti nukleofili reagirajo hitreje kot pa se zgodi acilna premestitev in tvorijo se intermediati, ki so še vedno dovolj aktivni, da lahko pride do sklopitve z aminom (slika 14). Primera takšnih nukleofilov sta 4-dimetilamino-piridin (DMAP) in 1-hidroksibenzotriazol (HOBt) in da bi čimbolj preprečili tvorbo stranskih produktov, smo ju v reakcijsko zmes pri sintezi vseh končnih spojin dodali tudi mi (39).



Slika 14: Uporaba HOBt-a za zmanjšanje tvorbe stranskega produkta *N*-acilsečnine (39)

Tvorbe amidne vezi pri sintezi končnih spojin so potekle v 24 do 120 urah, izkoristki pa so bili zadovoljivi (približno od 40 % do 70 %), razen pri sintezi spojin **10**, **15**, **22** in **24**, kjer so bili izkoristki nekoliko slabši, kar je verjetno posledica steričnih in elektronskih lastnosti izhodnih karboksilnih kislin. Za slabši izkoristek sinteze spojine **10** (33 %) bi lahko bila odgovorna povečana elektronska gostota na nitro skupini izhodne karboksilne kisline. Pri sintezi spojine **15** (19 %) pa je slabši izkoristek verjetno posledica steričnih ovir, saj smo izhajali iz 1-metilindol-2-karboksilne kisline, kjer je nastanek amidne vezi najverjetneje sterično ovirala metilna skupina, vezana na indolnem dušiku. Pri vseh reakcijah se najverjetneje nismo povsem izognili tvorbi stranskih produktov, do izgube nekaj produkta pa je prišlo tudi pri izolaciji spojin. Mogoče bi boljše izkoristke lahko dosegli, če bi poleg tega, da smo v reakcijsko zmes dodali DMAP in HOBt, upoštevali tudi zgoraj naveden postopek za zmanjšanje obsega stranskih reakcij (s sklopitvenim reagentom bi najprej aktivirali karboksilno kislino pri 0 °C, šele nato pa dodali tripeptid). Iz HPLC kromatogramov končnih spojin, vidimo, da je bila čistota večine spojin nad 90 %. Pri sintezi spojine **18**, kjer je bila izhodna spojina **17** (1-(*tert*-butoksikarbonil)-indolin-2-karboksilna kislina) v obliki racemata (imamo stereogeni center), pa sta se tvorila dva

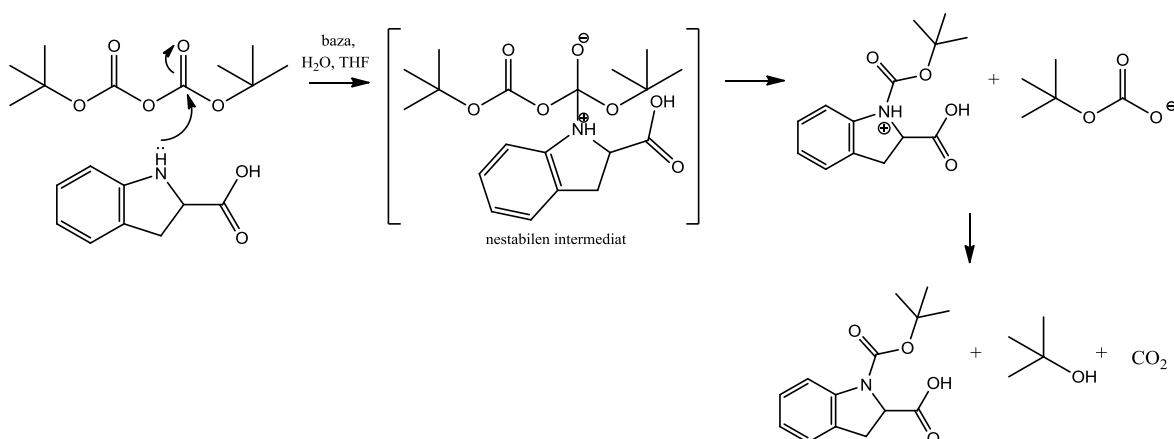
diastereoizomera (HPLC analiza: 52,68 % in 43,71 %) z različnimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi. Zmes dveh diastereoizomerov je bila posledično tudi spojina **19**, ki smo jo sintetizirali iz spojine **18**, nismo pa naredili meritve, s katero bi potrdili, če se je tudi razmerje diastereoizomerov po tvorbi soli iz spojine **18** ohranilo.

Amidno vez smo tvorili tudi pri sintezi spojine **20**, kjer je potekla reakcija med anilinom ter kislinskim kloridom (etil oksalil klorid) v prisotnosti kalijevega karbonata kot baze. Reakcija je potekla s 45 % izkoristkom.

Pri sintezi spojine **11** je izhodna spojina **10** vsebovala nitro skupino, ki smo jo s katalitskim hidrogeniranjem najprej reducirali do aminske skupine, ki smo jo nato acilirali z lavroil kloridom, kot bazo smo uporabili natrijev hidrogenkarbonat. Izkoristek sinteze je bil zadovoljiv (69 %), čistota končne spojine pa je bila 91 %.

5.1.2. Zaščita aminske skupine v obliki karbamata in njena odščita

Pri sintezi končne spojine **19** smo tvorili amidno vez med tripeptidom in indolin-2-karboksilno kislino. Ker ima indolin-2-karboksilna kislina dve reaktivni mesti, in sicer karboksilno skupino in indolinski dušik, smo morali dušik najprej zaščititi, saj smo želeli, da bi reakcija potekla le na karboksilni skupini. Dušik smo zaščitili v obliki karbamata (*tert*-butil karbamat - BOC) in tvorili spojino **17**. Izvedli smo *N*-aciliranje, kjer smo kot reagent uporabili BOC₂O (di-*tert*-butildikarbonat), kot bazo natrijev hidrogenkarbonat ter kot topilo vodo in THF (slika 15). Reakcija je potekla z dobrim izkoristkom (78 %).

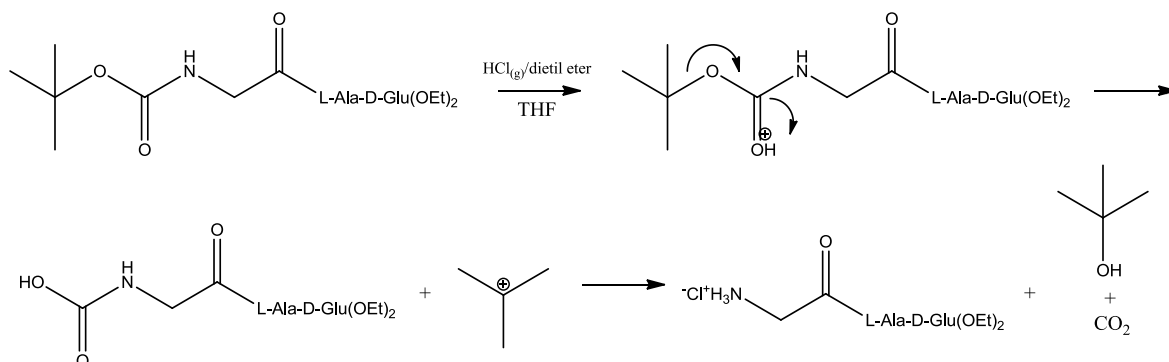


Slika 15: Uvedba BOC-zaščite na indolinski dušik

Med zaščiteno indolin-2-karboksilno kislino in tripeptidom smo nato tvorili amidno vez in sintetizirali spojino **18**, nato pa smo v naslednji stopnji BOC-zaščito odstranili in dobili

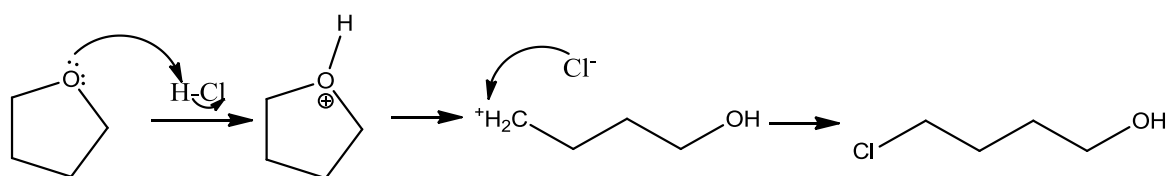
spojino **19**. BOC-zaščito odstranimo z acidolizo in v našem primeru smo uporabili eter prepihan s $\text{HCl}_{(g)}$. Amino skupino smo imeli zaščiten v obliki karbamata tudi pri sintezi tripeptida in tudi tam smo jo odstranili z acidolizo, bodisi z uporabo $\text{HCl}_{(g)}$ ali pa trifluoroocetne kisline.

Pri odstranitvi BOC-zaščitne skupine že predhodno pripravljenega tripeptida je bil kot reagent uporabljen $\text{HCl}_{(g)}$ /dietil eter in topilo THF (slika 16).



Slika 16: Odstranitev BOC-zaščite iz tripeptida z acidolizo

Med odstranjevanjem BOC-zaščite je prišlo do odprtja tetrahidrofuranskega obroča v prisotnosti $\text{HCl}_{(g)}$ in tvoril se je 4-klorobutan-1-ol (slika 17), ki se je namesto etanola vezal na zaestreno D-glutaminsko kislino. V literaturi zasledimo, da so o takšnem odprtju THF s HCl in tvorbi 4-klorobutan-1-ola, kot tudi o odprtju THF z drugimi vodikovimi halogenidi že poročali (42, 43).



Slika 17: Odprtje tetrahidrofuranskega obroča v prisotnosti HCl

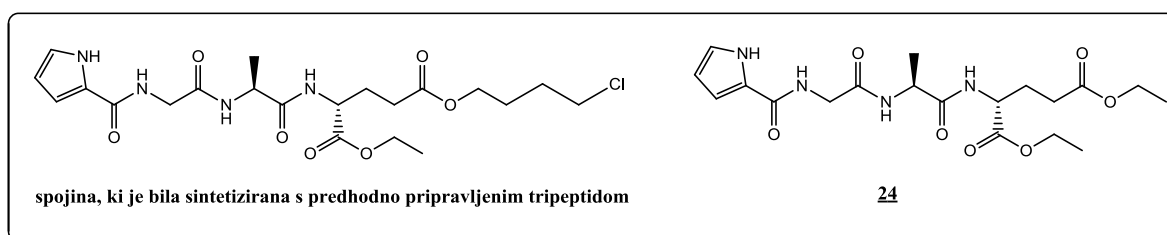
Pri analizi dezmuramildipeptidov, ki so bili sintetizirani s takšnim že predhodno pripravljenim tripeptidom, smo pri ^1H NMR ter pri masni analizi videli dodatne vodikove atome. Pri ^1H NMR spektru za (2*R*)-dietil 2-((2*S*)-2-(2-(pirol-2-karboksamido)acetamido)propanamido)pentandioat v primerjavi s spojino **24** vidimo dodaten multiplet pri 1,79 - 1,80 ppm, ki se integrira za 4 vodikove atome (m, 4H, $(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{Cl}$) ter dodaten triplet pri

3,54 ppm, ki se integrira za 2 vodikova atoma (t , $2H$ $J = 6,0$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{Cl}}$) (strukturi obeh spojin sta predstavljeni na sliki 18). Pri masni analizi pa ugotovimo večjo molekulsko maso zaradi dodatnih vodikov in klora (meritve za ostale dezmuramildipeptide niso navedene):

MS (ESI): 485,2 [M-H]⁻

Mr (izračunana): 486,95

HR-MS: 485,1808 (izračunana: 485,1803) **Elementna sestava:** C₂₁H₃₁ClN₄O₇



Slika 18: Struktura spojine, sintetizirane s predhodno pripravljenim tripeptidom in spojine **24**

Da bi se odprtju tetrahidrofuranskega obroča pri sintezi tripeptida izognili, smo pri reakciji odstranjevanja BOC-zaščitne skupine iz tripeptida zamenjali topilo, tako smo namesto THF uporabili etanol, kar se je izkazalo za dobro izbiro.

5.1.3. Sinteza in hidroliza estrov

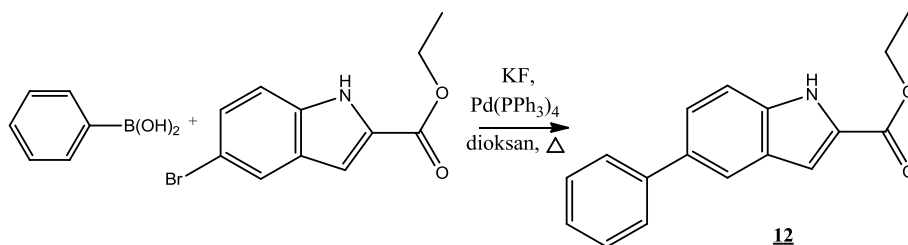
V prvi stopnji sinteze tripeptida smo obe karboksilni skupini D-glutaminske kisline zaestrili z etanolom in sintetizirali spojino **1**. Enako kot pri tvorbi amidne vezi je tudi pri sintezi estrov potrebno najprej aktivirati karboksilno kislino. V našem primeru smo s tionil kloridom tvorili kislinski klorid, ki je nato lahko reagiral z etanolom kot nukleofilom, pri čemer je potekla nukleofilna substitucija. Reakcija je potekla v približno dveh urah in s popolnim izkoristkom (100 %).

Hidrolizo estrov smo izvedli pod bazičnimi pogoji v vodnem mediju in sintetizirali spojine **7** (5-bromoindol-2-karboksilna kislina), **9** (5-nitroindol-2-karboksilna kislina), **13** (5-fenilindol-2-karboksilna kislina) in **21** (2-okso-2-(fenilamino)ocetna kislina). Pri reakciji smo uporabili 6 eq 2M litijevega hidroksida, kot topilo pa smo uporabili etanol ali pa THF in vodo, pri tem je potekla nukleofilna substitucija (44). Naše spojine so bile po hidrolizi v vodni fazi, ki smo jo pred izolacijo nakisali z 1M HCl in tako pretvorili sol v nedisociirano obliko. Nato pa smo vodno fazo ekstrahirali z etilacetatom in naša spojina se je po

ekstrakciji nahajala v organski fazi. Izkoristki hidroliz pri sintezi spojin **7**, **13** in **21** so bili dokaj dobri (med 65 % in 87 %), pri sintezi spojine **9** pa je bil izkoristek nekoliko slabši (33 %) in sklepamo, da je za to kriv elektronski učinek nitro skupine, ki je elektronakceptorska skupina.

5.1.4. Suzukijeva reakcija

Suzukijeva reakcija se uporablja za tvorbo enojne vezi C-C, in sicer gre za reakcijo med boronsko kislino in halogenidom, ki je katalizirana s paladijevim kompleksom (45). Pri našem delu smo jo uporabili pri sintezi substituiranega bifenila (spojina **12**), kjer smo vez C-C tvorili med etil-5-bromoindol-2-karboksilatом in benzenboronsko kislino (1,14 eq). Kot katalizator smo uporabili Pd(PPh₃)₄, kot bazo KF, kot topilo pa dioksan (slika 19).



Slika 19: Suzukijeva reakcija pri sintezi spojine **12**

Pri ¹H NMR analizi spojine **13**, ki smo jo dobili po hidrolizi spojine **12**, smo iz razmerij dveh vrhov pri 11,82 ppm (s, 1H, indol-Ph-NH) in 11,97 ppm (s, 1H, indol-Br-NH) lahko ugotovili, da spojina ni bila čista, ampak smo dobili zmes 5-fenilindol-2-karboksilne kisline (približno 70 %) in 5-bromoindol-2-karboksilne kisline (približno 30 %), kar kaže na to, da Suzukijeva reakcija pri pogojih, pod katerimi smo jo izvedli, ni potekla do konca. Posledično je bila tudi čistota končne spojine **14** (tvorili smo amidno vez med spojino **13** in tripeptidom) le približno 70 %, kar je bilo prav tako razvidno iz ¹H NMR spektra – vrhova pri 10,35 ppm (s, 1H, indol-Ph-NH) in 10,45 ppm (s, 1H, indol-Br-NH). Da bi dobili bolj čisto spojino, bi Suzukijevo reakcijo lahko izvedli pri višji temperaturi, lahko bi podaljšali čas reakcije, lahko pa bi tudi zamenjali topilo (npr. za etil acetat ali toluen) ali bazo (npr. za K₂CO₃) ali pa bi izvedli kakšno drugo reakcijo za tvorbo vezi C-C med etil-5-bromoindol-2-karboksilatом in ustreznim reagentom. Ena izmed možnosti bi bila Stille-ova reakcija, kjer gre za reakcijo med organokositrovo spojino in ustreznim elektrofilom, ki je katalizirana s paladijem. Tudi tu bi izhajali iz etil-5-bromoindol karboksilata, namesto benzenboronske kisline, ki smo jo uporabili pri Suzukijevi reakciji, pa bi tu uporabili

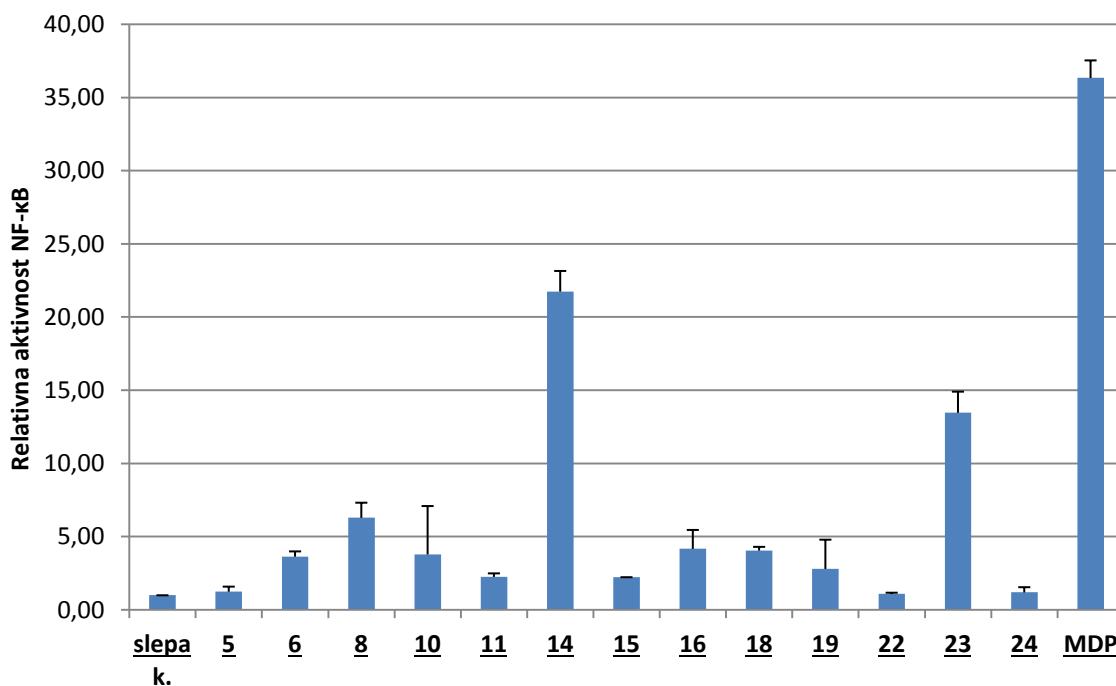
1,1 eq fenil tributilkositra (Bu_3SnPh), kot katalizator pa $\text{PdCl}_2/\text{PtBu}_3$ ter CuI in CsF ter topilo dimetilformamid, saj so se ti reagenti izkazali za učinkovite pri sintezi substituiranih bifenilov, kjer izhajamo iz aril bromidov. V literaturi navajajo, da reakcija poteka 15 ur pri $45\text{ }^\circ\text{C}$ (46). Lahko bi poskusili tudi s Hiyamovo reakcijo, ki je prav tako sorodna Suzukijeve reakciji. Kot reagenta bi uporabili etil-5-bromoindol karboksilat in 1,5 eq $(\text{EtO})_3\text{Si-Ph}$ ter katalizator paladij na ogljiku. Reakcija poteka v vodi in toluenu (1:20) pri $120\text{ }^\circ\text{C}$, 6 do 24 ur, reakcijski zmesi pa se doda še ligand tris (4-fluorofenil)fosfin in tetrabutilamonijev klorid (47).

5.2. BIOLOŠKO TESTIRANJE DEZMURAMILDIPEPTIDOV

Sintetizirali smo 13 novih dezmuramildipeptidov, katerih agonistična aktivnost na receptorje NOD2 je bila ovrednotena s pomočjo celične linije HEK-Blue™ NOD2 in reagenta QUANTI-Blue™. Celice HEK-Blue™ NOD2 sočasno izražajo človeški gen NOD2 in poročevalski gen za encim SEAP, ki je inducibilen z NF- κ B. Zagotavljajo hitro, občutljivo in zanesljivo metodo za detekcijo in potrditev agonistov receptorjev NOD2 s spremljanjem aktivacije NF- κ B. Prepoznavna agonista s strani receptorja NOD2 sproži signalno kaskado, ki vodi v aktivacijo NF- κ B in produkcijo encima SEAP, ki se po inkubaciji nahaja v supernatantu celic, v katerem lahko njegovo količino izmerimo spektrofotometrično (valovna dolžina 620-655 nm) z reagentom QUANTI-Blue™. Reagentu se v prisotnosti alkalne fosfataze barva spremeni iz rožnate v vijolično-modro, intenzivnost modrega odtenka pa odraža aktivnost alkalne fosfataze (48, 49). V nadaljevanju so navedene aktivnosti NF- κ B v celicah HEK-Blue™ NOD2 po dodatku novo sintetiziranih agonistov receptorjev NOD2, glede na celice brez dodanih končnih spojin (relativne aktivnosti NF- κ B). Kot pozitivno kontrolo smo uporabili MDP (grafikon I in priloga I).

Izkazalo se je, da je najboljši agonist receptorjev NOD2 spojina **14**, ki vsebuje fenilindolni fragment in glede na to, da je bila njena čistota le približno 70 % (zmes je vsebovala še 30 % spojine **8** – za razliko od spojine **14** je na mestu 5 indola namesto fenilne skupine vezana bromo skupina), lahko sklepamo, da bi bil odziv morda še večji, če bi bila spojina bolj čista. Dokaj dobro agonistično aktivnost je imela tudi spojina **23**, pri kateri smo na tripeptid kot mimetik sladkornega dela vezali *trans*-cimetno kislino, ki prav tako vsebuje

fenilni obroč, medtem ko so ostale spojine glede na MDP izkazovale šibko agonistično aktivnost. Nobena izmed spojin pa ni imela takšne jakosti delovanja kot MDP.



Grafikon I: Relativne aktivnosti NF-κB v celicah HEK-Blue™ NOD2 po dodatku novo sintetiziranih agonistov receptorjev NOD2, glede na celice brez dodanih končnih spojin

Pri končnih spojinah **6**, **8**, **10** in **14**, ki se razlikujejo le v skupini, ki je vezana na 5. mesto indolnega obroča, vidimo, da ima spojina z bolj lipofilno fenilno skupino (spojina **14**) dosti boljše jakost delovanja od spojin z manj lipofilnimi bromo (spojina **8**), fluoro (spojina **6**) in nitro (spojina **10**) skupinami. Izmed slednjih treh je spojina z bromom najbolj lipofilna, spojina z nitro skupino pa najmanj, kar se odraža tudi na njihovi jakosti delovanja. Tudi pri spojinah **11** imamo na mestu 5 indola vezan dokaj lipofilen dodekanamidni substituent, a je ta spojina le šibek agonist receptorjev NOD2. Verjetno je za to odgovorna pretirana velikost te skupine, saj so že prej pri dezmuramildipeptidih s 7-oksoacilnim fragmentom pokazali, da se s povečanjem števila metilenskih spojin na več kot pet, biološka aktivnost kljub zvečanju lipofilnosti zmanjša (36).

Spojina **23** ima prav tako dokaj dobro jakost delovanja in verjetno je tudi za to odgovoren lipofilen cinamoilni fragment in njegova oddaljenost od peptidnega dela.

Spojini, pri katerima smo na mesto 1 indola (na indolni dušik) vezali metil (spojina **15**) in 4-fluorobenzil (spojina **16**), sta se izkazali za dokaj šibka agonista. Približno enako jakost delovanja sta imeli tudi spojini **18** in **19**, kjer imamo preko mesta 2 indolina na tripeptid

vezan 1-(*terc*-butoksikarbonil)indolin (spojina **18**) ali indolin (spojina **19**). Tudi pri teh spojinah opazimo korelacijo med lipofilnostjo in jakostjo delovanja, kot kaže, pa mesto 1 indola oziroma indolina ni ugodno mesto za vezavo skupin – verjetno gre za slabše prepoznavanje s strani receptorja NOD2 in vezavo nanj.

Spojina **5**, kjer je indolni obroč preko mesta 3 vezan na tripeptidni del, se je izkazala kot zelo šibak agonist, prav tako sta bila zelo šibka agonista spojini **22** (na tripeptid smo vezali 2-okso-2-(fenilamino)ocetno kislino) in **24** (na tripeptid smo vezali pirol-2-karboksilno kislino).

Iz izmerjenih jakosti delovanj naših končnih spojin lahko ugotavljamo odnos med njihovo strukturo in delovanjem in vidimo, da je relativna aktivnost NF- κ B, ki so jo povzročili agonisti receptorjev NOD2, v korelaciji z lipofilnostjo spojin, zaradi katere je olajšan pasivni vstop spojin v celico skozi hidrofobno plazemsko membrano. Ugotavljamo lahko tudi, kakšne morajo biti strukturne značilnosti dela dezmuramidipeptida, ki posnema *N*-acetilmuramilni del, saj smo le-tega pri spojinah spreminjali, peptidni del pa je bil pri vseh spojinah enak. Pri spojinah, kjer je bil kot zamenjava *N*-acetilmuramilnega dela uporabljen indol-2-ilkarboksamidni fragment vidimo, da je jakost delovanja močno povečala fenilna skupina, ki je bila vezana na mestu 5 indola. Verjetno je pomembna njena oddaljenost od peptidnega dela, saj se je mesto 5 indolnega obroča izkazalo za primerno, medtem ko mesto 1 ni bilo ugodno mesto, saj je imela spojina **16**, kjer je bil fluorobenzilni fragment vezan na mesto 1 indola (indolni dušik) veliko slabšo jakost delovanja, prav tako pa so imele slabo jakost delovanja tudi vse druge spojine, kjer smo na indolni dušik vezali razne skupine. Mesto 5 indola je torej najprimernejše za vezavo lipofilnih skupin, ki pa morajo biti ustrezno velike (ustrezna je bila fenilna skupina, neustrezne pa so bile bromo, nitro, fluoro in dodekanamidna skupina). Zelo šibko jakost delovanja glede na muramil dipeptid so imele spojine, kjer smo kot mimetike *N*-acetilmuramilnega dela uporabili pirol-2-il-karboksamidni, indol-3-ilkarboksamidni ali pa 2-okso-2-(fenilamino)etan-1-ilkarboksamidni fragment, boljšo jakost delovanja pa je imela spojina s cinamoilnim fragmentom. Iz naših ugotovitev lahko sklepamo, da aktivno mesto receptorja NOD2 najverjetneje vsebuje nek hidrofobni žep in da so za vstop raznih skupin v žep in interakcijo z njim pomembne njihove lastnosti in velikost.

6. SKLEPI

- V okviru diplomskega dela smo načrtovali in sintetizirali dezmuramildipeptide (analogi muramil dipeptida brez sladkornega dela), ki delujejo kot agonisti receptorjev NOD2. Sintetizirali smo 13 končnih spojin in ovrednotili njihovo agonistično aktivnost na receptorje NOD2. Izhajali smo iz spojine vodnice, ki je kot zamenjavo za sladkorni (*N*-acetilmuramilni) del vsebovala indol-2-ilkarboksamidni fragment in le-tega poskušali optimizirati, pri tem pa smo peptidni del spojine vodnice ohranili nespremenjen.
- Pri petih spojinah smo spojino vodnico optimizirali tako, da so končne spojine na mestu 5 indola vsebovale dodatne skupine in dodatna fenilna skupina na tem mestu, ki je privedla do spojine **14** ((2*R*)-dietil 2-((2*S*)-2-(2-(5-fenilindol-2-karboksamido)acetamido)propanamido) pentandioat), se je izkazala kot optimalna za agonistično aktivnost na receptorju NOD2.
- Dobro agonistično aktivnost je izkazovala tudi spojina **23** ((2*R*)-dietil 2-((2*S*)-2-(2-cinamamidoacetamido)propanamido)pentandioat), kjer smo na peptid vezali *trans*-cimetno kislino.
- 5-fenilindol-2-karboksamidni in cinamoilni fragment sta se izkazala kot najboljša mimetika sladkornega dela.
- Spojini **14** in **23** sta zanimiva kandidata za nadaljnja testiranja za določitev njune uporabnosti kot adjuvansa ter tudi za nadaljnjo optimizacijo in sintezo potencialno še boljših agonistov receptorja NOD2.

7. LITERATURA

1. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J: Immunology, 5th edition, W.H. Freeman and Company, New York, 2003: 1-23.
2. Košnik M, Mrevlje F in sodelavci: Interna medicina, 4. izdaja, Littera Picta, Ljubljana, 2011: 1167-1187.
3. Wikipedija: Peptidoglikan. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Peptidoglikan> (maj 2014).
4. Schleifer KH, Kandler O: Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriology Reviews* 1972; 36 (4): 407-477.
5. Sukhithasri V, Nisha N, Biswas L, Anil Kumar V, Biswas R: Innate immune recognition of microbial cell wall components and microbial strategies to evade such recognitions. *Microbiological Research* 2013; 168 (7): 396-406.
6. Traub S, von Aulock S, Hartung T, Hermann C: MDP and other muropeptides – direct and synergistic effects on the immune system. *Journal Of Endotoxin Research* 2006; 12 (2): 69-85.
7. Ellouz F, Adam A, Ciorbaru R, Lederer E: Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem Biophys Res Commun* 1974; 59: 1317-1325.
8. Pabst MJ, Beranova-Giorgianni S, Krueger JM: Effects of muramyl peptides on macrophages, monokines, and sleep. *Neuroimmunomodulation* 1999; 6 (4): 261-283.
9. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ: Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *The Journal Of Biological Chemistry* 2003; 278 (11): 8869-8872.
10. Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nuñez G: Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *The Journal Of Biological Chemistry* 2003; 278 (8): 5509-5512.
11. van der Meer JH, Netea MG, Dinarello CA: Modulation of muramyl dipeptide stimulation of cytokine production by blood components. *Clinical And Experimental Immunology* 2009; 156 (3): 428-433.
12. Yang S, Tamai R, Akashi S, Takeuchi O, Akira S, Sugawara S, Takada H: Synergistic effect of muramyl dipeptide with lipopolysaccharide or lipoteichoic acid to induce

- inflammatory cytokines in human monocytic cells in culture. *Infection And Immunity* 2001; 69 (4): 2045-2053.
13. Traub S, Kubasch N, Morath S, Kresse M, Hartung T, Schmidt RR, Hermann C: Structural requirements of synthetic mucopeptides to synergize with lipopolysaccharide in cytokine induction. *The Journal Of Biological Chemistry* 2004; 279 (10): 8694-8700.
 14. Netea MG, Ferwerda G, de Jong DJ, Jansen T, Jacobs L, Kramer M, Naber TH, Drenth JP, Girardin SE, Kullberg BJ, Adema GJ, van der Meer JW: Nucleotide-binding oligomerization domain-2 modulates specific TLR pathways for the induction of cytokine release. *Journal Of Immunology* 2005; 174 (10): 6518-6523.
 15. Wolfert MA, Murray TF, Boons GJ, Moore JN: The origin of the synergistic effect of muramyl dipeptide with endotoxin and peptidoglycan. *The Journal Of Biological Chemistry* 2002; 277 (42): 39179-39186.
 16. Coulombe F, Divangahi M, Veyrier F, de Léséleuc L, Gleason JL, Yang Y, Kelliher MA, Pandey AK, Sasseti CM, Reed MB, Behr MA: Increased NOD2-mediated recognition of N-glycolyl muramyl dipeptide. *The Journal Of Experimental Medicine* 2009; 206 (8): 1709-1716.
 17. Fakuta M, Vamadevan AS, Abreu MT: Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. *Seminars in Immunology* 2009; 21 (4): 242-253.
 18. Kersse K, Bertrand MJ, Lamkanfi M, Vandenabeele P: NOD-like receptors and the innate immune system: coping with danger, damage and death. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2011; 22 (5-6): 257-276.
 19. Geddes K, Magalhães JG, Girardin SE: Unleashing the therapeutic potential of NOD-like receptors. *Nature Reviews. Drug Discovery* 2009; 8 (6): 465-479.
 20. Benko S, Philpott DJ, Girardin SE: The microbial and danger signals that activate Nod-like receptors. *Cytokine* 2008; 43 (3): 368-373.
 21. Franchi L, Warner N, Viani K, Nuñez G: Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunological Reviews* 2009; 227 (1): 106-128.
 22. Mo J, Boyle JP, Howard CB, Monie TP, Davis BK, Duncan JA: Pathogen sensing by nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 (NOD2) is mediated

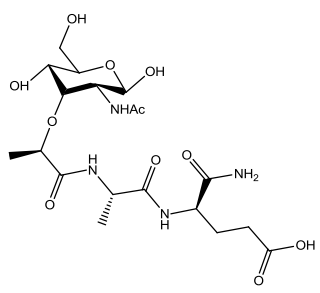
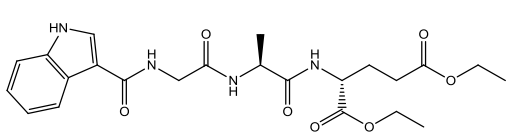
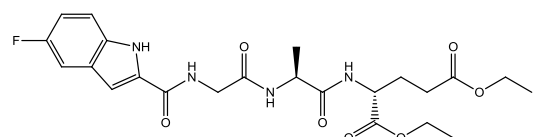
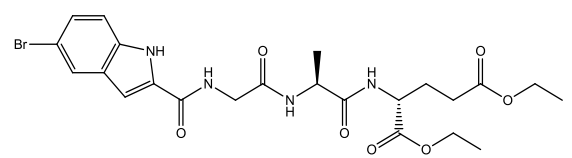
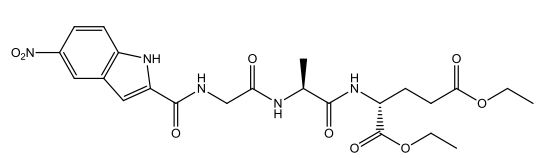
- by direct binding to muramyl dipeptide and ATP. *The Journal Of Biological Chemistry* 2012; 287 (27): 23057-23067.
23. Ismail MG, Vavricka SR, Kullak-Ublick GA, Fried M, Mengin-Lecreulx D, Girardin SE: hPepT1 selectively transports muramyl dipeptide but not Nod1-activating muramyl peptides. *Canadian Journal Of Physiology And Pharmacology* 2006; 84 (12): 1313-1319.
 24. Grimes CL, Ariyananda Lde Z, Melnyk JE, O'Shea EK: The innate immune protein Nod2 binds directly to MDP, a bacterial cell wall fragment. *Journal Of The American Chemical Society* 2012; 134 (33): 13535-13537.
 25. Gutierrez O, Pipaon C, Inohara N, Fontalba A, Ogura Y, Prosper F, Nunez G, Fernandez-Luna JL: Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *The Journal Of Biological Chemistry* 2002; 277 (44): 41701-41705.
 26. Dzierzbicka K, Wardowska A, Trzonkowski P: Recent developments in the synthesis and biological activity of muramylpeptides. *Current Medicinal Chemistry* 2011; 18 (16): 2438-2451.
 27. Shaw MH, Kamada N, Warner N, Kim YG, Nuñez G: The ever-expanding function of NOD2: autophagy, viral recognition, and T cell activation. *Trends In Immunology* 2011; 32 (2): 73-79.
 28. Murray PJ: Beyond peptidoglycan for Nod2. *Nature Immunology* 2009; 10 (10): 1053-1054.
 29. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nuñez G, Flavell RA: Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005; 307 (5710): 731-734.
 30. Merhi G, Coleman AW, Devissaguet JP, Barratt GM: Synthesis and immunostimulating properties of lipophilic ester and ether muramyl peptide derivatives. *Journal Of Medicinal Chemistry* 1996; 39 (22): 4483-4488.
 31. Bahr GM: Immune and Antiviral Effects of the Synthetic Immunomodulator Murabutide. *Vaccine Adjuvants Infectious Disease* 2006; 193-219.
 32. Jakopin Ž, Gobec M, Mlinarič-Raščan I, Sollner Dolenc M: Immunomodulatory properties of novel nucleotide oligomerization domain 2 (Nod2) agonistic desmuramyldipeptides. *Journal Of Medicinal Chemistry* 2012; 55 (14): 6478-6488.

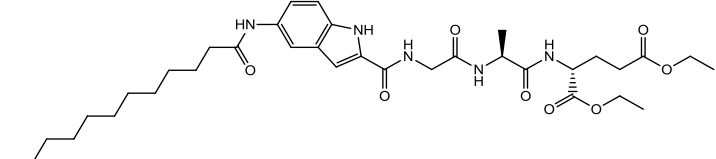
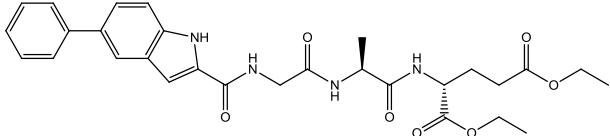
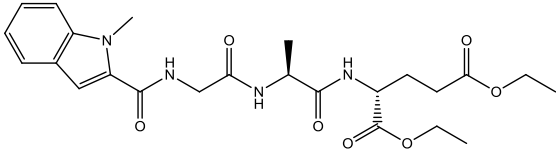
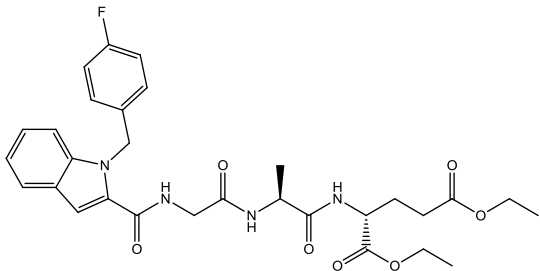
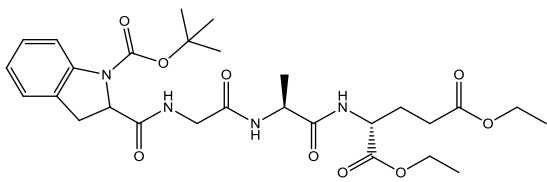
33. Gobec S, Sollner-Dolenc M, Urleb U, Wraber B, Simcic S, Filipic M: Modulation of cytokine production by some phthalimido-desmuramyl dipeptides and their cytotoxicity. *Farmaco* 2004; 59 (5): 345-352.
34. Cottagnoud P, Gerber CM, Majcherczyk PA, Acosta F, Cottagnoud M, Neftel K, Moreillon P, Täuber MG: The stereochemistry of the amino acid side chain influences the inflammatory potential of muramyl dipeptide in experimental meningitis. *Infection And Immunity* 2003; 71 (6): 3663-3666.
35. Zhao N, Ma Y, Zhang S, Fang X, Liang Z, Liu G: New muramyl dipeptide (MDP) mimics without the carbohydrate moiety as potential adjuvant candidates for a therapeutic hepatitis B vaccine (HBV). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2011; 21 (14): 4292-4295.
36. Sollner M, Pečar S, Štalc A: The influence of the lipophilicity of 7-oxoacyl-l-alanyl-d-isoglutamines on their immunorestitution activity in vivo. *European Journal of Medicinal Chemistry* 1996, 31 (11): 927-933.
37. Smrdel P, Grabnar I, Locatelli I, Cerne M, Andresek S, Kovacic N, Kristl A, Bogataj M, Urleb U, Mrhar A: Physicochemical and preclinical pharmacokinetic and toxicological evaluation of LK-423--a new phthalimido-desmuramyl-dipeptide derivative with immunomodulating activity. *Drug Development And Industrial Pharmacy* 2009; 35 (11): 1293-1304.
38. Jakopin Z, Corsini E, Gobec M, Mlinarič-Raščan I, Sollner Dolenc M: Design, synthesis and biological evaluation of novel desmuramyldipeptide analogs. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2011; 46: 3762-3777.
39. Montalbetti CAGN, Falque V: Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* 2005; 61 (46): 10827-10852.
40. Al-Warhi TI, Al-Hazimi HMA, El-Faham A: Recent development in peptide coupling reagents. *Journal of Saudi Chemical Society* 2012; 16 (2): 97-116.
41. 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 phenylhydrazation of carboxylic acids at room temperature. *Journal of the Iranian Chemical Society* 2007; 4 (3): 364-369.
42. Burwell RL Jr.: The cleavage of ethers. *Chemical Reviews* 1954; 54 (4): 615-685.

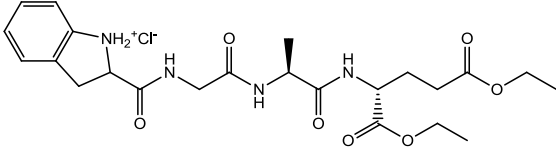
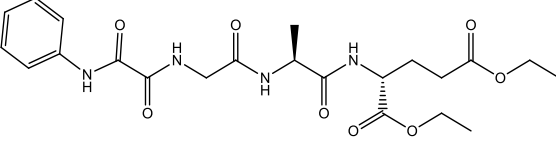
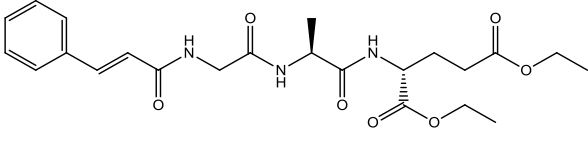
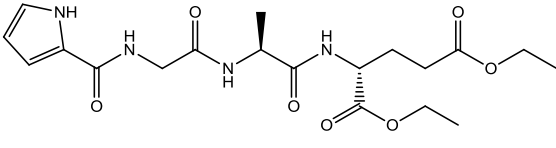
43. Fried S , Kleene RD: Tetrahydrofuran Compounds. I. Cleavage by Hydrogen Halides. Journal of the American chemical society 1941; 63 (10): 2691-2691.
44. Theodorou V, Skobridis K, Tzakos AG, Ragoussis V: A simple method for the alkaline hydrolysis of esters. Tetrahedron Letters 2007; 48 (46): 8230-8233.
45. Organic Chemistry Portal: Suzuki Coupling. <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/suzuki-coupling.shtm> (junij 2014).
46. Mee SPH, Lee V, Baldwin JE: Stille Coupling Made Easier - The Synergic Effect of Copper(I) Salts and the Fluoride Ion. Angewandte Chemie International Edition 2004; 43: 1132-1136.
47. Monguchi Y, Yanase T, Mori S, Sajiki H: A Practical Protocol for the Hiyama Cross-Coupling Reaction Catalyzed by Palladium on Carbon. Synthesis 2013; 45(1): 40-44.
48. InvivoGen: HEK-Blue™ NOD2. <http://www.invivogen.com/hek-blue-nod2> (julij 2014).
49. InvivoGen: QUANTI-Blue™. <http://www.invivogen.com/quant-blue> (julij 2014).

PRILOGA

Priloga I: Rezultati biološkega testiranja novo sintetiziranih agonistov receptorjev NOD2

Spojina	Relativna aktivnost NF-κB		
	Test A	Test B	Povprečna vrednost ± SD
 MDP	35,49	37,19	36,34 ± 1,20
 5	1,49	1,00	1,24 ± 0,35
 6	3,89	3,38	3,64 ± 0,36
 8	5,55	7,02	6,29 ± 1,04
 10	1,45	6,13	3,79 ± 3,31

 <p style="text-align: center;"><u>11</u></p>	2,09	2,43	2,26 ± 0,24
 <p style="text-align: center;"><u>14</u></p>	20,74	22,74	21,74 ± 1,41
 <p style="text-align: center;"><u>15</u></p>	2,23	2,23	2,23 ± 0,00
 <p style="text-align: center;"><u>16</u></p>	5,09	3,26	4,17 ± 1,29
 <p style="text-align: center;"><u>18</u></p>	3,87	4,23	4,05 ± 0,26

 <u>19</u>	4,21	1,38	2,80 ± 2,00
 <u>22</u>	1,15	1,02	1,09 ± 0,09
 <u>23</u>	12,45	14,49	13,47 ± 1,44
 <u>24</u>	0,94	1,45	1,19 ± 0,36