

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

UROŠ MALAVAŠIČ

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA RIGIDNIH
DERIVATOV DIPEPTIDA D-GLU-MEZO-DAP**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

UROŠ MALAVAŠIČ

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA RIGIDNIH
DERIVATOV DIPEPTIDA D-GLU-MEZO-DAP**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF RIGID DIPEPTIDE D-GLU-
MESO-DAP DERIVATIVES**

Ljubljana, 2014

Diplomsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Žige Jakopina, mag. farm. Spektroskopske meritve in ostale analize spojin so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo in na Inštitutu Jožefa Stefana. Biološko vrednotenje spojin sta opravili asist. dr. Martina Gobec, mag. farm. in asist. dr. Martina Hrast, mag. farm. na Fakulteti za farmacijo.

Zahvala

Lepo se zahvaljujem mentorju doc. dr. Žigi Jakopinu, mag farm. za strokovno vodenje, nesebično pomoč in nasvete pri nastajanju magistrske naloge. Rad bi se zahvalil tudi asist. dr. Martini Gobec, mag. farm. in asist. dr. Martini Hrast, mag. farm., ki sta opravili biološko vrednotenje spojin ter ostalim sodelavcem na Katedri za farmacevtsko kemijo za pomoč pri eksperimentalnem delu. Na koncu bi se rad zahvalil tudi svoji družini, ki me je spodbujala tekom študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom doc. dr. Žige Jakopina, mag. farm.

Uroš Malavašič



Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Franc Vrečer, mag. farm.

Članica diplomske komisije: asist. dr. Jasna Omersel, mag. farm.

VSEBINA

I. POVZETEK	iv
II. ABSTRACT	v
III. SEZNAM OKRAJŠAV	vi
1. UVOD	1
1.1. IMUNSKI SISTEM	1
1.1.2. PRIROJENI IMUNSKI SISTEM	1
1.1.3. PRIDOBLENI IMUNSKI SISTEM	2
1.2. RECEPTORJI ZA PREPOZNAVNO MOLEKULSKIH VZORCEV (PRR)	3
1.2.1. TOLL-U PODOBNI RECEPTORJI (TLR)	3
1.2.2. NOD-U PODOBNI RECEPTORJI (NLR)	5
1.2.3. NOD1	5
1.2.4. ODNOS MED STRUKTURO IN DELOVANJEM AGONISTOV NOD1	7
1.2.5. UDELEŽENOST NOD1 PRI BOLEZNIH	9
1.3. PEPTIDOGLIKAN	10
1.3.1. KEMIJSKA STRUKTURA PEPTIDOGLIKANA	10
1.3.2. SINTEZA PEPTIDOGLIKANA	11
1.3.2.1. ZNOTRAJCELIČNA SINTEZA PEPTIDOGLIKANA IN LIGAZE MUR	12
1.3.3. INHIBITORJI SINTEZE PEPTIDOGLIKANA	13
1.3.3.1. ENCIM MurE IN NJEGOVI ZAVIRALCI	13
2. NAMEN DELA	15
3. MATERIALI IN METODE	19
4. EKSPERIMENTALNI DEL	23
4.1. SINTEZA (+/-)-1-METOKSI-1-OKSOPENT-4-EN-2-AMINIJEVEGA KLORIDA (1)	23
4.2. SINTEZA METIL 2-(<i>TERC</i> -BUTOKSIKARBONILAMINO)PENT-4-ENOATA (2)	24
4.3. SINTEZA (<i>Z</i>)-ETIL 2-KLORO-2-(HIDROKSIIMINO)ACETATA (3)	25
4.4. SINTEZA ETIL (<i>R</i>)-5-((<i>S</i>)-2-(<i>TERC</i> -BUTOKSIKARBONILAMINO)-3-METOKSI-3-OKSOPROPIL)-4,5-DIHIDROIZOKSAZOL-3-KARBOKSILATA (4a) IN ETIL (<i>R</i>)-5-((<i>R</i>)-2-(<i>TERC</i> -BUTOKSIKARBONILAMINO)-3-METOKSI-3-OKSOPROPIL)-4,5-DIHIDROIZOKSAZOL-3-KARBOKSILATA (4b)	26
4.5. SINTEZA (4 <i>R</i>)-4-AMINO-5- <i>TERC</i> -BUTOKSI-5-OKSOPENTANOJSKE KISLINE (5)	27
4.6. SINTEZA (4 <i>R</i>)-5- <i>TERC</i> -BUTOKSI-4-(DIDODECILAMINO)-5-OKSOPENTANOJSKE KISLINE (6) ..	28
4.7. SINTEZA (4 <i>R</i>)-5- <i>TERC</i> -BUTOKSI-DODEKANAMIDO-5-OKSOPENTANOJSKE KISLINE (7)	29
4.8. SINTEZA ETIL (<i>R</i>)-5-((<i>S</i>)-2-((<i>R</i>)-5- <i>TERC</i> -BUTOKSI-4-DODEKANAMIDO-5-OKSOPENTANAMIDO)-3-METOKSI-3-OKSOPROPIL)-4,5-DIHIDROIZOKSAZOL-3-KARBOKSILATA (8)	30
4.9. SINTEZA ETIL (<i>R</i>)-5-((<i>R</i>)-2-((<i>R</i>)-5- <i>TERC</i> -BUTOKSI-4-DODEKANAMIDO-5-OKSOPENTANAMIDO)-3-METOKSI-3-OKSOPROPIL)-4,5-DIHIDROIZOKSAZOL-3-KARBOKSILATA (9)	32
4.10. SINTEZA ETIL (<i>R</i>)-5-((<i>S</i>)-2-((<i>R</i>)-5- <i>TERC</i> -BUTOKSI-4-(DIDODECILAMINO)-5-OKSOPENTANAMIDO)-3-METOKSI-3-OKSOPROPIL)-4,5-DIHIDROIZOKSAZOL-3-KARBOKSILATA (10)	34

4.11. SINTEZA ETIL (R)-5-((R)-2-((R)-5- <i>TERC</i> -BUTOKSI-4-(DIDODECILAMINO)-5-OKSOPENTANAMIDO)-3-METOKSI-3-OKSOPROPIL)-4,5-DIHIDROIZOKSAZOL-3-KARBOKSILATA (11).....	36
4.12. SINTEZA 1-ETOKSI-3-(2-(ETOKSIKARBONIL)PIRIDIN-4-IL)-1-OKSOPROPAN-2-AMINJEVEGA KLOORIDA (12).....	37
4.13. SINTEZA ETIL 4-(2-((R)-5- <i>TERC</i> -BUTOKSI-4-(DIDODECILAMINO)-5-OKSOPENTANAMIDO)-3-ETOKSI-3-OKSOPROPIL)PIKOLINATA (13).....	38
4.14. SINTEZA ETIL 4-(2-((R)-5- <i>TERC</i> -BUTOKSI-4-DODEKANAMIDO-5-OKSOPENTANAMIDO)-3-ETOKSI-3-OKSOPROPIL)PIKOLINATA (14).....	39
4.15. SINTEZA (R)-5-((S)-2-KARBOKSI-2-((R)-4-KARBOKSI-4-DODEKANAMIDOBUTANAMIDO)ETIL)-4,5-DIHIDROIZOKSAZOL-3-KARBIKSILNE KISLINE (15).....	41
4.16. SINTEZA (R)-5-((R)-2-KARBOKSI-2-((R)-4-KARBOKSI-4-DODEKANAMIDOBUTANAMIDO)ETIL)-4,5-DIHIDROIZOKSAZOL-3-KARBOKSILNE KISLINE (16).....	42
4.17. SINTEZA <i>N</i> -((R)-1-KARBOKSI-4-((S)-1-KARBOKSI-2-((R)-3-KARBOKSI-4,5-DIHIDROIZOKSAZOL-5-IL)ETILAMINO)-4-OKSOBUTIL)- <i>N</i> -DODECILDODEKAN-1-AMINJEVEGA 2,2,2-TRIFLUOROACETATA (17).....	44
4.18. SINTEZA <i>N</i> -((R)-1-KARBOKSI-4-((R)-1-KARBOKSI-2-((R)-3-KARBOKSI-4,5-DIHIDROIZOKSAZOL-5-IL)ETILAMINO)-4-OKSOBUTIL)- <i>N</i> -DODECILDODEKAN-1-AMINJEVEGA 2,2,2-TRIFLUOROACETATA (18).....	45
4.19. SINTEZA <i>N</i> -((1R)-KARBOKSI-4-((1-KARBOKSI-2-(2-KARBOKSIPIRIDIN-4-IL)ETIL)AMINO)-4-OKSOBUTIL)- <i>N</i> -DODECILDODEKAN-1-AMINJEVEGA 2,2,2-TRIFLUOROACETATA (19).....	47
4.20. SINTEZA 4-(2-KARBOKSI-2-((R)-4-KARBOKSI-4-DODEKANAMIDOBUTANAMIDO)ETIL)PIKOLINSKE KISLINE (20).....	48
5. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	50
5.1. <i>O</i> -ACILIRANJE (TVORBA METILNEGA ESTRA).....	50
5.2. ZAŠČITA AMINSKE SKUPINE V OBLIKI <i>TERC</i> -BUTIL KARBAMATA.....	51
5.3. SINTEZA KARBETOKSIFORMONITRIL OKSIDA (»CEFNO-a«) (3').....	52
5.4. SINTEZA IZOKSAZOLINSKEGA OBROČA.....	52
5.5. ODSTRANITEV Fmoc ZAŠČITNE SKUPINE (sinteza spojine 5).....	53
5.6. REDUKTIVNO AMINIRANJE (sinteza spojine 6).....	54
5.7. <i>N</i> -ACILIRANJE (sinteza spojine 7).....	55
5.8. TVORBA AMIDNE VEZI (SKLOPITEV) S TBTU (SINTEZA SPOJIN 8, 9, 10, 11).....	56
5.9. ODSTRANITEVALKILNIH ESTROV(SINTEZA SPOJIN 15, 16, 17, 18).....	58
5.10. SINTEZA PIRIDINSKIH RIGIDIZIRANIH DERIVATOV D-GLU-MEZO-DAP (sinteza spojin 19, 20).....	58
5.11. TESTIRANJE SPOJIN NA NOD1 AGONISTIČNO DELOVANJE.....	59
5.12. REZULTATI TESTIRANJ INHIBITORNE AKTIVNOSTI SPOJIN NA LIGAZAH MurE IN MurF TER KOMENTAR.....	60
6. SKLEPI.....	63
7. LITERATURA.....	65

I. POVZETEK

Vsi živi organizmi so dovzetni za okužbe, ki jih povzročajo različni patogeni, kot so bakterije, virusi, protozoe, glive in helminti. Telo večceličnih organizmov je zato tekom evolucije razvilo različne obrambne mehanizme, katerih prvo oviro predstavljajo fizične in kemične pregrade (koža, sluznice in njihove protimikrobne sestavine). Če patogenom kljub pregradam uspe vdreti v organizem, se aktivira sistem celic, tkiv in organov, ki skrbijo za odstranjevanje in uničenje mikrobov (prirojena in pridobljena imunost).

Dipeptid D-Glu-mezo-DAP (D-glutamil-mezo-diaminopimelinska kislina) zasledimo v peptidoglikanskem plašču pri večini Gram-negativnih in nekaterih Gram-pozitivnih bakterijah. Je sestavni del kratkega peptidnega segmenta, ki prečno premreži linearne glikanske enote in zagotavlja integriteto celični steni. Po degradaciji takšnih bakterij v našem telesu se fragmenti, ki vsebujejo aminokislino mezo-DAP, vežejo na znotrajcelične receptorje NOD1 (nahajajo se v epiteljskih in antigen-predstavitvenih celicah (APC)) ter sprožijo predvsem prirojeni imunski odgovor s spremljajočim vnetnim odzivom. Znani fragment, ki aktivira receptorje NOD1 je prav dipeptid D-Glu-mezo-DAP. V okviru magistrske naloge smo prepoznali receptorje NOD1 kot perspektivne tarče za razvoj novih imunomodulatornih učinkovin. Ker 3D kristalna struktura NOD1 receptorja še ni znana, smo načrtovali nove učinkovine na podlagi strukture in lastnosti že poznanih aktivnih ligandov. Da bi še bolje razumeli odnos med strukturo in delovanjem na receptorju NOD1, smo načrtovali in sintetizirali šest derivatov dipeptida D-Glu-mezo-DAP. Z namenom izboljšanja afinitete dipeptida D-Glu-mezo-DAP do receptorja NOD1, smo na aaminski skupini D-glutaminske kisline pripeli C₁₂ dialkilne in acilne alifatske verige. Zaradi razmeroma dolge in fleksibilne stranske verige fragmenta mezo-DAP, smo ta fragment rigidizirali s ciklizacijo v izoksazolinski ali piridinski obroč. Končne spojine smo nato dali biološko ovrednotiti na celični liniji Ramos-BlueTM, a nobena spojina ni izkazovala agonističnega delovanja.

Spojine, ki vsebujejo fragment mezo-DAP lahko potencialno izkazujejo tudi zaviralno delovanje na bakterijskih ligazah UDP-*N*-acetilmuramoil-L-alanil-D-glutamat: 2,6-diaminopimelat ligazi (MurE) in/ali UDP-*N*-acetilmuramoil-L-alanil-D-glutamil-2,6-diaminopimelat: D-alanil-D-alanil ligazi (MurF). Ligaze Mur imajo ključno vlogo pri znotrajcelični biosintezi peptidoglikana in tako predstavljajo zanimivo tarčo za sintezo novih protimikrobnih učinkovin. V tem primeru smo bili bolj uspešni, saj smo dobili dva inhibitorja ligaze MurE, ki lahko predstavljata dobro izhodišče za nadaljnje študije.

Ključne besede: imunski sistem, NOD1, D-Glu-mezo-DAP, ligaze Mur

II. ABSTRACT

All living organisms are susceptible to infection caused by bacteria, viruses, protozoa, fungi and helminths. During the evolution, multicellular organisms have evolved different defence mechanisms against these pathogens. The first hurdle for a pathogen involves breaching the physical and chemical barriers that protect the host, such as skin, mucosal epithelial layers and its antimicrobial substances. When those barriers are breached, the innate and adaptive immunity is activated.

The dipeptide D-Glu-meso-DAP (D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid) is found in peptidoglycan layer of Gram-negative bacteria and certain Gram-positive bacteria. It is a part of a short peptide segment, which cross-links linear glycan chains and provides an integrity of cellular wall. After the degradation of such bacteria in our body, the segments of cell wall that contain meso-DAP amino acid bind to cytosolic NOD1 receptors (expressed by epithelial and antigen-presenting cells) and primarily induce the activation of innate immune system followed by inflammatory response. D-Glu-meso-DAP fragment is known as crucial pharmacophore to activate NOD1 receptors. Within Master's thesis we recognized these receptors as a promising target for novel immunomodulatory compounds. Since the three-dimensional crystal structure of binding site of NOD1 receptor has not yet been obtained, we designed novel immunomodulatory compounds based on the structure of known active ligands. To gather more information about structure/activity relationship, we designed and synthesized six D-Glu-meso-DAP analogs. In order to increase the affinity of the dipeptide D-Glu-meso-DAP towards NOD1 receptor, we introduced C₁₂ alkyl and acyl aliphatic chains on the D-Glu residue. Because of the relatively long and flexible side-chain of the meso-DAP fragment, we made this fragment more rigid by cyclization of the side-chain into isoxazoline and pyridine moiety. All synthesized compounds were biologically tested on the Ramos-BlueTM cell line, however none of them showed any significant agonistic activity. Furthermore, compounds that contain meso-DAP fragment may also possess the inhibitory activity against bacterial UDP-*N*-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate: meso-diaminopimelate ligase (MurE) and UDP-*N*-acetylmuramoyl-tripeptide: D-alanyl-D-alanine ligase (MurF). Mur ligases play an important role in the intracellular biosynthesis of peptidoglycan and therefore represent an interesting target for the synthesis of novel antimicrobial agents. In this case, we were more successful, since two synthesized compounds displayed moderate inhibitory activity against MurE and represent a good starting point for further studies.

Key words: immune system, NOD1, D-Glu-meso-DAP, Mur ligases

III. SEZNAM OKRAJŠAV

ADP	Adenozin difosfat
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome (sindrom pridobljene imunske pomanjkljivosti)
AK	Aminokislina
Ala	Alanin
ALR	AIM2-like receptor (AIM2-podobni receptor)
APC	Antigen predstavitvene celice
Ar	Aromat
ATP	Adenozin trifosfat
BIR	Baculovirus inhibitor repeat domain (bakulovirusna inhibitorna ponovitvena domena)
Boc	<i>Terc</i> -butiloksikarbonil
bs	Broad singlet (široki singlet)
C₁₂-iE-DAP	<i>N</i> -dodekanoil- γ -D-glutamil-mezo-diaminopimelinska kislina
CARD	Caspase activation and recruitment domain (domena za aktivacijo in rekrutiranje kaspaz)
CEFNO	Karbetoksiformonitril oksid
CLR	C-type lectin receptors (lektinski receptorji tipa C)
CRP	C- reactive protein (C-reaktivni protein)
d	Dublet
DAMP	Damage-associated molecular patterns (s poškodbami povezani molekulski vzorci)

DBF	Dibenzofulven
DBU	1,8-diazabiciklo[5.4.0]undek-7-en
D-Glu-mezo-DAP	D-glutamil-mezo-diaminopimelinska kislina
DKM	Diklorometan
DMSO-d₆	devteriran dimetilsulfoksid
ERK	Extracellular signal-regulated kinases (zunajcelične s signali regulirane kinaze)
ESI	Electron spray ionization (elektron-razpršilna ionizacija)
Fmoc	Fluorenilmetiloksikarbonil
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglukozamin
Glu	Glutaminska kislina
HE	Heksan
EA	Etilacetat
HPLC	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HR-MS	High resolution mass spectrometry (masna spektrometrija visoke ločljivosti)
IC₅₀	Koncentracija učinkovine, ki povzroči 50% inhibicijo encima
iE-DAP	D- γ -Glutamil-(2S, 6R)-mezo-diaminopimelinska kislina
Ig	Imunoglobulini
J	Sklopitvena konstanta
JNK	C-Jun <i>N</i> -terminal kinases (c-Jun <i>N</i> -terminalne kinaze)
LBP	Lipopolysaccharide-binding protein (lipopolisaharid-vezavni protein)

LRR	Leucine-rich repeats (z levcinom bogate ponovitve)
m	Multiplet
MAPK	Mitogen-activated protein kinase (z mitogeni aktivirana protein kinaza)
MBL	Mannose-binding lectin (manozo-vezavni lektin)
MDP	Muramil dipeptid (<i>N</i> -acetilmuramil-L-Ala-D-iGln)
mezo-DAP	Mezo-diaminopimelinska kislina (tudi mezo-A₂pm)
Mr	Molska masa
MS	Masna spektrometrija
MurE	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanil-D-glutamat: 2,6-diaminopimelat ligaza
MurF	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanil-D-glutamil-2,6-diaminopimelat: D-alanil-D-alanil ligaza
MurNAc	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina
MyD88	Myeloid differentiation primary response protein 88 (diferenciacijski mieloidni protein 88)
NF- κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (nuklearni faktor κB)
NLR	Nod-like receptor (Nod-u podobni receptor)
NMM	<i>N</i> -metilmorfolin
NMR	Jedrska magnetna resonanca
NOD1	Nucleotide-binding oligomerization domain 1 (nukleotid-vezavna oligomerizacijska domena 1)
p38	Protein 38

PAMP	Pathogen-associated molecular patterns (s patogeni povezani molekularni vzorci)
PEP	Fosfoenolpiruvat
PGN	Peptidoglikan
PRR	pattern recognition receptor (receptorji za prepoznavo molekulskih vzorcev)
PYD	Pyrin domain (pirinska domena)
q	Kvartet
RA	Rezidualna aktivnost
Rf	Retention factor (retencijski faktor)
RICK (Ripk2 ali RIP2)	Receptor-interacting serine-threonine kinase (z receptorjem interagirajoča protein kinaza)
RLR	RIG-I-like receptor (RIG-I-podobni receptor)
RSV	Respiratorni sincicijski virus
s	Singlet
SAR	Structure-activity relationship (odnos med strukturo in delovanjem)
SEAP	Secreted embryonic alkaline phosphatase (izločena zarodna alkalna fosfataza)
ssRNA	Enoverižna ribonukleinska kislina
t	Triplet
TBTU	O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronijev tetrafluoroborat
TCR	T-celični receptorji

TFA	Trifluoroocetna kislina
Th2	Celice pomagalke tipa 2
TIR	Toll/interlevkin-1 receptor
TIRAP/MAL	MyD88 adapter-like (adaptorska molekula podobna MyD88)
TLC	Tankoplastna kromatografija
TLR	Toll-like receptor (Toll-u podobni receptor)
TRAM	TRIF-related adaptor molecule (TRIF-u sorodna adaptorska molekula)
TRIF	TIR-domain containing adapter-inducing interferon β (TIR domeno-vsebujoči adapterski protein, ki inducira interferon β)
UDP	Uridin difosfat
UMAG	Uridindifosfat- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanil-D-glutamat
UNAG	Uridindifosfat- <i>N</i> -acetilglukozamin
VČB	Vnetna črevesna bolezen
δ	Kemijski premik
λ	Valovna dolžina

1. UVOD

1.1. IMUNSKI SISTEM

Mikrobi v procesu okužbe vdrejo v telo in se začnejo razmnoževati, kar posledično vodi do motenega delovanja tkiv in organov, čemur sledi razvoj bolezenskih znakov. Večcelični organizmi so proti temu razvili različne obrambne mehanizme. Med fizične in kemične pregrade spadajo koža in sluznice, ki preko različnih mehanizmov (želodčna kislina, zaklopke, peristaltika, mukus in ciliarni prenos v dihalih) preprečujejo kolonizacijo mikroorganizmov na površini in v notranjosti telesa. Kljub naštetim pregradam pa so nekatere vrste mikrobov (patogene) razvile načine (tvorba encimov, toksinov), kako vdreti v organizem. Vsi kompleksni organizmi imajo zato razvit imunski sistem, ki je sestavljen iz celic, tkiv in organov in skrbi za odstranjevanje in uničenje mikrobov, ki jim uspe vdreti v notranjost telesa. Njegova naloga je, kljub zapletenemu delovanju, preprosta. Kot prvo mora prepoznati tujek, mobilizirati obrambne celice in izbrati ustrezno vrsto imunskega odziva ter njeno jakost in obseg. Pri tem je pomembno, da odziv in posledično vnetje, organizmu ne povzročajo pretirane škode, saj je namen imunskega odziva preživetje organizma in ne uničenje tujka za vsako ceno (1).

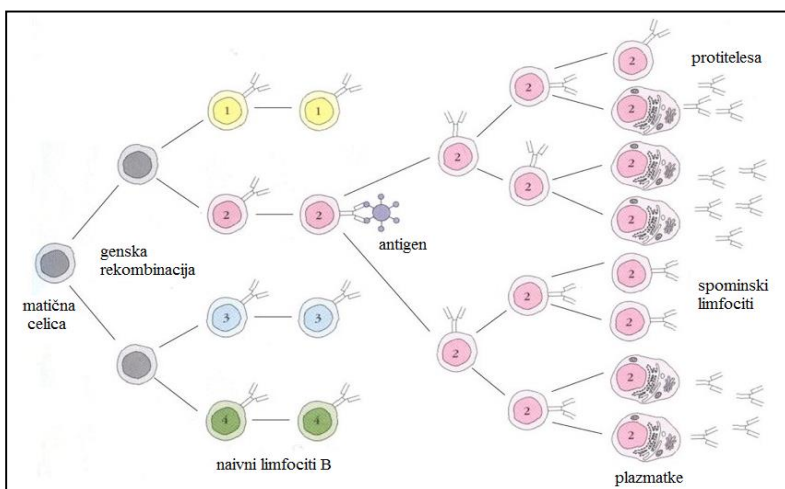
1.1.2. PRIROJENI IMUNSKI SISTEM

Prirojena imunost predstavlja prvo linijo obrambe organizma pred patogeni. Mednje spada tako zaščitna funkcija zunanje bariere (koža, sluznica, cilije, telesni izločki s protimikrobnimi učinkovinami), signalne molekule (interferoni, kemokini, dejavniki tumorske nekroze, kolonije stimulirajoči faktorji in transformirajoči rastni faktor) kot tudi efektorski mehanizem komplementa, ki vodi v kemotakso fagocitov na kraj okužbe, opsonizacijo ali lizo mikroorganizma. Mnoge molekule (lizocim, komponente komplementa) in celice udeležene v prirojeni imunosti imajo sposobnost prepoznavanja določenih kemijskih struktur PAMP (s patogeni povezani molekulski vzorci, angl. »pathogen-associated molecular patterns«), ki so edinstvene za mikrobov in jih nikoli ne zasledimo v večceličnih organizmih. Fagociti prepoznajo te vzorce preko njihove vezave na receptorje za prepoznavo vzorcev (PRR; receptorji za prepoznavo molekulskih vzorcev, angl. "pattern recognition receptors"). V prirojenem imunskem odzivu delujejo predvsem celice mieloidnega izvora (monociti/makrofagi, nevtrofilci, eozinofilci, mastociti, nezrele

dendritične celice). Med limfoidnimi celicami pa so to naravne celice ubijalke in plazmacitoidne dendritične celice. Če patogenom uspe prodreti v tkiva, jih tam prepoznajo in privzamejo fagociti ter jih na ta način uničijo. Prepoznavanje patogenov in tkivne poškodbe sprožijo vnetni odziv (2, 3).

1.1.3. PRIDOBLJENI IMUNSKI SISTEM

Mehanizmi prirojene odpornosti pa sami velikokrat niso zadosti učinkoviti proti nekaterim patogenim mikrobom, zato so vretenčarji tekom evolucije razvili še eno skupino obrambnih mehanizmov, ki jo imenujemo pridobljena imunost (4). Pridobljeni imunski odziv omogočajo limfociti B in T s svojimi antigenскими receptorji, imunoglobulini (Ig) in T-celičnimi receptorji (TCR). Limfocite, ki še nikoli niso prišli v stik z antigenom, imenujemo naivni limfociti. Vsak naivni limfocit ima na svoji površini receptorje, ki so specifični samo za eno vrsto antigena. Tako se ob okužbi tujek (antigen) veže le na limfocite, ki imajo ustrezno specifične receptorje. Po vezavi antigena se začnejo limfociti hitro razmnoževati (proliferacija) in zoreti (diferenciacija), zato iz posameznega limfocita v nekaj dneh nastanejo številni limfociti z enakimi antigenскими receptorji (specifični limfocitni klon), ki odstranijo antigen. Posledica klonske ekspanzije limfocitov je tudi imunski spomin. Ob ponovnem srečanju organizma z enakim antigenom pride do hitrejšega in močnejšega sekundarnega imunskega odziva, saj se proti antigenu odzovejo specifični kloni spominskih limfocitov, ki so že nastali med primarnim imunskim odzivom. Pri tem spominski limfociti diferencirajo v efektorske celice: limfociti T v aktivirane citotoksične celice, limfociti B pa v plazmatke, ki tvorijo številna protitelesa (1).



Slika 1. Shema diferenciacije in klonske selekcije limfocitov B (2).

1.2. RECEPTORJI ZA PREPOZNAVO MOLEKULSKIH VZORCEV (PRR)

Vse celice imunskega sistema in epitelne celice prepoznajo molekule tujkov z receptorji za prepoznavo vzorcev (PRR). Mednje spadajo membranski receptorji TLR (angl. »Toll-like receptors«) in lektinski receptorji tipa C (CLR), ter znotrajcelični (citosolni) receptorji NLR (angl. »Nod-like receptors«), RLR (angl. »RIG-I-like receptors«) in ALR (angl. »AIM2-like receptors«). Med prosto krožeče PRR, ki se nahajajo v krvnem obtoku in tkivnih tekočinah, pa uvrščamo še MBL (manozo-vezavni lektin), CRP (C-reaktivni protein), LBP (lipopolisaharid-vezavni protein) in sistem komplementa (2). Na ustrezne PRR se vežejo (i) specifične mikrobne molekule, ki se evolucijsko niso dosti spremenile in so značilne za večje skupine patogenih mikrobov (PAMP) (1), in (ii) s poškodbami povezani molekulski vzorci (DAMP), ki se kopičijo na površini ali sproščajo iz poškodovanih celic. Po prepoznavi liganda pride v večini primerov do aktivacije znotrajceličnih signalnih kaskadnih poti, ki vodijo v nastanek in izločanje vnetnih citokinov, kemokinov in protivirusnih molekul (5). Novejše *in vivo* in *in vitro* študije so pokazale, da pri regulaciji imunskega odziva igra pomembno vlogo tudi sodelovanje med različnimi PRR-ji, saj patogeni organizmi običajno vsebujejo več različnih molekul PAMP (6). Za uspešno eliminacijo patogenov je torej potrebna natančna uskladitev delovanja PRR-jev, saj bi organizem ob neustrezni oz. preveliki aktivaciji PRR-jev lahko razvil vnetna ali avtoimunska bolezenska stanja.

1.2.1. TOLL-U PODOBNI RECEPTORJI (TLR)

Med najpomembnejše in najbolj raziskane PRR spada družina transmembranskih glikoproteinov tipa 1, ki jih imenujemo Toll-u podobni receptorji. Zasledimo jih tako pri imunskih celicah (monociti, makrofagi, dendritične celice, nevtrofilci, limfociti B, limfociti T) kot tudi v fibroblastih, endotelijskih in epitelijah celicah (5). Receptor, ki enkrat prebada membrano, je sestavljen iz ekstracelularne domene LRR (z levcinom bogate ponovitve, angl. "leucine-rich repeats"), ki je pomembna za prepoznavo PAMP/DAMP molekul, in citoplazemske domene TIR (Toll/IL-1 receptor), ki služi kot vezavno mesto za znotrajcelične proteine, udeležene v signalni poti. LRR domena je sestavljena iz nizov ponavljajočih segmentov 24-29 AK, ki vsebujejo sekvenco xLxxLxLL (x predstavlja eno izmed AK, L pa levcin) (2) ter hidrofobnih ostankov med določenimi ponovitvami. Več zaporednih regij LRR tvori v proteinu tuljavo v obliki podkve (7). Po vezavi

PAMP/DAMP molekul na neglikozilirano mesto LRR domene pride do aktivacije signalnih poti MyD88 (diferenciacijski mieloidni protein 88, angl. "myeloid differentiation primary response protein 88"), TRIF (TIR domeno-vsebujoči adaptorski protein, ki inducira interferon β , angl. "TIR-domain containing adapter-inducing interferon β "), TRAM (TRIF-u sorodna adaptorska molekula, angl. "TRIF-related adaptor molecule") in TIRAP/MAL (adaptorska molekula podobna MyD88, angl. "MyD88 adapter-like"), ki privedejo do nastanka in sproščanja vnetnih citokinov, kemokinov in interferonov tipa I in III (5). Do sedaj so identificirali 11 človeških receptorjev TLR (8), katerih ligandi so navedeni v preglednici I (2).

Preglednica I. Pregled človeških Toll-like receptorjev in njihovih ligandov.

TLR	LIGANDI	TARČNI MIKROBI
TLR 1	Triacil lipoproteini	Mikobakterije
TLR 2	Peptidoglikan GPI-vezavni proteini Lipoproteini cimosan	Gram-pozitivne bakterije Tripanosom Mikobakterije Kvasovke in druge glive
TLR 3	Dvoverižna RNK (dsRNA)	Virusi
TLR 4	Lipopolisaharid Protein F	Gram-negativne bakterije Respiratorni sincicijski virus (RSV)
TLR 5	Flagelin	Bakterije
TLR 6	Diacil lipopeptidi Cimosan	Mikobakterije Kvasovke in glive
TLR 7	Enoverižna RNK (ssRNA)	Virusi
TLR 8	Enoverižna RNK (ssRNA)	Virusi
TLR 9	CpG nemetilirani dinukleotidi Dinukleotidi Okužba s herpes virusom	Bakterijska DNK Nekateri herpesvirusi
TLR 10, 11	Neznano	Neznano

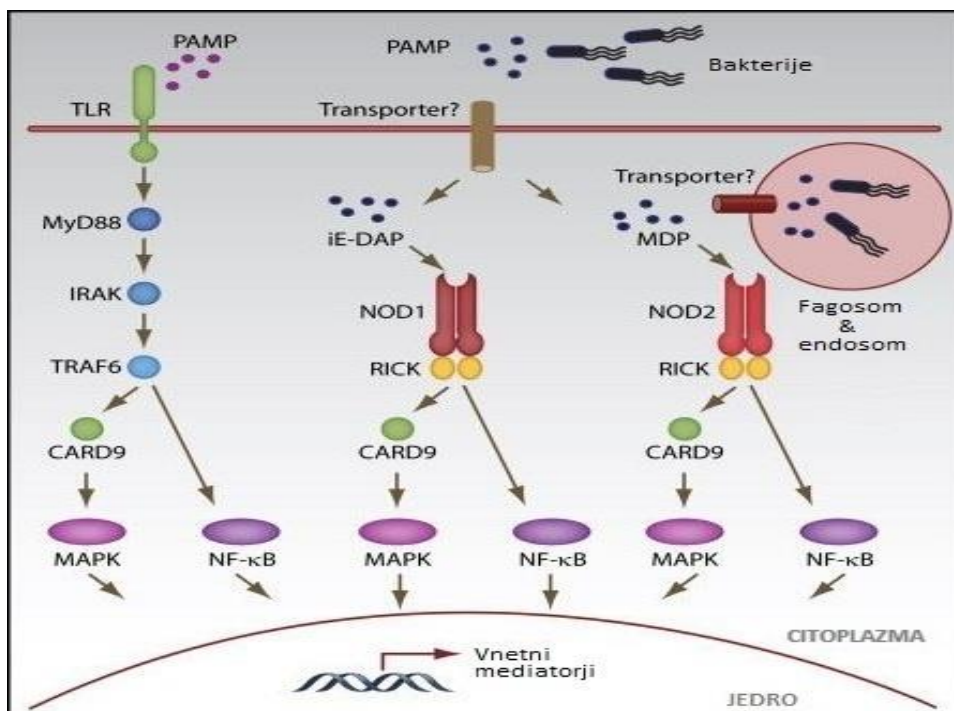
1.2.2. NOD-U PODOBNI RECEPTORJI (NLR)

V zadnjih letih so znanstveniki odkrili družino citosolnih receptorjev NLR, ki so prav tako udeleženi v zaznavi molekul tipov PAMP/DAMP in služijo kot druga linija obrambe pred vdorom patogenih mikrobov (9). Osnovno zgradbo NLR receptorjev sestavljajo tri strukturne domene: (i) *N*-terminalna signalizacijska domena (CARD - angl. »Caspase activation and recruitment domain«, PYD - angl. »Pyrin domain« ali BIR - angl. »Baculovirus inhibitor repeat domain«), (ii) centralna nukleotid-vezavna oligomerizacijska domena (NOD) in (iii) LRR domena, pomembna za prepoznavo molekulskih vzorcev. V človeškem genomu najdemo zapis za 23 genov NLR. Glede na *N*-terminalno domeno lahko proteine NLR uvrstimo v tri večje skupine (NLRC, NLRB, NLRP) (2). Njihova poglavitna vloga je aktivacija prirojenega imunskega sistema s spremljajočim vnetnim odzivom. Nekateri NLR pa lahko sprožijo vnetje z obsežnimi poškodbami tkiva in povzročijo razna bolezenska stanja. Po vezavi molekul PAMP/DAMP na *C*-terminalno LRR domeno, pride do konformacijske spremembe, ki ji sledi od ATP odvisna oligomerizacija receptorja. Tako se izpostavi signalizacijska domena, ki povzroči aktivacijo in vezavo efektorskih molekul, ki preko kaskadnih poti MAPK (z mitogeni aktivirana protein kinaza, angl. "mitogen-activated protein kinase"), NK- κ B (nuklearni faktor κ B, angl. "nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells") in inflamasomov privedejo do aktivacije mehanizmov prirojenega imunskega sistema (9). Najbolj raziskana receptorja iz družine NLR sta NOD1 in NOD2, ki prepoznavata manjše peptide (iE-DAP, MDP - muramil dipeptid), ki nastanejo pri razgradnji peptidoglikana.

1.2.3. NOD1

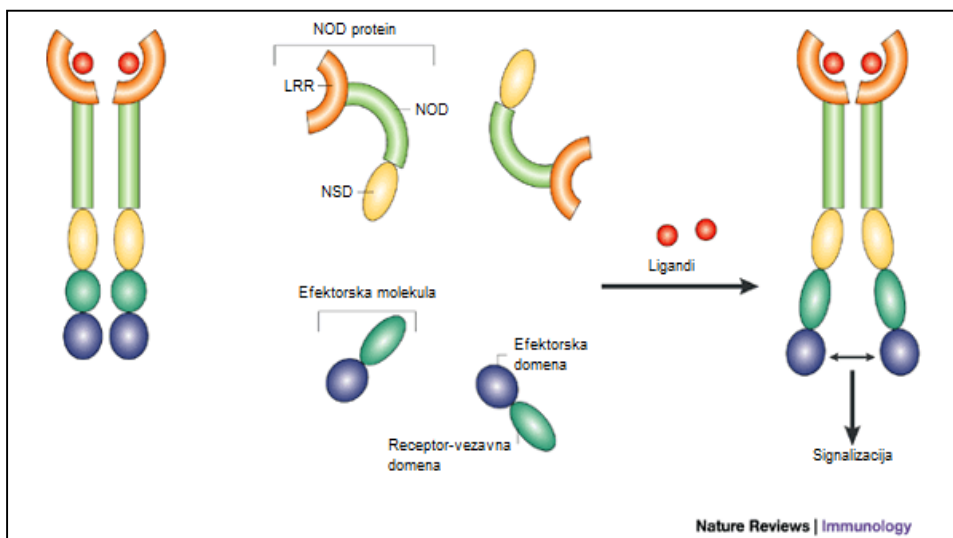
NOD1 je 108-kDa velik citosolni protein, ki spada v podskupino NLRC (10). Nahaja se tako v APC kot tudi v epitelijskih celicah, kjer ima pomembno vlogo pri obrambi pred vdorom patogenov. Receptor prepoznavlja fragmente peptidoglikana, ki vsebujejo aminokislino mezo-DAP, ki se nahaja v celični steni predvsem Gram-negativnih in tudi nekaterih Gram-pozitivnih bakterij (*Listeria* in *Bacillus spp*) (11, 12). Ker se receptorji NOD1 nahajajo v citosolu celic, morajo njihovi ligandi za uspešno aktivacijo kot prvo preiti celično membrano. Nekateri invazivne bakterije, kot je npr. *Shigella flexneri*, lahko ob okužbi same prenesejo potencialne ligande v citosol (13). Prehod ligandov preko epitelijskih celic poteka s klatrinom posredovano endocitozo, ki se nato iz endosoma

prenesejo v citotol preko oligopeptidnega transportnega proteina SLC15A4. Opisan je tudi transport di- in tripeptidov, ki vsebujejo aminokislino mezo-DAP, preko peptidnega transporterja PepT1, ki se nahaja na resičasti membrani intestinalnih celic, v citosol (14). Znani fragment, ki aktivira receptor NOD1, je D-Glu-mezo-DAP (iE-DAP) (15). Svoje učinke posreduje preko aktivacije serin-treonin kinaze RICK (imenovane tudi Ripk2 ali RIP2) in adaptorske molekule CARD9. V nadaljnji kaskadni poti pride do aktivacije NF- κ B in MAPK, ki privedejo do povečane sinteze vnetnih mediatorjev (9).



Slika 2. Model prepoznavne peptidoglikana preko receptorjev NOD1 in NOD2 (9).

Znotrajcelična receptorja NOD1 in NOD2 prepoznavata fragmente peptidoglikana (iE-DAP in MDP). Zunajcelične molekule PAMP prepoznajo receptorji TLR. Signalizacijske poti omenjenih receptorjev privedejo do aktivacije transkripcijskega faktorja NF- κ B in MAPK, ki privede do povečane sinteze vnetnih mediatorjev (9).



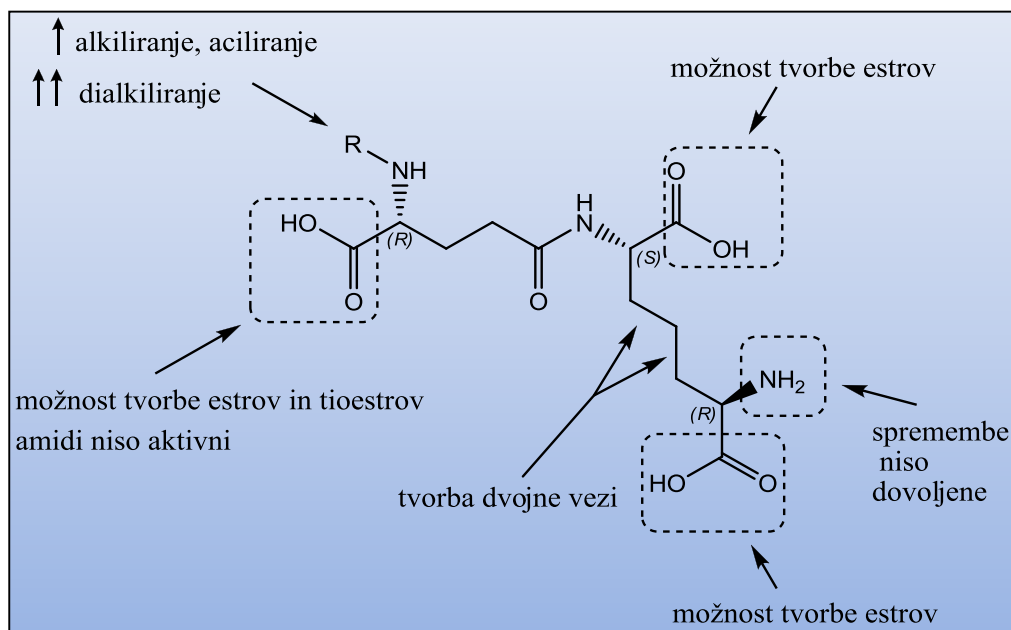
Slika 3. Osnovna zgradba receptorjev NLR in model njihove aktivacije (16).

Po vezavi ligandov na C-terminalno domeno LRR, pride do konformacijske spremembe, ki ji sledi od ATP odvisna oligomerizacija receptorja. Tako se izpostavi signalizacijska domena, ki povzroči aktivacijo in vezavo efektorskih molekul, ki preko kaskadnih poti MAPK, $\text{NK-}\kappa\text{B}$ in inflamasomov privedejo do aktivacije mehanizmov prirojenega imunskega sistema.

1.2.4. ODNOS MED STRUKTURO IN DELOVANJEM AGONISTOV NOD1

Do sedaj so opravili razmeroma malo raziskav, ki bi določile strukturne zahteve za agonistično delovanje na receptorjih NOD1. Ker 3D strukture vezavnega mesta receptorja NOD1 (domena LRR) še ne poznamo, načrtujemo nove agoniste glede na že poznane ligande. Prvi dve objavljeni spojini, ki sta izkazovali tako aktivnost, sta bili D-laktoil-L-alanil- γ -D-glutamil-L-mezo-diaminopimelil-L-glicin (FK-156) in heptanoil- γ -D-glutamil-L-mezo-diaminopimelil-D-alanin (FK-565) (13, 15). Po odkritju minimalne sekvence potrebne za vezavo na receptor NOD1, dipeptida D-Glu-mezo-DAP (iE-DAP), je sledilo več poskusov povečanja aktivnosti spojine, predvsem z dodajanjem lipofilnih elementov na funkcionalne skupine D-Glu (15, 11). Lipofilni ostanki lahko namreč tvorijo micelom podobne strukture in tako pripomorejo k boljšem prehajanju takih spojin skozi celične membrane (11). Tako so npr. *N*-acilni derivati z višjimi maščobnimi kislinami kot so miristinska in palmitinska kislina kar nekajkrat zvišali izražanje faktorja $\text{NF-}\kappa\text{B}$ v celicah HEK293T, kar je pomenilo, da je prišlo do znatnega izboljšanja agonističnega učinka na NOD1 (17). Edino obširnejšo študijo odnosa med strukturo in delovanjem (SAR) z različnimi analogi iE-DAP so izvedli Agnihotri in sodelavci (15). V njej so ugotovili, da tako C_{12} *N*-alkiliranje ($\text{EC}_{50} = 0,023 \text{ nM}$) kot tudi C_{12} *N*-aciliranje ($\text{EC}_{50} = 0,027 \text{ nM}$) α -

amino skupine D-Glu privedeta do povečanja aktivnosti glede na referenčno spojino iE-DAP ($EC_{50} = 0,03 \text{ nM}$). Največjo aktivnost pa so izmerili C_{12} *N,N*-dialkilirani spojini ($EC_{50} = 0,0015 \text{ nM}$) (15). Dodekanoilni in etilni estri na α -karboksilni skupini D-Glu so bili po učinkovitosti primerljivi C_{12} *N*-aciliranemu derivatu, medtem ko je tioestrski derivat izkazoval nižjo aktivnost. Tvorba amida se je izkazala kot slaba, saj se je aktivnost taki spojini zelo zmanjšala oz. je ni bilo. Za razliko od glutamatnega dela osnovne molekule, pa mezo-DAP dopušča manj sprememb. Spojini, ki sta imeli mezo-DAP zamenjan z monoaminopimelinsko kislino ali s kadaverinom (pentan-1,5-diamin), sta bili neaktivni. Tudi spremembe na amski skupini mezo-DAP niso zaželeni, saj so se gvanidinski in aminoimidazolinski analogi izkazali za manj učinkovite. Biološka aktivnost je močno odvisna tudi od stereokemije DAP, saj najmočnejše delovanje zasledimo pri (2*S*, 6*R*)-mezo-DAP strukturi, ki je naravno prisotna v peptidoglikanski mreži (11). Prav tako so aktivnost spojin poskusili povišati z uvedbo dvojne vezi na mestih $\beta\gamma$ in $\gamma\delta$ verige mezo-DAP, saj take spojine zaradi rigidizacije zavzamejo manj prostorskih konformacij. Eden izmed teh novih rigidiziranih analogov D-Glu-mezo-DAP je izkazoval celo boljše delovanje kot C_{12} -iE-DAP (11).



Slika 4. SAR dipeptida D-Glu-mezo-DAP (prirejeno po (15, 11)).

1.2.5. UDELEŽENOST NOD1 PRI BOLEZNIH

Nepravilno delovanje receptorjev NOD1 znanstveniki povezujejo s številnimi vnetnimi in avtoimunskimi boleznimi (18). Po odkritju povezave med NOD2 in Crohnovo boleznijo so se številne študije osredotočile predvsem na vlogo NOD1 in NOD2 pri razvoju črevesnih bolezni (13).

Neprestan stik intestinalnega tkiva s črevesnimi bakterijami vzdržuje sluznico v stanju t.i. "fiziološkega vnetja". Pri vzdrževanju homeostaze je zato pomembno uravnovešeno delovanje zaščitnih in vnetnih odgovorov organizma (13). Pomembni regulatorji imunskega odziva so tudi receptorji NOD1. Mutacije receptorjev NOD1 (insercijsko-delecijski polimorfizem v intronu 9) povezujejo s povečanim tveganjem za razvoj kronične vnetne črevesne bolezni (predvsem v obliki ulceroznega kolitisa) (18, 19). Polimorfizme NOD1 povezujejo tudi z boleznimi kot sta astma in atopični sindrom (12, 18), pomembno vlogo pa imajo tudi pri patogenezi multiple skleroze. Nedavne raziskave bolnikov obolelih z multiplo sklerozo, kažejo na vpletenost NOD1 pri aktivaciji dendritičnih celic v CZS, ki promovirajo (avto-reaktivno) delovanje T in B celic (20). Ostale raziskave povezujejo nepravilno delovanje NOD1 tudi z vnetnimi srčno-žilnimi boleznimi (21), uveitisom in nekaterimi vrstami raka (želodčni rak, rak na jajčnikih in prostati, pljučni rak in limfomi) (22).

Modulacija naravnega imunskega odziva predstavlja enega glavnih terapevtskih ciljev pri razvoju novih učinkovin za zdravljenje avtoimunskih in kroničnih vnetnih bolezni. Z antagonisti receptorjev NOD1 bi dosegli zaviralni učinek sinteze vnetnih mediatorjev in tako zdravili nekatere akutne in kronične vnetne bolezni (18). Po drugi strani pa bi z agonisti lahko stimulirali imunski sistem pri imunsko oslabljenih bolnikih (npr. pri bolnikih z AIDS-om, bolnikih na protitumorni terapiji, pri transplantaciji tkiv/organov). Ker pride po aktivaciji receptorja NOD1 tudi do aktivacije pridobljenega imunskega odziva (aktivacija Th2 celic, kar sproži nastanek protiteles), bi lahko take spojine uporabili tudi kot adjuvanse v cepivih (15, 1).

Preglednica 2. Nekatere avtoimunske in infekcijske bolezni povezane z NOD1 (12).

Bolezen	Mutacije	Komentar	Reference
Okužba s <i>Helicobacter pylori</i>	/	Prenos PGN v epitelijske celice preko IV sekrecijskega sistema	8
Okužba s <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	/	Aktivacija NF- κ B v endotelijskih celicah	76
Vnetne črevesne bolezni (VČB)	Delecijski polimorfizem v LRR domeni	Povečana verjetnost za nastanek VČB	6
Astma	Insercijski polimorfizem v LRR domeni	Povečana verjetnost za nastanek astme	7

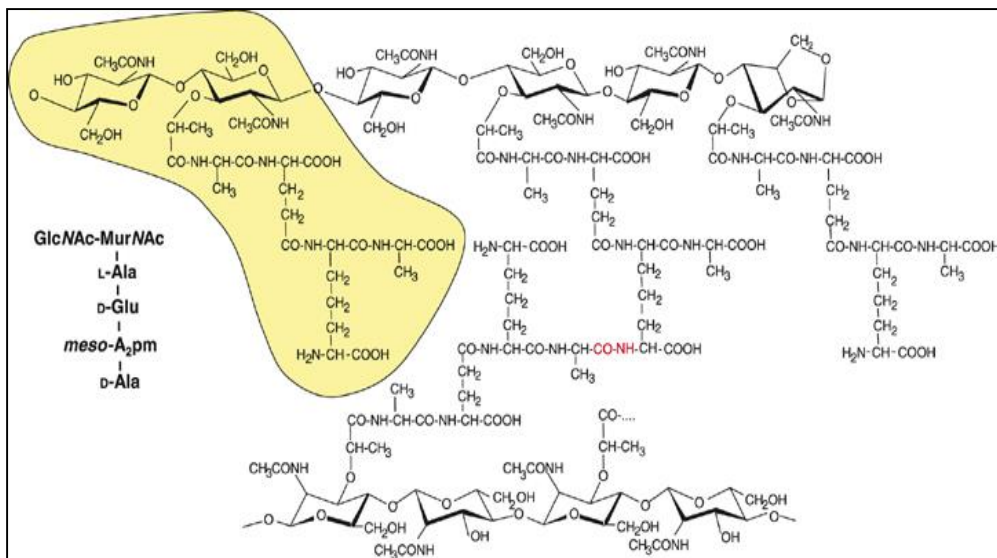
1.3. PEPTIDOGLIKAN

Peptidoglikanski plašček (murein) je esencialni in edinstveni strukturni element celične stene večine bakterij. Glikanske niti, premrežene s kratkimi peptidi, obdajajo citoplazemsko membrano in omogočajo bakterijam integriteto ter jo varujejo pred zunanjimi vplivi. Poleg tega deluje peptidoglikan tudi kot sidrišče za ostale komponente celične stene (proteine in tehnoske kisline). Vsaka inhibicija biosinteze (mutacije, antibiotiki) ali degradacija celične stene (npr. z lizocimom) vodi v celično smrt (23, 24).

1.3.1. KEMIJSKA STRUKTURA PEPTIDOGLIKANA

Peptidoglikan je heteropolimer, sestavljen iz linearnih glikanskih enot, ki so prečno premrežene s kratkimi peptidi. Glikanske niti sestavljajo ponavljajoče enote *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) in *N*-acetilmuraminske kisline (MurNAc), ki so med seboj povezane z $\beta(1,4)$ vezjo. Na vsak D-laktoilni preostanek MurNAc je vezan peptidni fragment, ki ga najpogosteje sestavljajo L-Ala- δ -D-Glu-mezo-DAP-D-Ala ali L-Ala- δ -D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala. Prečno premreženje glikanskih niti poteka med karboksilno skupino D-Ala na mestu 4 ene izmed teh niti in aminske skupino mezo-DAP na mestu 3

sosednje niti. Povezava med njima lahko poteka tudi posredno preko manjšega peptidnega mosta (23).

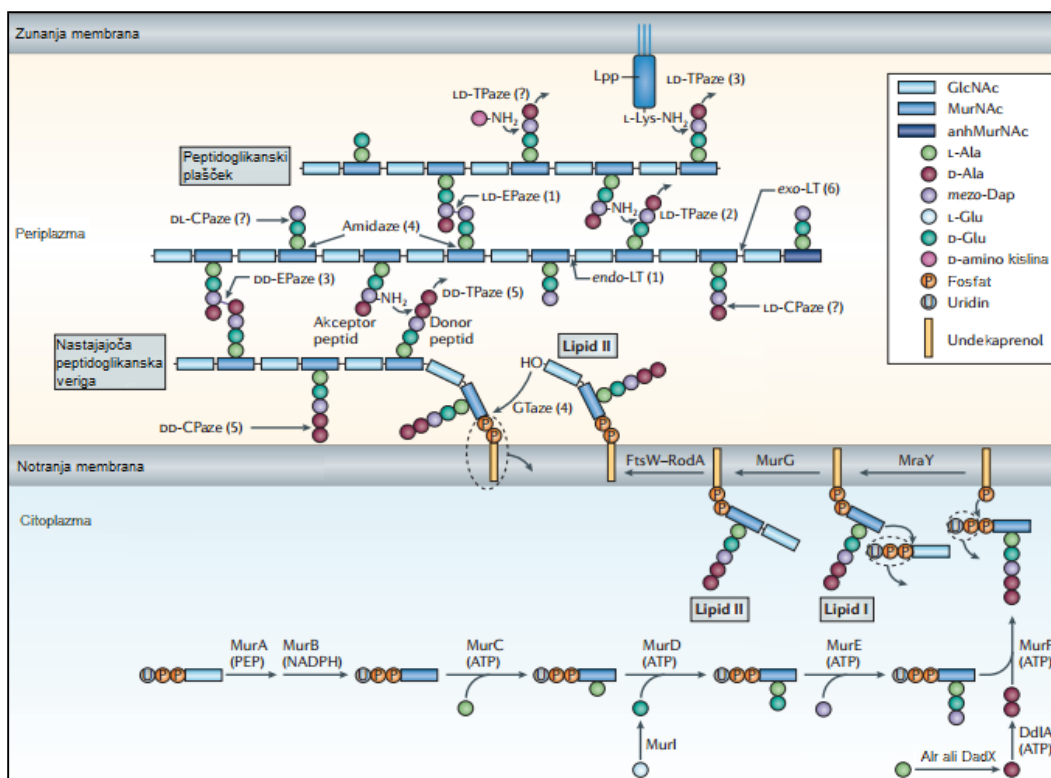


Slika 5. Kemijska struktura peptidoglikana pri *E. coli* (23).

Glikanske niti sestavljajo ponavljajoče enote *N*-acetilglukoamina (GlcNAc) in *N*-acetilmuraminske kisline (MurNAc), ki so med seboj povezane z $\beta(1,4)$ vezjo in se zaključijo z 1,6-dehidroMurNAc ostankom. Z rumeno barvo je označena osnovna podenota disaharid tetrapeptida, ki je prikazana tudi s kraticami v levem delu slike. Osrednji del prikazuje prečno premrežen peptid. Z rdečo barvo je označena peptidna vez med dvema aminokislinskima verigama.

1.3.2. SINTEZA PEPTIDOGLIKANA

Sinteza peptidoglikana poteka v treh večjih korakih. (i) V citoplazmi se s pomočjo encimov ligaz Mur in ustreznih kofaktorjev sintetizirata topna aktivirana nukleotidna prekursorja UDP-*N*-acetilglukozamin in UDP-*N*-acetilmuramil pentapeptid. (ii) Ti prekursorski molekuli se nato vežeta na transportni C₅₅ lipid (undekaprenil fosfat), ki jima omogoča prenos preko notranje membrane v periplazemski prostor. (iii) Glikoziltransferaze katalizirajo polimerizacijo nastajajoče peptidoglikanske verige, čemur nato sledi vgraditev nastajajočih verig v že obstoječ peptidoglikanski plašč (24).



Slika 6. Biosinteza peptidoglikana (24).

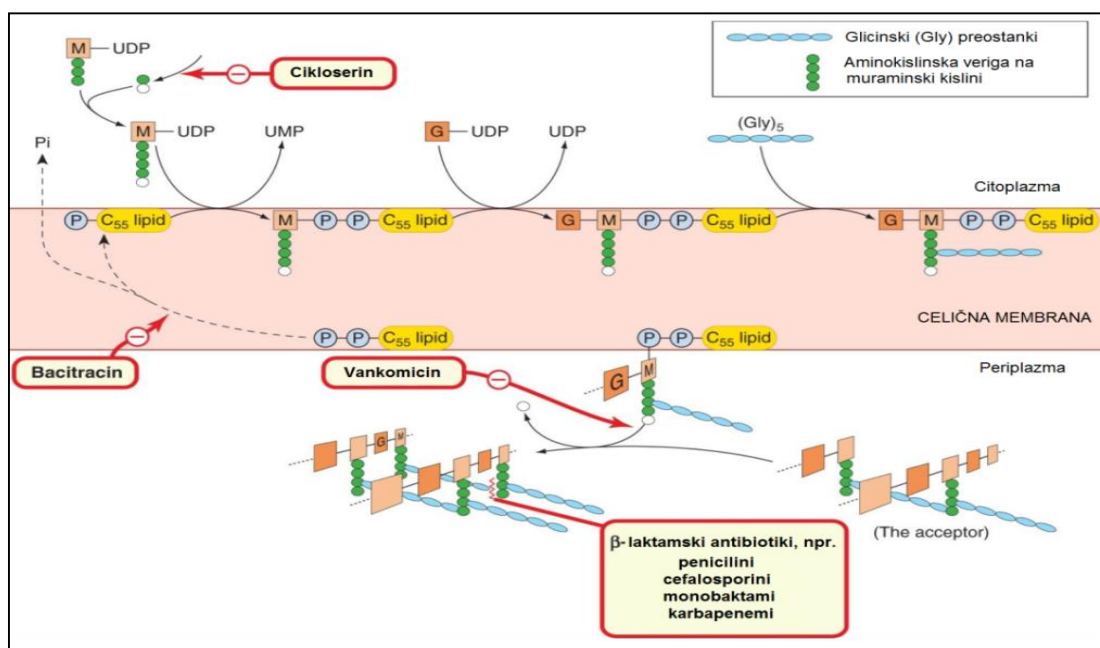
Sinteza prekursorskih molekul poteka v citoplazmi. Po vezavi prekursorjev na transportni lipid (undekaprenil fosfat), se molekule s pomočjo FtsW-RodA prenesejo preko notranje membrane v periplazemski prostor. Glikoziltransferaze (Gtaze) katalizirajo polimerizacijo nastajajoče peptidoglikanske verige, čemur nato sledi vgradnja novonastale verige v že obstoječ peptidoglikanski plašček, ki jo omogočijo DD-transpeptidaze (DD-TPaze).

1.3.2.1. ZNOTRAJCELIČNA SINTEZA PEPTIDOGLIKANA IN LIGAZE MUR

V znotrajcelični fazi sinteze peptidoglikana imajo pomembno vlogo encimi ligaze Mur, ki katalizirajo pripenjanje aminokislinskih preostankov na UDP-*N*-acetilmuraminsko kislino. V prvem koraku sodeluje MurA, ki pripne enolpiruvatni preostanek fosfoenolpiruvata (PEP) na mesto 3 UDP-*N*-acetilglukoamina. Nato MurB katalizira redukcijo enolpiruvata do D-laktata. Nato sledi od ATP odvisno zaporedno pripenjanje aminokislinskih preostankov (kar katalizirajo encimi MurC, MurD, MurE in MurF) do končnega UDP-*N*-acetilmuramil pentapeptida, ki je sposoben vgraditve v nastajajočo peptidoglikansko mrežo (25).

1.3.3. INHIBITORJI SINTEZE PEPTIDOGLIKANA

Naraščajoči pojav rezistence patogenih sevov bakterij na antibiotično zdravljenje ogroža zdravje ljudi in povečuje stroške zdravljenja. Enega večjih izzivov današnje medicine zato predstavlja nadaljnji razvoj novih protimikrobnih učinkovin. Peptidoglikan predstavlja primerno tarčo za številne antibiotike, saj vpletanje v njegovo sintezo povzroči nepravilno zgradbo celične stene bakterij kar vodi v lizo. Na sliki 7 so omenjeni nekateri antibiotiki in njihovo mesto delovanja.



Slika 7. Vpletanje antibiotikov v sintezo peptidoglikana (26).

Cikloserin, ki je strukturni analog D-alanina, s kompetitivno inhibicijo prepreči vgradnjo dveh terminalnih alaninskih ostankov na nastajajoči peptidni verigi, pripeti na N-acetilmuraminsko kislino. Vankomicin onemogoči vgraditev novonastale verige peptidoglikana v že obstoječ plašček. Bacitracin prepreči defosforilacijo lipidne prenašalne molekule in onemogoči njegovo delovanje. β -laktamski antibiotiki se kovalentno vežejo na penicilin vezoče proteine-PBP (TPaze) in tako preprečijo premreženje peptidnih verig.

1.3.3.1. ENCIM MurE IN NJEGOVI ZAVIRALCI

Encim MurE (UDP-N-acetilmuramoil-L-alanil-D-glutamat: 2,6-diaminopimelat ligaza) lahko kot substrat poleg aminokisline mezo-DAP prepozna tudi njene strukturne analoge (npr. cistationin ali lantionin), vendar imajo te spojine manjšo afiniteto vezave (višja vrednost K_m) (27). Do sedaj je bilo sintetiziranih razmeroma malo zaviralcev MurE. Kot najmočnejši se je izkazal fosfinatni analog prehodnega stanja I z vrednostjo $IC_{50} = 1,1 \mu M$.

V mikromolarnem področju inhibicijo encima povzročajo še peptidosulfonamid **II** ($IC_{50} = 181 \mu M$) (28), nekateri fosfinati **VI** ($RA = 8\%$) (29), naftil tetronska kislina **III** ($IC_{50} = 13 \mu M$) in fosforiliran derivat hidroksietilenamina **IV** ($IC_{50} = 6 \mu M$) (30). Nekateri fosfinati in β -sulfonamidopeptidi, ki so bili prvotno sintetizirani kot inhibitorji prehodnega stanja MurD, delujejo tudi kot substratni inhibitorji MurE (28). Analogi mezo-DAP **VII**, **VIII** in *N*-acil-dipeptidi izkazujejo nekoliko nižjo aktivnost ($IC_{50} = 0,6-10 \text{ mM}$) (31, 47).

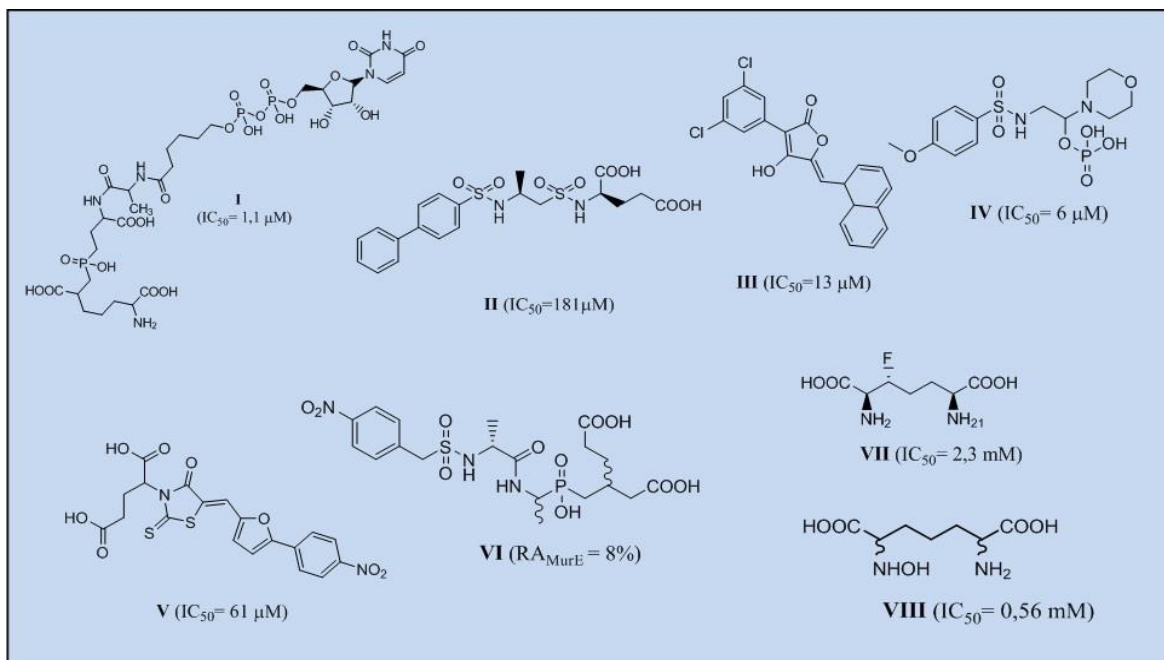


Slika 8. Kristalna struktura dimera MurE (E.coli K12)-zgoraj levo

Rdeča barva prikazuje mezo-DAP vezavno mesto, svetlo zelena ATP-vezavno mesto, oranžno pa je obarvano mesto vezave fragmenta UNAG (PDB, UniProt: 1E8C)

Slika 9. Interakcije liganda DAP v aktivnem mestu encima MurE (PDB 1E8C)-zgoraj desno

Karboksilat na mestu 1 tvori vodikovi vezi z Arg416 in Arg414, karboksilat na mestu 7 tvori vodikovo vez z Arg389. Amino skupina na mestu 2 interagira z Gly464 in Glu468.

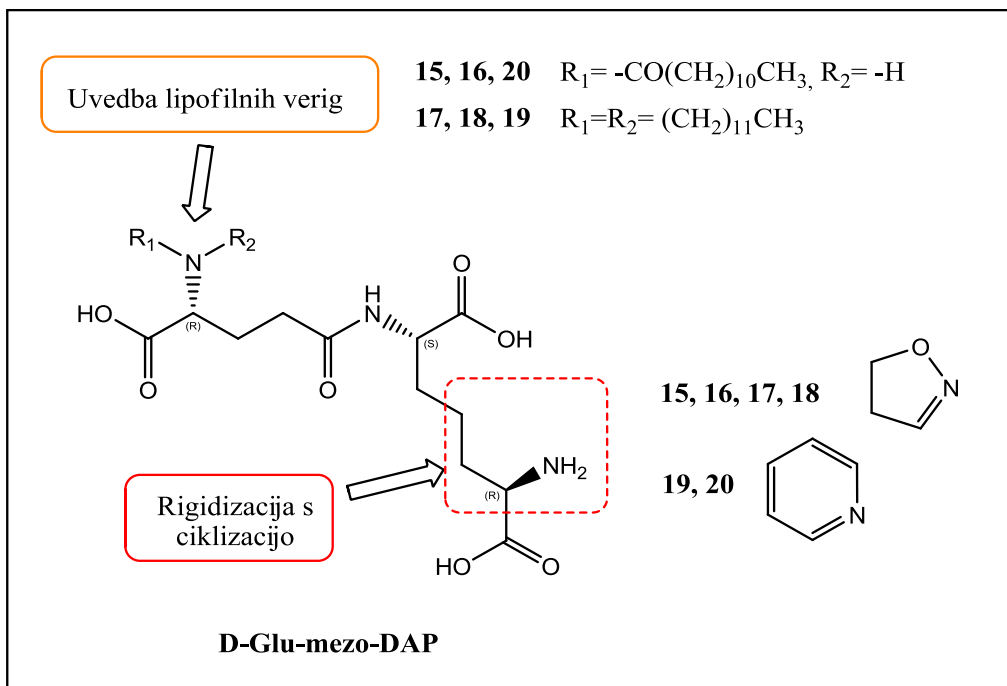


Slika 10. Pregled znanih zaviralcev MurE.

2. NAMEN DELA

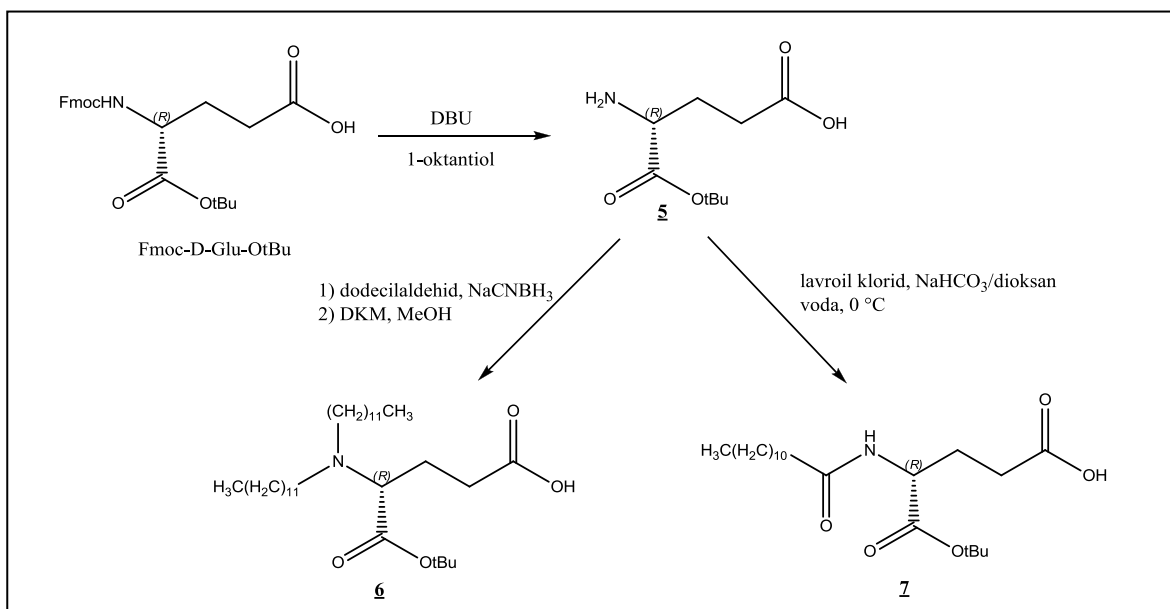
Dipeptid D-Glu-mezo-DAP najdemo kot sestavni del peptidoglikanskega plaščka pri večini Gram-negativnih in nekaterih Gram-pozitivnih bakterijah. Udeležen je v prečnem premreženju glikanskih niti, ki omogočajo integriteto celične stene. Pri vdoru teh bakterij v naše telo se fragmenti, ki v svoji strukturi vsebujejo D-Glu-mezo-DAP vežejo na receptorje NOD1 in sprožijo imunski odziv. Spojine, ki bi posnemale tak fragment, bi torej teoretično imele dvojno delovanje. Delovale bi lahko kot imunomodulatorji (npr. agonisti NOD1), poleg tega pa bi se lahko preko zaviranja bakterijskih ligaz MurE/MurF vpletale v sintezo peptidoglikana in delovale protibakterijsko. Problem te osnovne spojine vodnice predstavljajo njene fizikalno-kemijske lastnosti, saj ji velika polarnost namreč omejuje vstop v celice do tarčnih receptorjev in tako zmanjšuje biološko aktivnost.

Namen našega dela je raziskovanje kemijskega prostora okoli spojine vodnice (D-Glu-mezo-DAP), da bi bolje razumeli odnos med strukturo in delovanjem na receptorju NOD1. Načrtovali in sintetizirali bomo šest derivatov dipeptida D-Glu-mezo-DAP, ki jim želimo izboljšati afiniteto do receptorja NOD1. Ker 3D kristalna struktura receptorja NOD1 še ni znana, bomo nove spojine načrtovali na podlagi strukture in lastnosti že poznanih aktivnih ligandov. Z upoštevanjem znanja o vezavnih energijah bomo aminokislino mezo-DAP rigidizirali s ciklizacijo (izoksazolinjski in piridinski obroč). Slednja ima namreč v svoji strukturi razmeroma dolgo verigo enojnih sp^3 vezi (σ -vez) okoli katerih je možna rotacija. V predhodni študiji, v kateri so na mestu $\beta\gamma$ verige mezo-DAP vgradili dvojno vez, je rigidizacija, predvsem z zmanjšanjem entropijske izgube pri vezavi na NOD1, doprinesla k povišanju aktivnosti takih spojin (11). Da bi spojini izboljšali še njen prehod skozi biološke membrane, bomo na α -NH₂ skupino glutaminske kisline uvedli dolge acilne in alkilne verige. Za optimalno dolžino lipofilnih verig se je izkazala veriga 12-ih C-atomov. Sintetizirane spojine bomo nato dali biološko ovrednotiti in preverili njihovo agonistično aktivnost na receptorjih NOD1. Ker vse spojine vsebujejo fragment mezo-DAP, pričakujemo tudi, da bodo potencialno delovale kot zaviralci encimov MurE in/ali MurF. Spojinam bomo dali izmeriti tudi rezidualno encimsko aktivnost, najboljšim kandidatom pa še IC₅₀.

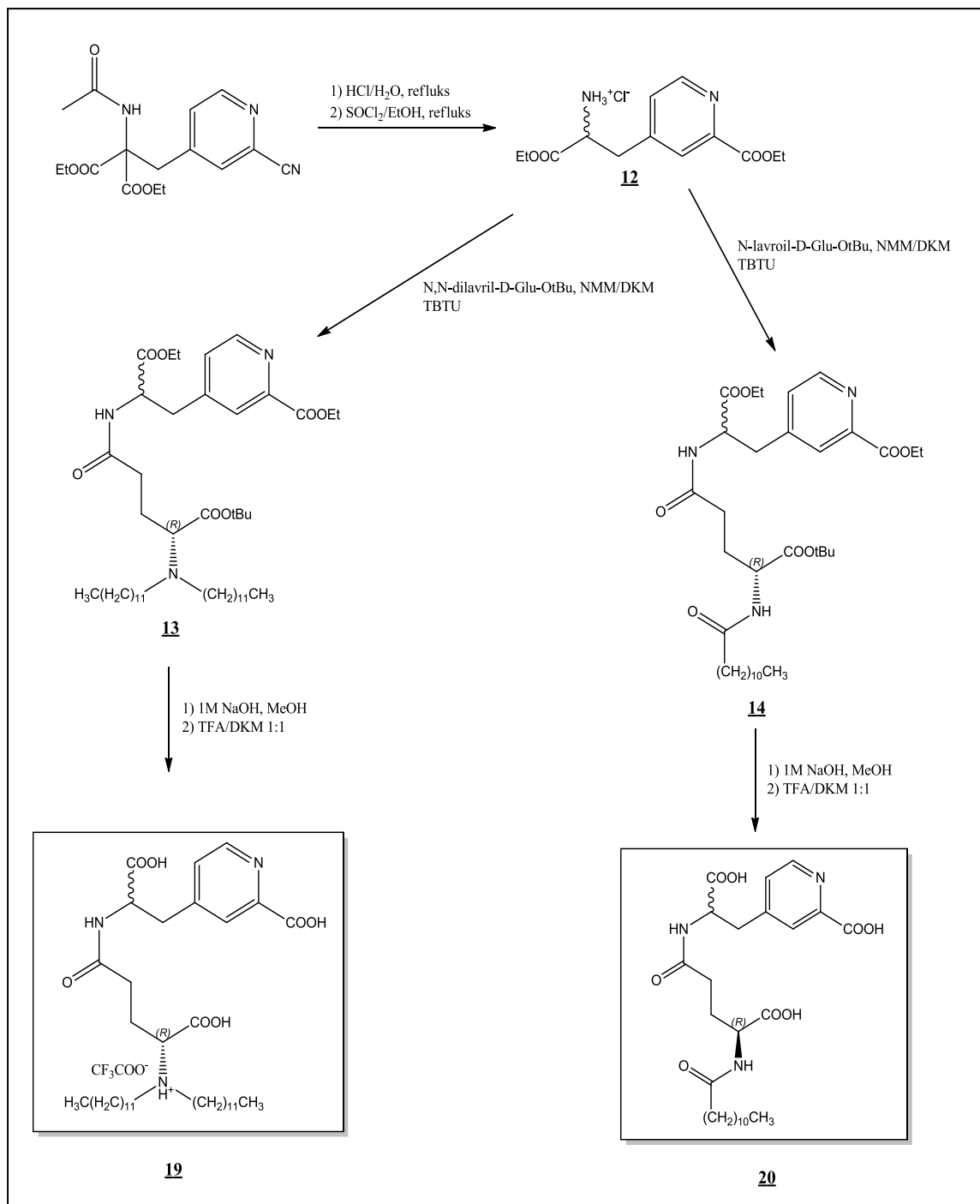


Slika 11. Načrtovanje novih NOD1 agonistov na osnovi dipeptida D-Glu-mezo-DAP.

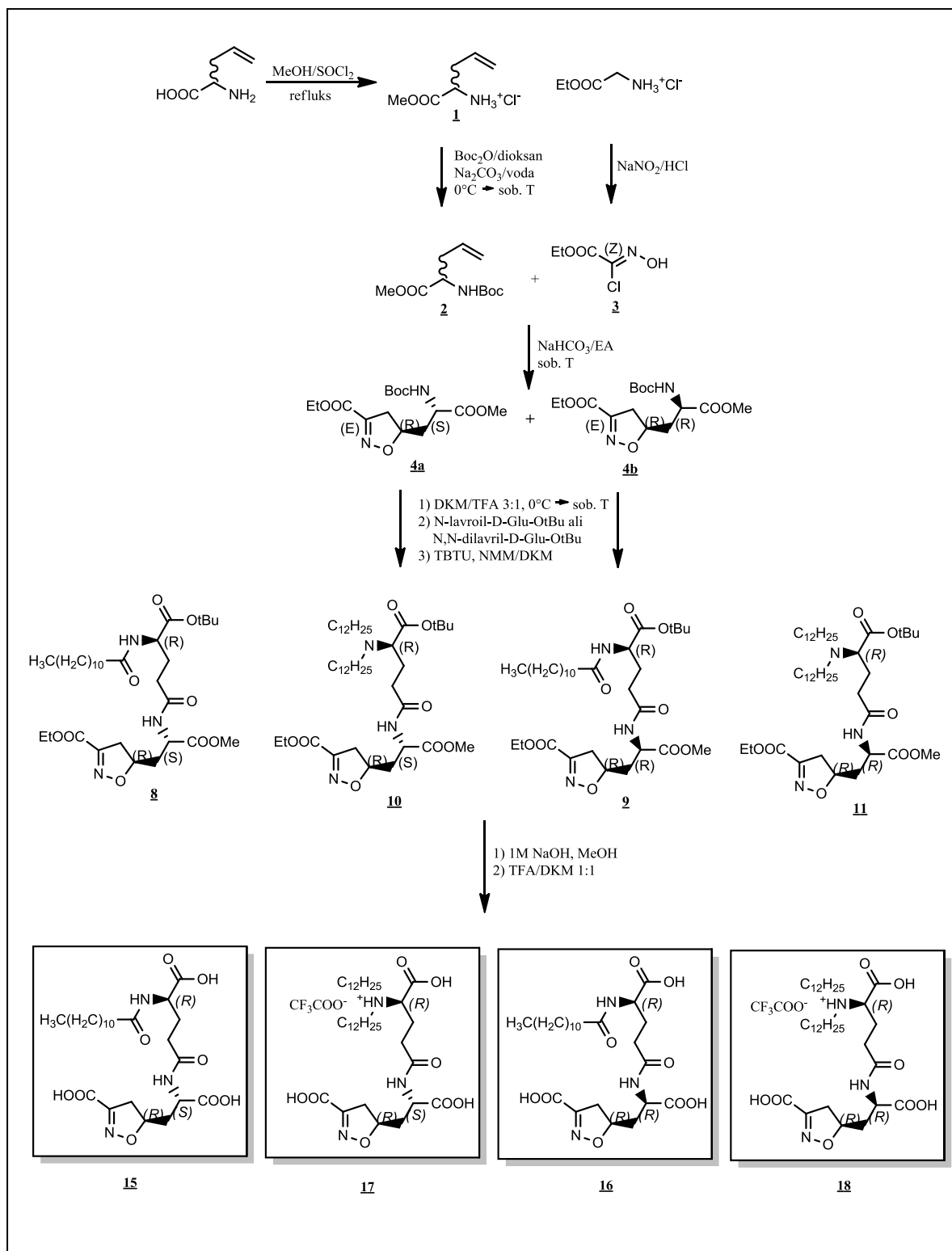
Na amino skupino D-Glu bomo uvedli lipofilno skupino z aciliranjem oz. dialkiliranjem. Rigidizacijo v molekuli bomo izvršili s ciklizacijo stranske verige fragmenta mezo-DAP.



Slika 12. Shema sinteze zaščitene dialkilirane in aciliranega derivata D-Glu.



13. Shema sinteze lipofilnih piridinskih analogov D-Glu-mezo-DAP.



Slika 14. Shema sinteze lipofilnih izoksazolinskih analogov D-Glu-mezo-DAP.

3. MATERIALI IN METODE

Reagenti in topila

Pri delu smo uporabljali reagente in topila različnih proizvajalcev (Acros Organics, Sigma-Aldrich, Fluka, Molekula, Bachem, Merck, Janssen, Kemika). Brezvodni diklorometan smo pripravili po standardnem postopku in ga hranili nad molekularnimi siti z velikostjo por 0,4 nm.

Laboratorijska oprema

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

Kromatografske metode

- **Tankoplastna kromatografija (TLC)**

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

- **Kolonska kromatografija**

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

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

HPLC analize smo izvajali na instrumentu Agilent Technologies HP 1100 z UV-VIS detektorjem G1365B, kolono Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 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 gradient spreminjali glede na izbrano metodo:

♦ **HPLC metoda:**

0–30 minuta – gradient od 30% do 80% acetonitrila

30–33 minuta – gradient od 80% do 90% acetonitrila

Določevanje tališč

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

Jedrska magnetna resonanca (NMR)

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

Masna spektrometrija (MS)

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

Infrardeča spektroskopija (IR) z ATR tehniko

IR spektri so bili posneti na spektrometru Thermo Nicolet, model Nexus z orodjem SMART DuraSamplIR, na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani.

Optična sučnost

Optično sučnost spojin smo izmerili s polarimetrom Perkin-Elmer 241 MC pri valovnih dolžinah 589 in 546 nm v kiveti dolžine 1 dm na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani.

Nomenklatura in risanje spojin

Za poimenovanje in risanje spojin smo uporabili program ChemDraw Ultra 12.0 proizvajalca CambridgeSoft.

Testiranje spojin na celični liniji Ramos-Blue™

Na Katedri za klinično biokemijo so biološko ovrednotili spojine **15-20**. Na celični liniji Ramos-Blue™ so ugotavljali njihovo morebitno agonistično delovanje. Izbrana linija celic Ramos-Blue™ izvira iz človeškega Burkitt-ovega limfoma (tumor limfatičnega sistema, predvsem limfocitov B) in se rutinsko uporablja kot model za študije limfocitov B. Celice izražajo številne receptorje PRR, med njimi tudi NOD1. Agonistično delovanje testiranih spojin na NOD1 temelji na sposobnosti te celične linije, da ob prisotnosti NF-κB, ki ga v celicah inducirajo NOD1 agonisti, stabilno izraža in izloča encim zarodno alkalno fosfatazo SEAP (angl. "secreted embryonic alkaline phosphatase") v supernatant. Dodani reagent QUANTI-Blue™ v prisotnosti tega encima spremeni barvo (rožnata → modrovijolična). Spektrofotometrično določena koncentracija encima SEAP nam tako posredno poda aktivnost NF-κB. Kot pozitivno kontrolo so v poskusu uporabili C₁₂-iE-DAP (referenčni standard). Negativna kontrola je vsebovala samo reagente brez agonistov.

180 µL suspenzije celic Ramos-Blue™ (~ 400.000 celic) smo dodali 20 µL 1 µM raztopine naših spojin (**15-20**) oz. 1 µM raztopine C₁₂-iE-DAP, pri čemer smo kot topilo uporabili gojitveni medij. Pri negativni kontroli smo suspenziji celic dodali le gojitveni medij. Celice smo nato inkubirali skupaj z ustreznimi slepimi vzorci 18 ur pri 37 °C v 5% atmosferi CO₂. Po končani inkubaciji smo v supernatantu celic z reagentom QUANTI-Blue™ spektrofotometrično izmerili količino izločene zarodne alkalne fosfataze (angl. »secreted embryonic alkaline phosphatase« – SEAP). Absorbanco vzorcev smo izmerili pri 655 nm po 30 minutni inkubaciji v mediju za analizo.

Določanje inhibitorne aktivnosti spojin na ligazah MurE in MurF

Inhibitorno aktivnost spojin na ligazah MurE in MurF so s kolorimetrično metodo z malahitno zelenim določili na Katedri za farmacevtsko kemijo. Test temelji na spektrofotometrični določitvi množine fosfata, ki nastane pri reakciji tvorbe peptidne vezi v prisotnosti ATP, ki jo katalizirata encima MurE in MurF. Pri tem molekula ATP razpade na ADP in fosfat. Ob dodatku reagenta Biomol Green™ (malahitno zelenim z dodanim amonijevim molibdatom) nastane med barvilom in fosfatom zeleno obarvan kompleks, ki ga spektrofotometrično določimo pri valovni dolžini 650 nm. Ker se katalitična aktivnost encimov ob dodatku zaviralca zmanjša, se tudi količina nastalega fosfata v primerjavi z negativno kontrolo (brez zaviralca) zniža. Učinkovitost zaviralca izrazimo z rezidualno

aktivnostjo (RA), ki nam pove razmerje med aktivnostjo encima v prisotnosti zaviralca in aktivnostjo brez navzočnosti zaviralca. Najboljšim kandidatom so izmerili tudi vrednost IC_{50} , ki predstavlja jakost inhibicije (koncentracija testiranih spojin pri katerih znaša rezidualna aktivnost 50%).

Reakcijske zmesi (končni volumen 50 μ L) so vsebovale:

MurE: 50 mM Hepes, pH 8.0, 15 mM $MgCl_2$, 0.005% Triton X-114, 60 μ M mDAP, 100 μ M UMAG, 1000 μ M ATP, očiščen MurE in 500 μ M testirane spojine raztopljene v DMSO.

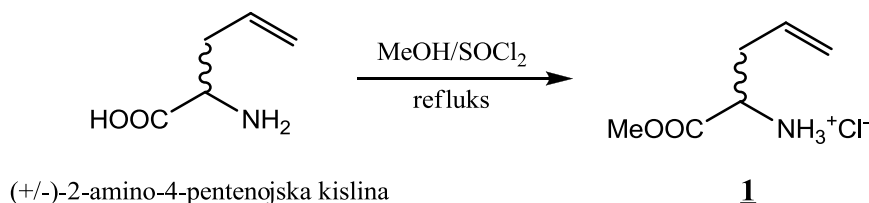
MurF: 50 mM Hepes, pH 8.0, 50 mM $MgCl_2$, 0.005% Triton X-114, 600 μ M d-Ala-d-Ala, 100 μ M UMtri-mDAP, 500 μ M ATP, očiščen MurF in 500 μ M testirane spojine raztopljene v DMSO.

Koncentracija DMSO ni v nobenem primeru presegala 5% (v/v). Reakcijske zmesi smo inkubirali 15 min pri 37 °C. Nato smo dodali 100 μ L reagenta Biomol GreenTM in po 5 min izmerili absorbance pri $\lambda = 650$ nm. Vsak preizkus je bil pripravljen z dvojno ponovitvijo. Rezidualna aktivnost je bila določena glede na primerjavo s podobnim testom, ki je vseboval 5% DMSO brez testiranih spojin. IC_{50} vrednosti testnih spojin so bile določene z merjenjem RA pri sedmih različnih koncentracijah.

4. EKSPERIMENTALNI DEL

4.1. SINTEZA (+/-)-1-METOKSI-1-OKSOPENT-4-EN-2-AMINIJEVEGA KLORIDA (**1**)

Kemijska reakcija:



Izvedba sinteze: V 50 ml bučko smo natehtali (+/-)-2-amino-4-pentenojsko kislino (1,151 g, 10 mmol) in jo raztopili v 15 ml MeOH. Raztopino smo mešali 20 min na ledeni kopeli in ji nato po kapljicah dodali tionil klorid (0,8 ml, 11 mmol). Reakcijo smo nato ob stalnem mešanju na sobni temperaturi pustili teči 1 uro. Bučko smo potem prestavili na oljno kopel in jo segrevali pod refluksom topila (70 °C) preko noči. Potek reakcije smo v naključnih časovnih točkah spremljali s TLC in jo prekinili po 24 urah, ko je zreagirala vsa izhodna spojina. Kot reagent za oroševanje smo uporabili ninhidrin.

Izolacija: Reakcijski zmesi smo pod znižanim tlakom odparili topilo in preostanek nekajkrat sprali z dietiletrom ter tako dobili 1,655 g produkta.

FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE:

Izgled: brezbarven oljnat produkt (viskozna tekočina)

Izkoristek: 100 % ($m_{\text{exp}} = 1,655\text{g}$)

R_f (CH₃CN:MeOH:H₂O = 3:1:1) = 0,80

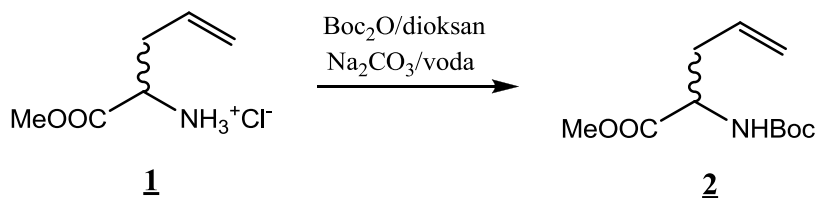
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 2,60 (t, 2H, $J = 6,6$ Hz, CH₂), 3,74 (s, 3H, OCH₃), 4,13 (br s, 1H, CH), 5,15-5,22 (m, 2H, CH₂=CH), 5,73-5,84 (m, 1H, CH), 8,67 (br s, 3H, NH₃⁺)

MS (ESI): $m/z = 130,1$ (M-Cl)⁺, Mr (izrač.) = 165,58

HR-MS (C₆H₁₂NO₂) = 130,0865 (M-Cl)⁻, izračunana 130,0868

4.2. SINTEZA METIL 2-(*TERC*-BUTOKSIKARBONILAMINO)PENT-4-ENOATA (2)

Kemijska reakcija:



Izvedba sinteze: Spojino **1** (1,655 g, 10 mmol) smo raztopili v 10 ml dioksana in 10 ml vode ter raztopino ohladili na ledeni kopeli. Počasi smo dodali 2,5 eq Na_2CO_3 (2,650 g, 25 mmol) in zmes mešali 15 min. Nato smo po kapljicah v reakcijsko zmes dodali 1,1 eq Boc_2O (2,403 g, 11 mmol) raztopljenega v 10 ml dioksana in pustili reakcijo teči pri sobni temperaturi. Reakcijo smo spremljali s TLC in jo prekinili po 24 urah, ko v reakcijski zmesi nismo več zaznali izhodne spojine.

Izolacija: Reakcijsko zmes smo razredčili s 30 ml vode. Vodno fazo smo ekstrahirali z dietiletrom (3×60 ml) in nato združene frakcije organske faze sprali še s kislo vodno raztopino HCl (pH 2-3). Organsko fazo smo posušili s spiranjem z nasičeno raztopino NaCl in dodatnim sušenjem nad Na_2SO_4 ter jo odparili do suhega pod znižanim tlakom in dobili 2,12 g produkta.

FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE:

Izgled: brezbarven oljnat produkt (viskozna tekočina)

Izkoristek: 93% ($m_{\text{exp}} = 2,12 \text{ g}$)

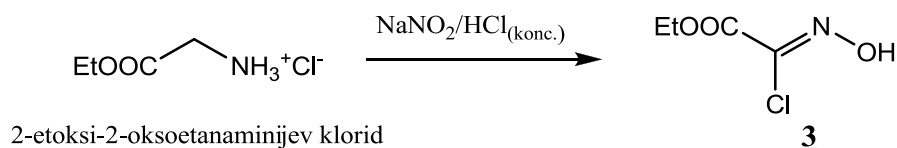
R_f (etilacetat) = 0,85

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 1,46 (s, 9H, Boc), 2,46-2,60 (m, 2H, CH_2), 3,76 (s, 3H, OCH_3), 4,38-4,43 (m, 1H, CH), 5,06 (d, 1H, $J = 5,2\text{Hz}$, NH), 5,13-5,17 (m, 2H, $=\text{CH}_2$), 5,66-5,76 (m, 1H, $\text{CH}=\text{}$)

MS (ESI): $m/z = 252,1$ ($\text{M}+\text{Na}^+$), M_r (izrač.) = 229,13

4.3. SINTEZA (Z)-ETIL 2-KLORO-2-(HIDROKSIIMINO)ACETATA (**3**)

Kemijska reakcija:



Izvedba sinteze: 2-etoksi-2-oksoetanaminijev klorid (2,233 g, 16 mmol) smo natehtali v 50 ml bučko in ga raztopili v 10 ml vode ter dodali 1,4 ml koncentrirane HCl. Raztopino smo ohladili na -5 °C ter ji po kapljicah dodali vodno raztopino NaNO₂ (1,100 g, 16 mmol, 5ml vode). Po 10 min mešanju reakcijske zmesi na ledeni kopeli, smo dodali drugi ekvivalent vodne raztopine NaNO₂/HCl (1,100 g, 16 mmol, 5ml vode, 1,4 ml konc. HCl). Pred dodatkom tretjega ekvivalenta NaNO₂/HCl (1,100 g, 16 mmol, 5ml vode, 1,4 ml konc. HCl) smo pustili reakcijo potekati še 45 min. Reakcijo smo spremljali s TLC in jo prekinili po 60 min, ko v reakcijski zmesi nismo več zaznali izhodne spojine.

Izolacija: Reakcijsko zmes smo ekstrahirali z dietiletrom (3×30 ml) in organsko fazo sprali z nasičeno raztopino NaCl ter posušili nad Na₂SO₄. Organsko fazo smo odparili pod znižanim tlakom in dobili 1,963 g produkta.

FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE:

Izgled: bel prašek

Izkoristek: 81% (1,963 g)

R_f (CH₃CN:MeOH:H₂O = 3:1:1) = 0,89

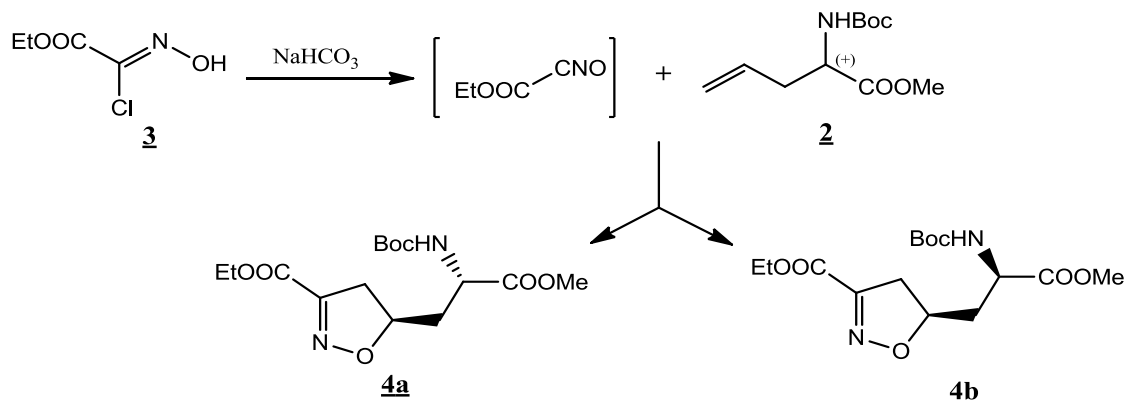
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1,42 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, CH₃CH₂), 4,43 (q, 2H, *J* = 7,2 Hz, CH₃CH₂), 9,47 (s, 1H, NOH)

MS (ESI): *m/z* = 153,1(M+H)⁺, Mr (izrač.) = 151,55

T_{tal} = 80 °C (lit. (33))

4.4. SINTEZA ETIL (R)-5-((S)-2-(*TERC*-BUTOKSIKARBONILAMINO)-3-METOKSI-3-OKSOPROPIL)-4,5-DIHIDROIZOKSAZOL-3-KARBOKSILATA (**4a**) IN ETIL (R)-5-((R)-2-(*TERC*-BUTOKSIKARBONILAMINO)-3-METOKSI-3-OKSOPROPIL)-4,5-DIHIDROIZOKSAZOL-3-KARBOKSILATA (**4b**)

Kemijska reakcija:



Izvedba sinteze: Spojino **2** (1,400 g, 6,15 mmol) smo natehtali v 50 ml bučko in jo raztopili v 20 ml etilacetata. Nato smo v reakcijsko zmes dodali 1,5 eq spojine **3** (1,395 g, 9,23 mmol) in NaHCO_3 (2,500 g, 29,76 mmol). Reakcijsko zmes smo pustili mešati pri sobni temperaturi. Potek reakcije smo spremljali v naključnih časovnih točkah s TLC in jo prekinili po 24 urah, ko v reakcijski zmesi nismo več zaznali izhodnih spojin.

Izolacija:

1. EKSTRAKCIJA

Reakcijski zmesi smo dodali 20 ml prečiščene vode in 20 ml etilacetata ter zmes dobro pretresli v liju ločniku. Organsko fazo smo nato ločili in jo posušili nad Na_2SO_4 . Topilo smo odparili pod znižanim tlakom.

2. FLASH KROMATOGRAFIJA (LPLC -angl. "low pressure liquid chromatography")

Dobljeni produkt smo raztopili v mobilni fazi in ga ločili s kolonsko kromatografijo pod zvišanim tlakom ter dobili 0,665 g surove spojine **4a** in 1,032 g surove spojine **4b**.

$m_{\text{silikagela}} = 187 \text{ g}$, $\Phi_{\text{silikagela}} = 40\text{-}60 \text{ }\mu\text{m}$, MF: PE/EA = 4:1

FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE:

Spojini **4a** in **4b** sta znani (36).

Izgled: **4a** brezbarvna viskozna tekočina, **4b** trdna bela ali skoraj bela kristalinična snov

Izkoristek: 80% (m (**4a**) = 0,665 g, m (**4b**) = 1,032 g)

R_f (PE:EA=2:1) = 0,39 (**4b**), 0,48 (**4a**)

T_{tal} (**4b**) = 94,5 °C (lit. (36))

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) (4a**):** δ (ppm) = 1,39 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, CH₃CH₂), 1,47 (s, 9H, Boc), 2,17-2,21 (m, 2H, CH₂), 2,94 (dd, 1H, *J*₁ = 9,6 Hz, *J*₂ = 8 Hz, izoksazolin-H_{4a}), 3,40 (dd, 1H, *J*₁ = 11,2 Hz, *J*₂ = 6,8 Hz, izoksazolin-H_{4b}), 3,80 (s, 3H, COOCH₃), 4,37 (q, 2H, *J* = 7,2 Hz, CH₃CH₂), 4,38-4,44 (m, 1H, CH), 4,91-4,99 (m, 1H, izoksazolin-H₅), 5,35 (d, 1H, *J* = 5,2 Hz, NH)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) (4b**):** δ (ppm) = 1,39 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, CH₃CH₂), 1,47 (s, 9H, Boc), 1,97-2,10 (m, 1H, CH₂CH), 2,23-2,30 (m, 1H, CH₂CH), 2,92 (dd, 1H, *J*₁ = 8,0 Hz, *J*₂ = 9,6 Hz, izoksazolin-H_{4a}), 3,37 (dd, 1H, *J*₁ = 10,8 Hz, *J*₂ = 6,8 Hz, izoksazolin-H_{4b}), 3,79 (s, 3H, COOCH₃), 4,37 (q, 2H, *J* = 7,2 Hz, CH₃CH₂), 4,44-4,54 (m, 1H, CH), 4,90-4,98 (m, 1H, izoksazolin-H₅), 5,33 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz, NH)

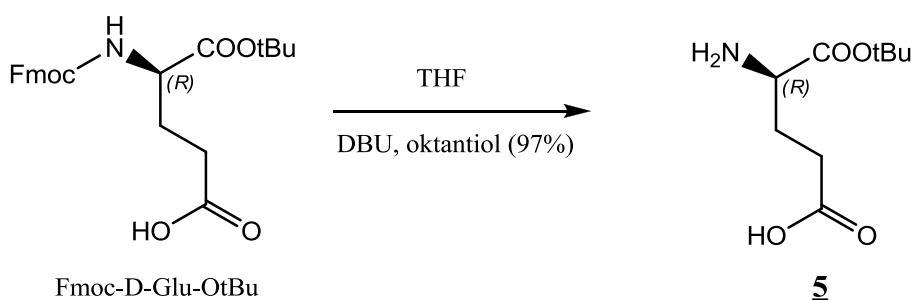
MS (ESI) (4a**):** *m/z* = 345,2 (M+H)⁺, Mr (izrač.) = 344,36 in (**4b**): *m/z* = 345,2 (M+H)⁺, Mr (izrač.) = 344,36

HR-MS (4a**)** (C₁₅H₂₅N₂O₇) = 345,1670 (M+H)⁺, izračunana 345,1662 in

(**4b**) (C₁₅H₂₅N₂O₇) = 345,1661 (M+H)⁺, izračunana 345,1662

4.5. SINTEZA (4R)-4-AMINO-5-TERC-BUTOKSI-5-OKSOPENTANOJSKE KISLINE (**5**)

Kemijska reakcija:



Izvedba sinteze: Spojino Fmoc-D-Glu-OtBu (0,600 g, 1,41 mmol) smo natehtali v 25 ml bučko in jo raztopili v 13 ml THF. Raztopini smo nato dodali 10 eq 1-oktantiola (2,531 ml, 14,1 mmol; 97% reagent) in 0,4 eq DBU (86,4 μ l, 0,56 mmol). Zmes smo pustili mešati na sobni temperaturi. Potek reakcije smo v naključnih časovnih točkah spremljali s TLC in reakcijo prekinili po 16 urah, ko nismo v reakcijski zmesi več zaznali izhodne spojine.

Izolacija: Reakcijsko zmes smo odparili do suhega pod znižanim tlakom in preostanek nekajkrat sprali z dietiletrom. Izpadlo oborino smo na koncu sprali z dietileter/heksan = 1:2 in dobili 95 mg produkta.

FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE:

Izgled: prašek bele barve, **Izkoristek:** 99% (m = 95 mg)

T_{tal} = 114-116 °C

R_f (CH₃CN:MeOH:H₂O = 3:1:1) = 0,49

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 1,42 (s, 9H, OtBu), 1,57-1,63 (m, 1H, CH_{2a}CH), 1,77-1,82 (m, 1H, CH_{2b}CH), 2,27 (t, 2H, CH₂COOH), 3,23-3,27 (m, 1H, CH)

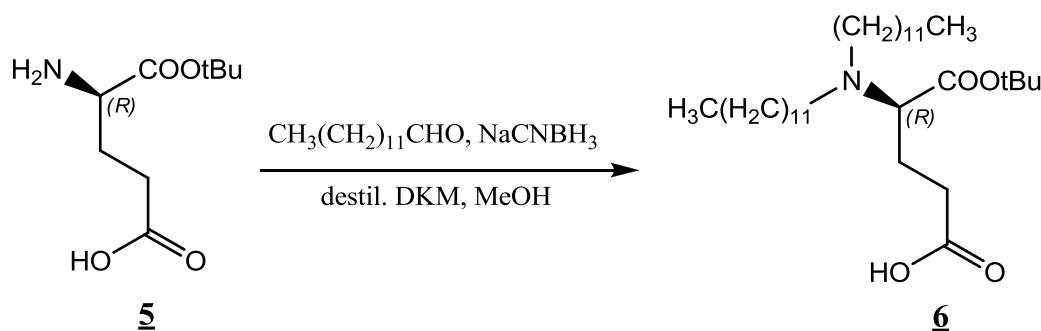
Op. Na spektru ni signalov za COOH in NH₂, ker so se izmenjali s topilom.

MS (ESI): m/z = 204,1 (M+H)⁺, Mr (izrač.) = 203,24

HR-MS (C₉H₁₈NO₄) = 204,1232 (M+H)⁺, izračunana 204,1236

4.6. SINTEZA (4R)-5-TERC-BUTOKSI-4-(DIDODECILAMINO)-5-OKSOPENTANOJSKE KISLINE (**6**)

Kemijska reakcija:



Izvedba sinteze: Spojino 5 (0,186 g, 0,92 mmol) smo raztopili v 20 ml destiliranega DKM in 10 ml MeOH. Zmesi smo nato dodali 2,4 eq (0,440 g, 2,20 mmol) dodecil aldehida, katalitično množino očetne kisline (3 eq, 2,76 mmol, 158 μ l) in 2,4 eq (0,145 g, 2,2 mmol) NaCNBH₃. Reakcijo smo pustili potekati na sobni temperaturi in jo prekinili po 18 urah. Čas sinteze smo določili na podlagi predhodnega diplomskega dela, saj je ta spojina znana (48).

Izolacija: FLASH KROMATOGRAFIJA

Topilo reakcijske zmesi smo odparili pod znižanim tlakom. Suhi preostanek smo nato raztopili v etilacetatu in dodatku nekaj kapljic MeOH, ga očistili s kolonsko kromatografijo in tako dobili 0,187 g produkta.

$m_{\text{silikagela}} = 67 \text{ g}$, $\Phi_{\text{silikagela}} = 40\text{-}60 \text{ }\mu\text{m}$, MF: HE/EA = 4:1+ 0,5% trietilamina

FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE:

Izgled: brezbarven oljnat produkt (viskozna tekočina), **Izkoristek:** 41% ($m = 187 \text{ mg}$)

R_f (HE/EA = 1:1) = 0,51

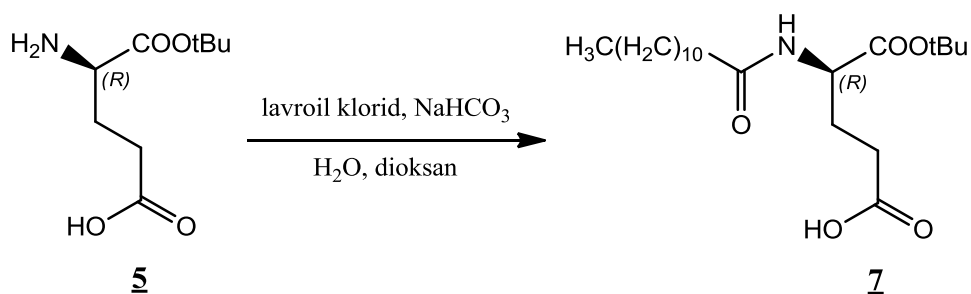
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 0,84-0,87 (m, 6H, 2 $\times$ CH₂CH₃), 1,22-1,27 (m, 40H, 2 $\times$ (CH₂)₁₀CH₃), 1,41 (s, 9H, OtBu), 1,62-1,66 (m, 1H, CH_{2a}CH), 1,72-1,77 (m, 1H, CH_{2b}CH), 2,17-2,43 (m, 6H, CH₂COOH, 2 $\times$ CH₂N), 3,18-3,22 (m, 1H, CH), 12,03 (s, 1H, COOH)

MS (ESI): $m/z = 540,5$ (M+H)⁺, M_r (izrač.) = 539,87

HR-MS (C₃₃H₆₆NO₄) = 540,5001 (M+H)⁺, izračunana 540,4992

4.7. SINTEZA (4R)-5-TERC-BUTOKSI-DODEKANAMIDO-5-OKSOPENTANOJSKE KISLINE (7)

Kemijska reakcija:



Izvedba sinteze: Spojino 5 (0,057 g, 0,28 mmol) smo raztopili v 1 ml dioksana in mu dodali 1,5 eq NaHCO_3 (0,035 g, 0,42 mmol) raztopljenega v 1,5 ml vode. Reakcijsko zmes smo ohladili na ledeni kopeli (0 °C) in ji po kapljicah dodali lavroil klorid (0,058 g, 0,27 mmol) raztopljen v 1 ml dioksana. Reakcijo smo pustili potekati na sobni temperaturi in jo prekinili po 100 minutah. Čas sinteze smo določili na podlagi predhodnega diplomskega dela, saj je ta spojina znana (49).

Izolacija: Reakcijsko zmes smo z NaHCO_3 uravnali do pH~ 9-10. Nato smo dodali 5 ml dietiletra in zmes dobro premešali v liju ločniku. Vodno fazo smo nato ločili, jo ohladili na ledeni kopeli ter ji previdno uravnali pH na 2. Nato smo naredili ekstrakcijo s 3×20 ml etilacetata. Združene organske faze smo posušili z nasičeno raztopino NaCl in nad Na_2SO_4 . Etilacetat smo nato odparili pod znižanim tlakom in dobili 0,067 g produkta.

FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE:

Izgled: bela trdna snov, **Izkoristek:** 62% (m = 67 mg), $T_{\text{tal}} = 44\text{-}45\text{ }^\circ\text{C}$

Rf ($\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O} = 3:1:1$) = 0,81

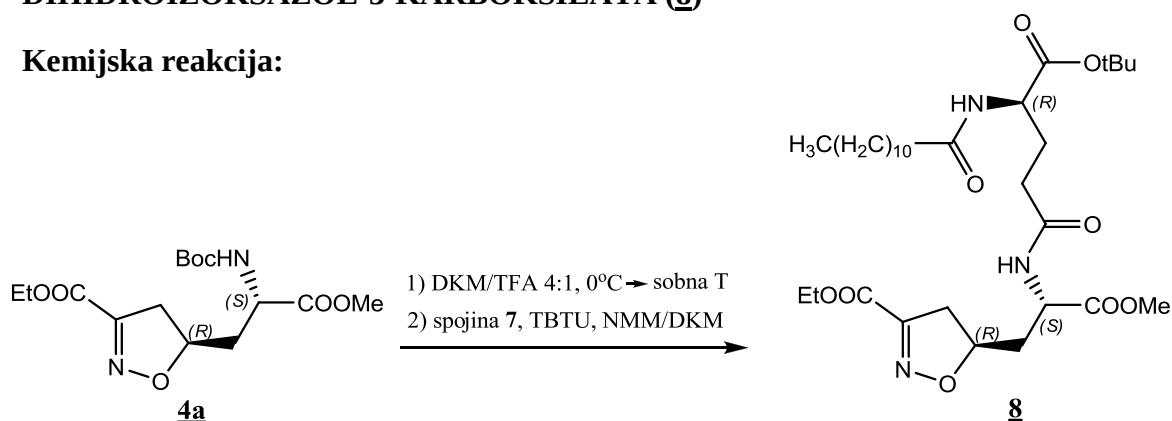
^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 0,86 (t, 3H, $J = 5,8$ Hz, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}$), 1,23-1,25 (m, 16H, $(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$), 1,40 (s, 9H, OtBu), 1,48 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8$), 1,69-1,78 (m, 1H, NHCHCH_{2a}), 1,86-1,95 (m, 1H, NHCHCH_{2b}), 2,10 (t, 2H, $J = 6,8$ Hz, COCH_2), 2,25 (t, 2H, $J = 5,6$ Hz, CH_2COOH), 4,09-4,14 (m, 1H, CH), 8,06 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, NH), 12,15 (bs, 1H, COOH)

MS (ESI): $m/z = 386,3$ ($\text{M}+\text{H}^+$), M_r (izrač.) = 385,54

HR-MS ($\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{NO}_5$) = 386,2903($\text{M}+\text{H}^+$), izračunana 386,2906

4.8. SINTEZA ETIL (R)-5-((S)-2-((R)-5-TERC-BUTOKSI-4-DODEKANAMIDO-5-OKSOPENTANAMIDO)-3-METOKSI-3-OKSOPROPIL)-4,5-DIHIDROIZOKSAZOL-3-KARBOKSILATA (8)

Kemijska reakcija:



Izvedba sinteze:

- 1) Spojino **4a** (0,069 g, 0,20 mmol) smo natehtali v 25 ml bučko in jo raztopili v 4 ml diklorometana (DKM). Raztopino smo ohladili na ledeni kopeli (0 °C) in ji po kapljicah dodali 1 ml trifluoroocetne kisline (TFA). Reakcijo smo pustili potekati na sobni temperaturi in jo prekinili po 3 urah. Reakcijski zmesi smo nato pod znižanim tlakom odparili topilo. Dobljeni suhi preostanek smo nekajkrat sprali z dietiletrom in ga nato raztopili v 2-3 ml DKM ter mu dodali 2 eq (44,5 μ l, 0,40 mmol) N-metilmorfolina (NMM).
- 2) V drugo 5 ml bučko smo natehtali spojino **7** (0,077 g, 0,20 mmol) in jo raztopili v 2 ml DKM. Nato smo raztopini dodali še 1,1 eq (0,073 g, 0,22 mmol) O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronijevegatetrafluoroborata (TBTU) in 2 eq NMM (44,5 μ l, 0,40 mmol).
- 3) Vsebini obeh bučk smo nato združili in pustili reakcijo potekati na sobni temperaturi. Nastajanje produkta smo nato spremljali s TLC in reakcijo prekinili po 4 dneh, ko v reakcijski zmesi nismo več zaznali izhodnih spojin.

Izolacija: Reakcijski zmesi smo dodali 40-50 ml DKM in organsko fazo spirali z vodno raztopino 1M HCl 2 $\times$ 20 ml. Ločeno organsko fazo smo nato sprali z 20 ml prečiščene vode. Ponovno smo ločili organsko fazo ter jo spirali še z dodatkom bazične vodne raztopine (NaHCO₃) 2 $\times$ 20 ml. Organsko fazo smo nato še zadnjič sprali z 20 ml prečiščene vode in jo posušili z nasičeno raztopino NaCl ter dodatkom Na₂SO₄. Topilo smo pod znižanim tlakom odparili in tako dobili 0,122 g produkta.

FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE:

Izgled: brezbarven oljnat produkt (viskozna tekočina)

Izkoristek: 100% (122 mg)

R_f (EA) = 0,58

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 0,90 (t, 3H, J = 6,8 Hz, CH₃(CH₂)₁₀CO), 1,18-1,21 (m, 18H, CH₃(CH₂)₉CH₂CO), 1,39 (t, 3H, J = 6,8 Hz, CH₃CH₂O), 1,47 (s, 9H, OtBu), 1,83-1,93 (m, 1H, CH-CH_{2a}), 2,17-2,30 (m, 5H, CH-CH_{2b} in CH₂CO in izoksazolin-CH₂-CH), 2,31-2,40 (m, 2H, CH₂CO), 2,94 (dd, 1H, J_1 = 9,6 Hz, J_2 = 8,0 Hz, izoksazolin-H_{4a}),

3,40 (m, 1H, izoksazolin-H_{4b}), 3,80 (s, 3H, COOCH₃), 4,37 (q, 2H, $J = 7,2$ Hz, CH₃CH₂O), 4,59-4,71 (m, 2H, 2×CH), 4,91-4,99 (m, 1H, izoksazolin-H₅), 6,28-6,35 (m, 2H, NH)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 14.1, 22.7, 25.7, 28.0, 29.1, 29.3, 29.4, 29.5, 29.6, 29.7, 31.9, 32.4, 32.5, 36.7, 37.2, 37.4, 39.1, 39.2, 49.9, 52.0, 52.8, 62.2, 80.5, 82.7, 151.5, 160.5, 171.3, 171.8, 172.2, 172.5, 173.8

MS (ESI): $m/z = 612,4$ ($M+H$)⁺, M_r (izrač.) = 611,77

HR-MS (C₃₁H₅₄N₃O₉) = 612,3863 ($M+H$)⁺, izračunana 612,3860

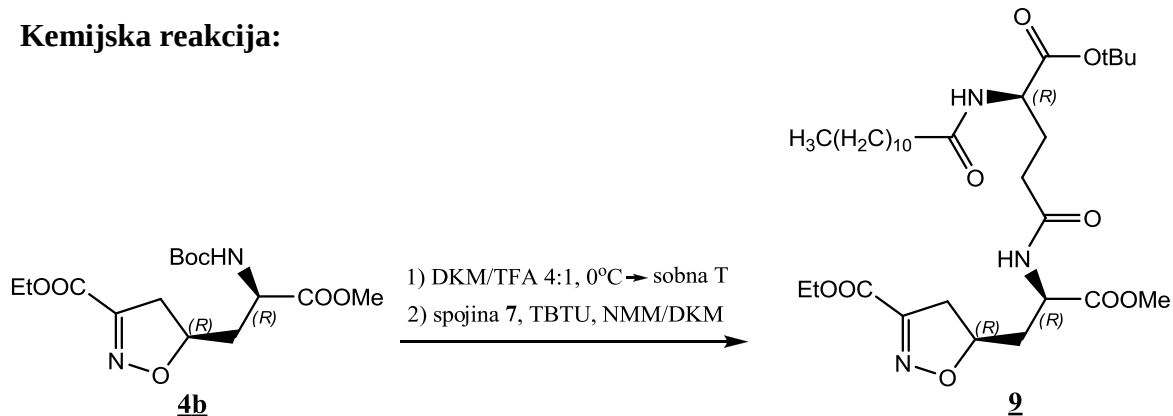
IR (ATR, cm⁻¹): 587, 650, 748, 850, 930, 1016, 1130, 1158, 1254, 1348, 1369, 1439, 1531, 1589, 1646, 1723, 2853, 2924, 3331

$[\alpha]_{D, 23}$ = -10,0° ($c = 0,08$, CH₂Cl₂)

HPLC: $t_R = 31,167$ min, 100% ($\lambda = 215$ nm)

4.9. SINTEZA ETIL (R)-5-((R)-2-((R)-5-TERC-BUTOKSI-4-DODEKANAMIDO-5-OKSOPENTANAMIDO)-3-METOKSI-3-OKSOPROPIL)-4,5-DIHIDROIZOKSAZOL-3-KARBOKSILATA (**9**)

Kemijska reakcija:



Izvedba sinteze:

- 1) Spojino **4b** (0,069 g, 0,20 mmol) smo natehtali v 25 ml bučko in jo raztopili v 4 ml DKM. Raztopino smo ohladili na ledeni kopeli (0 °C) in ji po kapljicah dodali 1 ml TFA. Reakcijo smo pustili teči na sobni temperaturi in jo prekinili po 3 urah. Reakcijski zmesi smo nato pod znižanim tlakom odparili topilo. Suhi preostanek smo nekajkrat sprali z dietiletrom in ga nato raztopili v 2-3 ml DKM ter mu dodali 2 eq NMM (44,5 μ l, 0,40 mmol).

- 2) V drugo 5 ml bučko smo natehtali spojino **7** (0,077 g, 0,20 mmol) in jo raztopili v 2 ml DKM. Nato smo raztopini dodali še 1,1 eq (0,073 g, 0,22 mmol) TBTU in 2 eq NMM (44,5 μ l, 0,40 mmol).
- 3) Vsebini obeh bučk smo združili in pustili reakcijo potekati na sobni temperaturi. Nastajanje produkta smo nato spremljali s TLC in reakcijo prekinili po 24 urah. Čas sinteze smo določili na podlagi predhodnega diplomskega dela.

Izolacija: Reakcijski zmesi smo dodali 40-50 ml DKM in naredili ekstrakcijo z 2 $\times$ 20 ml 1M vodne raztopine HCl. Ločeno organsko fazo smo sprali z 20 ml prečiščene vode ter jo nato posušili z nasičeno raztopino NaCl in dodatkom Na₂SO₄. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom in tako dobili 0,070 g produkta.

FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE:

Izgled: brezbarvna viskozna tekočina, **Izkoristek:** 57% ($m_{\text{exp}} = 70$ mg), **Rf** (EA) = 0,51

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 0,88 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, CH₃(CH₂)₁₀CO), 1,26-1,30 (m, 16H, CH₃(CH₂)₈CH₂CO), 1,37 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, CH₃CH₂O), 1,47 (s, 9H, OtBu), 1,67 (m, 2H, CH₃(CH₂)₈CH₂CH₂), 1,80-1,92 (m, 1H, CH-CH_{2a}), 2,12-2,33 (m, 7H, CH-CH_{2b}, 2 $\times$ CH₂CO in izoksazolin-CH₂-CH), 2,91 (ddd, 1H, izoksazolin-H_{4a}), 3,34 (dd, 1H, $J_1 = 11,2$ Hz, $J_2 = 6,4$ Hz, izoksazolin-H_{4b}), 3,77 (s, 3H, COOCH₃), 4,35 (q, 2H, $J = 7,2$ Hz, CH₃CH₂O), 4,54-4,65 in 4,67-4,80 (m, 2H, 2 $\times$ CH), 4,89-4,97 (m, 1H, izoksazolin-H₅), 6,30-6,36 (m, 1H, NH), 7,03 in 7,49 (2d, 1H, $J = 7,6$ Hz, NH)

Op. Na spektru je prišlo do podvajanja signala za NH, verjetno zaradi delne racemizacije spojine **7**.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 14.1, 22.7, 25.6, 25.7, 28.0, 29.1, 29.4, 29.5, 29.6, 29.7, 31.9, 32.5, 36.7, 37.0, 37.1, 39.1, 39.2, 50.0, 50.2, 52.0, 52.1, 52.6, 52.7, 62.2, 80.6, 80.7, 82.7, 151.6, 160.5, 171.3, 171.8, 172.2, 172.5, 173.7, 173.9

MS (ESI): $m/z = 612,3(M+H)^+$, Mr (izrač.) = 611,77

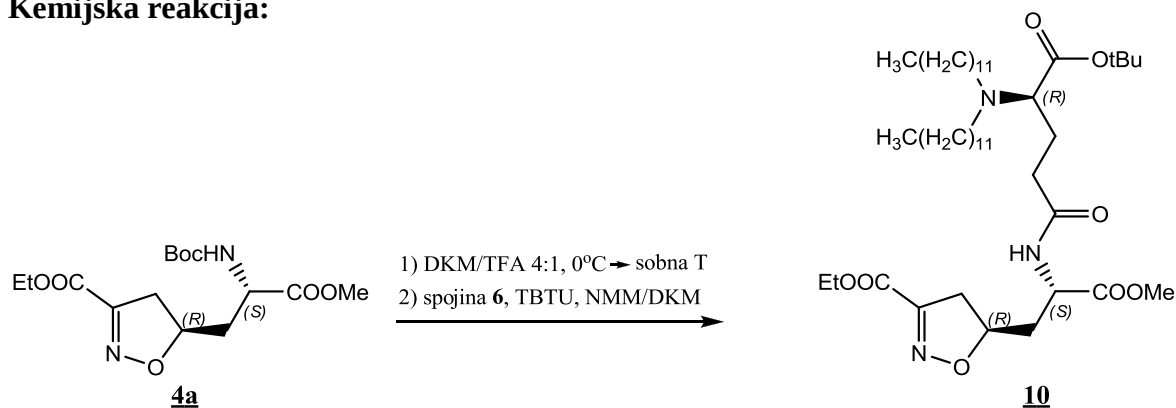
HR-MS (C₃₁H₅₄N₃O₉) = 612,3863 (M+H)⁺, izračunana 612,3860

IR (ATR, cm⁻¹): 574, 689, 748, 845, 930, 1016, 1125, 1160, 1255, 1346, 1370, 1436, 1536, 1591, 1647, 1724, 2853, 2923, 3313

$[\alpha]_{\text{D}, 23} = +5,7^\circ$ ($c = 0,07$, CH_2Cl_2), **HPLC**: $t_{\text{R}} = 30,986$ min, 100% ($\lambda = 215$ nm)

4.10. SINTEZA ETIL (R)-5-((S)-2-((R)-5-TERC-BUTOKSI-4-(DIDODECILAMINO)-5-OKSOPENTANAMIDO)-3-METOKSI-3-OKSOPROPIL)-4,5-DIHIDROIZOKSAZOL-3-KARBOKSILATA (**10**)

Kemijska reakcija:



Izvedba sinteze:

- 1) Spojino **4a** (0,043 g, 0,125 mmol) smo natehtali v 25 ml bučko in jo raztopili v 4 ml DKM. Raztopino smo ohladili na ledeni kopeli (0°C) in ji po kapljicah dokapavali 1 ml TFA. Reakcijo smo pustili teči na sobni temperaturi in jo prekinili po 2 urah. Reakcijski zmesi smo odparili topilo pod znižanim tlakom. Suhi preostanek smo nekajkrat sprali z dietiletrom ter ga nato raztopili v 2-3 ml DKM in mu dodali 2 eq NMM (28 μl , 0,25 mmol).
- 2) V drugo 5 ml bučko smo natehtali spojino **6** (0,068 g, 0,125 mmol) in jo raztopili v 2 ml DKM. Nato smo raztopini dodali še 1,1 eq (0,044 g, 0,14 mmol) TBTU in 2 eq NMM (28 μl , 0,25 mmol).
- 3) Vsebinsi obeh bučk smo združili in pustili reakcijo potekati na sobni temperaturi. Nastajanje produkta smo nato spremljali s TLC in reakcijo prekinili po 5 dneh, ko v reakcijski zmesi nismo več zaznali izhodnih spojin.

Izolacija:

- 1) **Ekstrakcija tekoče-tekoče:** Reakcijski zmesi smo dodali 40-50 ml DKM in spirali z 2×20 ml vodne raztopine NaHCO₃. Ločeno organsko fazo smo sprali z 20 ml prečiščene vode ter jo nato sušili z nasičeno raztopino NaCl in dodatkom Na₂SO₄. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom.
- 2) **Flash kromatografija:** Suhi preostanek smo raztopili v majhni količini etilacetata in ga očistili s kolonsko kromatografijo ter tako dobili 0,045 g produkta.

m_{silikagela} = 15 g, Φ_{silikagela} = 40-60 μm, MF: PE/EA = 2,5:1

FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE:

Izgled: brezbarvna viskozna tekočina, **Izkoristek:** 47% (45 mg)

R_f (PE/EA = 2,5:1) = 0,24

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 0,89 (t, 9H, *J* = 7,2 Hz, 2×CH₃CH₂-), 1,24-1,27 (m, 40H, 2× CH₃(CH₂)₁₀CH₂), 1,38 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, CH₃CH₂O), 1,45 (s, 9H, OtBu), 1,56-1,65 (m, 2H, CH₂), 1,81-2,08 (m, 2H, CH₂CH), 2,15-2,97 (m, 8H, CH₂CO, 2×CH₂N in izoksazolin-CH₂-CH), 3,24 (dd, 1H, *J*₁ = 6,4 Hz, *J*₂ = 2,4 Hz, izoksazolin-H_{4a}), 3,38 (dd, 1H, *J*₁ = 10,8 Hz, *J*₂ = 6,8 Hz, izoksazolin-H_{4b}), 3,79 (s, 3H, COOCH₃), 4,05-4,08 (m, 1H, CH), 4,36 (q, 2H, *J* = 7,2 Hz, CH₃CH₂O), 4,63-4,68 (m, 1H, CH), 4,84-4,93 (m, 1H, izoksazolin-H₅), 6,40-6,44 (m, 1H, NH)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 14.1, 22.7, 23.1, 23.6, 25.2, 25.3, 26.9, 27.0, 27.2, 27.4, 28.0, 28.2, 28.3, 29.0, 29.4, 29.6, 29.7, 31.9, 32.9, 33.0, 35.3, 37.5, 37.6, 39.2, 41.9, 49.8, 51.2, 51.6, 52.8, 60.6, 62.2, 62.8, 63.0, 64.6, 80.2, 80.3, 80.8, 82.2, 82.5, 151.5, 160.5, 169.2, 171.3, 171.9, 172.3, 172.9, 175.2

MS (ESI): *m/z* = 766,6 (M+H)⁺, *Mr* (izrač.) = 766,10

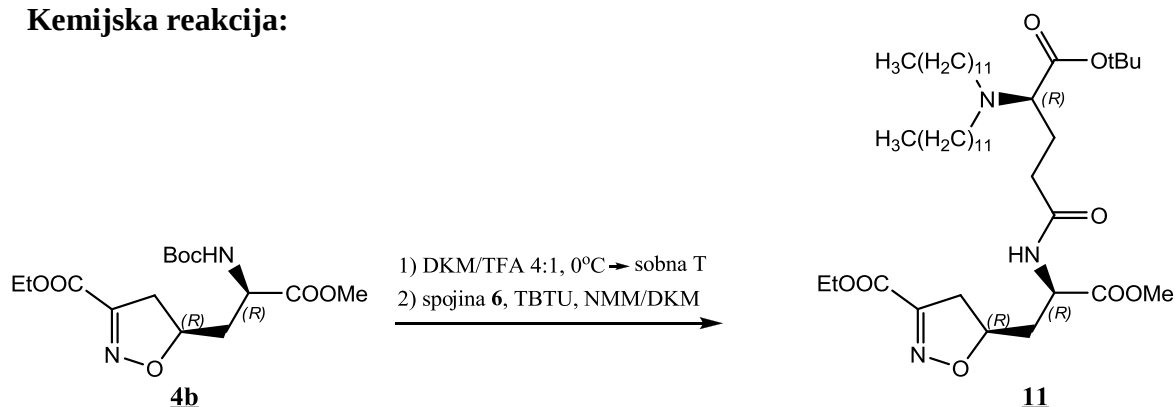
HR-MS (C₄₃H₈₀N₃O₈) = 766,5944 (M+H)⁺, izračunana 766,5945

IR (ATR, cm⁻¹): 722, 747, 849, 929, 1019, 1147, 1251, 1368, 1464, 1526, 1676, 1721, 2853, 2923

[α]_{D, 23} = +41,5° (*c* = 0,065, CH₂Cl₂)

4.11. SINTEZA ETIL (R)-5-((R)-2-((R)-5-TERC-BUTOKSI-4-(DIDODECILAMINO)-5-OKSOPENTANAMIDO)-3-METOKSI-3-OKSOPROPIL)-4,5-DIHIDROIZOKSAZOL-3-KARBOKSILATA (11)

Kemijska reakcija:



Izvedba sinteze:

- 1) Spojino **4b** (0,043 g, 0,125 mmol) smo natehtali v 25 ml bučko in jo raztopili v 4 ml DKM. Raztopino smo ohladili na ledeni kopeli (0 °C) in ji po kapljicah dodali 1 ml TFA. Reakcijo smo pustili teči na sobni temperaturi in jo prekinili po 1 uri. Reakcijski zmesi smo odparili topilo pod znižanim tlakom. Suhi preostanek smo nekajkrat spirali z dietiletrom ter ga nato raztopili v 2-3 ml DKM in mu dodali 2 eq NMM (28 µl, 0,25 mmol).
- 2) V drugo 5 ml bučko smo natehtali spojino **6** (0,068 g, 0,125 mmol) in jo raztopili v 2 ml DKM. Raztopini smo nato dodali še 1,1 eq (0,044 g, 0,14 mmol) TBTU in 2 eq NMM (28 µl, 0,25 mmol).
- 3) Vsebini obeh bučk smo združili in pustili reakcijo potekati na sobni temperaturi. Nastajanje produkta smo nato spremljali s TLC in reakcijo prekinili po 5 dneh, ko v reakcijski zmesi nismo več zaznali izhodnih spojin.

Izolacija:

- 1) **Ekstrakcija tekoče-tekoče:** Reakcijski zmesi smo dodali 40-50 ml DKM in spirali z 2×20 ml vodne raztopine NaHCO₃. Ločeno organsko fazo smo spirali še z 20 ml prečiščene vode ter jo nato sušili z nasičeno raztopino NaCl in dodatkom Na₂SO₄. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom.
- 2) **Flash kromatografija:** Suhi preostanek smo raztopili v majhni količini etilacetata in ga očistili s kolonsko kromatografijo ter tako dobili 0,057 g produkta.

FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE:

Izgled: brezbarvna viskozna tekočina, **Izkoristek:** 59% (57 mg)

Rf (HE/EA = 2,5:1) = 0,11

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 0,88 (t, 6H, J = 6,4 Hz, $2 \times \text{CH}_3\text{CH}_2-$), 1,24-1,26 (m, 40H, $2 \times \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2$), 1,36 (t, 3H, J = 7,2 Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 1,45 (s, 9H, OtBu), 1,53-1,60 (m, 2H, CH_2), 1,77-1,89 (m, 1H, CH_{2a}CH), 1,91-2,67 (m, 5H, CH_{2b}CH , CH_2CO in izoksazolin- CH_2 -CH), 2,72-2,95 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{N}$), 3,22-3,25 (m, 1H, izoksazolin- H_{4a}), 3,33 (dd, 1H, J_1 = 10,4 Hz, J_2 = 7,2 Hz, izoksazolin- H_{4b}), 3,77 (s, 3H, COOCH_3), 4,05 (d, 1H, J = 8,8 Hz, $\text{CH}(\text{NH})$), 4,36 (q, 2H, J = 6,8 Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 4,69-4,78 (m, 1H, CH), 4,84-4,94 (m, 1H, izoksazolin- H_5), 6,38-6,39 (m, 1H, NH)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 14.1, 22.7, 23.1, 23.5, 25.2, 26.7, 27.0, 27.2, 27.4, 28.0, 28.2, 28.3, 29.1, 29.4, 29.6, 29.7, 29.8, 31.9, 32.9, 35.6, 37.5, 39.2, 41.9, 50.0, 51.2, 51.7, 52.7, 60.7, 62.2, 62.9, 64.8, 80.8, 82.2, 82.7, 151.6, 160.5, 169.0, 171.3, 171.8, 172.3, 172.8, 174.8, 175.3

MS (ESI): m/z = 766,6 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, M_r (izrač.) = 766,10

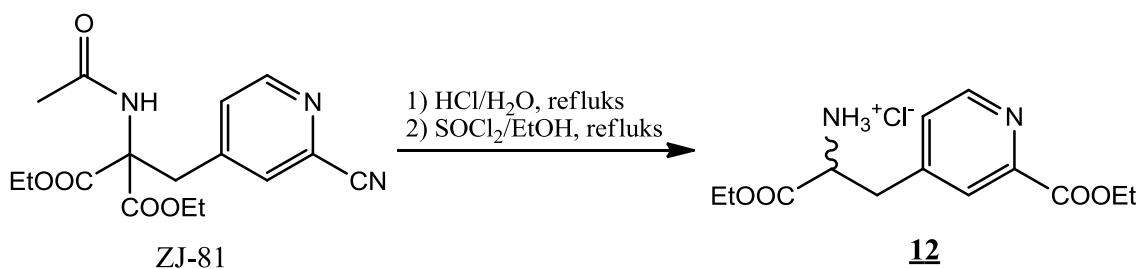
HR-MS ($\text{C}_{43}\text{H}_{80}\text{N}_3\text{O}_8$) = 766,5966 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, izračunana 766,5945

IR (ATR, cm⁻¹): 731, 847, 929, 1020, 1147, 1251, 1367, 1461, 1533, 1589, 1678, 1722, 2853, 2923

$[\alpha]_{\text{D}, 23}$ = +27,1 ° (c = 0,07, CH_2Cl_2)

4.12. SINTEZA 1-ETOKSI-3-(2-(ETOKSIKARBONIL)PIRIDIN-4-IL)-1-OKSOPROPAN-2-AMINJEVEGA KLORIDA (12)

Kemijska reakcija:

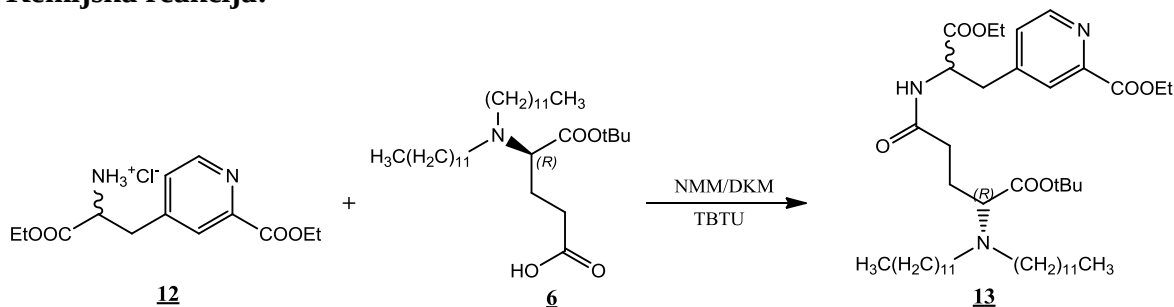


Izvedba sinteze: Spojino **ZJ-81** (0,110 g, 0,33 mmol) smo raztopili v 5ml 5-6 M HCl. Raztopino smo segrevali pod refluxom topila in njen potek spremljali s TLC. Reakcijo smo prekinili po 135 minutah. Topilo smo nato odparili pod znižanim tlakom. Izpadli suhi snovi smo dodali 5-6 ml EtOH, raztopino ohladili na 0° C in ji po kapljicah dodali 1,5 ml tionil klorida (2,46 g, 20,8 mmol). Raztopino smo odstavili z ledene kopeli in jo na oljni kopeli refluktirali do naslednjega dne.

Izolacija: Nastalo raztopino rjave barve smo nato sprali z dodatkom dietiletra, s katerim smo se znebili nezreagirane izhodnega produkta in tako dobili 0,088 g surove spojine **12** (izkoristek 88%). Surov produkt (fizikalno-kemijske analize so objavljene v lit. (32)) smo nato takoj uporabili v naslednji reakciji.

4.13. SINTEZA ETIL 4-(2-((R)-5-TERC-BUTOKSI-4-(DIDODECILAMINO)-5-OKSOPENTANAMIDO)-3-ETOKSI-3-OKSOPROPIL)PIKOLINATA (**13**)

Kemijska reakcija:



Izvedba sinteze: V bučko smo natehtali spojino **6** (0,089 g, 0,165 mmol) in jo raztopili v 2 ml DKM. Nato smo vanjo dodali 1,1 eq TBTU (0,058 g, 0,18 mmol) in 2 eq (37 μ l, 0,034 g, 0,33 mmol) NMM. Reakcijsko zmes smo mešali eno uro na sobni temperaturi.

V drugi bučki smo raztopili spojino **12** (0,050 g, 0,165 mmol) v 1 ml DKM in 5 μ l NMM (0,0046 g, 0,045 mmol). Tako pripravljeno raztopino smo nato dodali k aktivirani kislini v prvo bučko in pustili reakcijo potekati tri dni na sobni temperaturi.

Izolacija:

- 1) **Ekstrakcija tekoče-tekoče:** Reakcijski zmesi smo dodali 30 ml DKM in spirali z 2 $\times$ 20 ml vodne raztopine NaHCO₃. Nato smo organsko fazo sprali z 20 ml prečiščene vode ter jo sušili z nasičeno raztopino NaCl in dodatkom Na₂SO₄. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom.

2) **Flash kromatografija:** Suhi preostanek smo raztopili v majhni količini etilacetata in ga očistili s kolonsko kromatografijo ter tako dobili 0,061 g produkta.

$m_{\text{silikagela}} = 15 \text{ g}$, $\Phi_{\text{silikagela}} = 40\text{-}60 \text{ }\mu\text{m}$, MF: HE/EA = 2:1

FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE:

Izgled: viskozna tekočina rjave barve, **Izkoristek:** 47% (61 mg), **Rf** (HE/EA = 2:1) = 0,11

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 0,90 (t, 6H, $J = 6,8 \text{ Hz}$, $2 \times \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}$), 1,23-1,27 (m, 40H, $2 \times \text{CH}_2(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$), 1,30 (t, 6H, $J = 7,2 \text{ Hz}$, $2 \times \text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 1,45 (s, 9H, tBu), 1,80-2,03 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 2,22-2,39 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 2,43-2,49 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{N}$), 2,60-2,62 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{N}$), 3,18 (m, 2H, CH_2), 3,18-3,30 (m, 1H, CH), 4,17-4,26 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 4,50 (q, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 4,87-4,93 (m, 1H, HNCHCOOEt), 6,16 (t, 1H, Py-H), 7,30 (m, 1H, NHCO), 7,94 (s 1H, Py-H), 8,68 (d, 1H, $J = 4,8 \text{ Hz}$, Py-H)

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 14.1, 14.4, 22.7, 25.2, 25.3, 27.4, 28.3, 29.1, 29.4, 29.7, 31.9, 32.8, 33.0, 37.4, 37.5, 51.2, 52.5, 62.0, 62.8, 63.0, 80.8, 126.0, 127.7, 146.8, 148.4, 149.9, 165.1, 170.8, 170.9, 172.3, 172.5

MS (ESI): $m/z = 788,6 \text{ (M+H)}^+$, M_r (izrač.) = 788,15

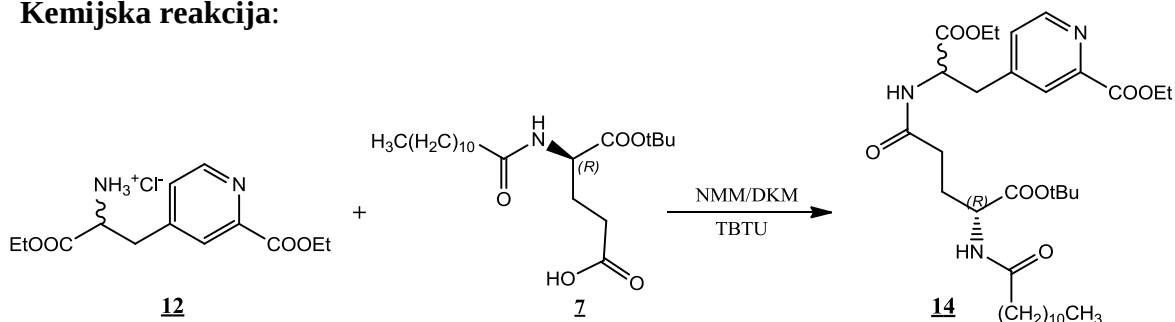
HR-MS ($\text{C}_{46}\text{H}_{82}\text{N}_3\text{O}_7$) = 788,6141 (M+H)^+ , izračunana 788,6153

IR (ATR, cm^{-1}): 645, 731, 784, 850, 918, 1025, 1147, 1204, 1251, 1300, 1367, 1464, 1529, 1602, 1676, 1722, 2853, 2923

$[\alpha]_{\text{D}, 23} = +41,8^\circ$ ($c = 0,055$, CH_2Cl_2)

4.14. SINTEZA ETIL 4-(2-((R)-5-TERC-BUTOKSI-4-DODEKANAMIDO-5-OKSOPENTANAMIDO)-3-ETOKSI-3-OKSOPROPIL)PIKOLINATA (14)

Kemijska reakcija:



Izvedba sinteze: V bučko smo natehtali spojino **7** (0,064 g, 0,165 mmol) in jo raztopili v 2 ml DKM. Raztopini smo dodali 1,1 eq (0,058 g, 0,18 mmol) sklopitvenega reagenta TBTU in 2 eq (37 μ l, 0,034 g, 0,33 mmol) NMM. Reakcijsko zmes smo mešali eno uro na sobni temperaturi. V drugi bučki smo raztopili spojino **12** (0,050 g, 0,165 mmol) v 1 ml DKM in 5 μ l NMM (0,0046 g, 0,045 mmol). Tako pripravljeno raztopino smo dodali k aktivirani kislini v prvo bučko in pustili reakcijo potekati 3 dni na sobni temperaturi.

Izolacija:

1) Ekstrakcija tekoče-tekoče: Reakcijski zmesi smo dodali 40-50 ml DKM in spirali z 2 $\times$ 20 ml 1M vodne raztopine HCl. Ločeno organsko fazo smo sprali z 20 ml prečiščene vode in jo ponovno spirali, tokrat z 2 $\times$ 20 ml vodne raztopine NaHCO₃. Organsko fazo smo nato sprali z 20 ml prečiščene vode ter jo sušili z nasičeno raztopino NaCl in dodatkom Na₂SO₄. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom.

2) Flash kromatografija: Suhi preostanek smo raztopili v majhni količini etilacetata in ga očistili s kolonsko kromatografijo. Zbranim frakcijam, ki so vsebovale želeni produkt, smo odparili topilo in dobili 0,024 g spojine **14**.

$m_{\text{silikagela}} = 15 \text{ g}$, $\Phi_{\text{silikagela}} = 40\text{-}60 \text{ }\mu\text{m}$, MF: HE/EA = 1:4

FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE:

Izgled: viskozna tekočina rjave barve, **Izkoristek:** 23% (24 mg), **Rf** (EA) = 0,27

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 0,88 (t, 3H, $J = 7,2 \text{ Hz}$, CH₃(CH₂)₁₀), 1,24-1,32 (m, 22H, CH₃(CH₂)₈CH₂ in 2 $\times$ CH₃CH₂O), 1,44 (s, 9H, OtBu), 1,63-1,65 (m, 2H, CH₂CH₂CONH), 1,77-1,87 (m, 1H, CH_{2a}CH₂), 2,07-2,38 (m, 5H, CH_{2b}CH₂ in 2 $\times$ CH₂CO) 3,13-3,20 in 3,25-3,32 (2m, 2H, Pyr-CH₂-), 4,20 (q, 2H, $J = 7,2 \text{ Hz}$, CH₃CH₂O), 4,31-4,35 (m, 1H, CH), 4,44-4,51 (m, 2H, CH₃CH₂O), 4,84-4,89 (m, 1H, HNCHCOOEt), 6,36 (dd, 1H, $J_1 = 15,2 \text{ Hz}$, $J_2 = 8,0 \text{ Hz}$, NH), 7,03 in 7,52 (2d, 1H (2 $\times$ 0,5), $J = 7,6 \text{ Hz}$, NH), 7,36 (d, 1H, $J = 4,8 \text{ Hz}$, Py-H), 7,99 (d, 1H, $J = 12,4 \text{ Hz}$, Py-H), 8,67 (d, 1H, $J = 4,8 \text{ Hz}$, Py-H)

Op. Na spektru je prišlo do podvajanja signala za NH, verjetno zaradi delne racemizacije spojine **7**.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 14.1, 14.3, 22.7, 25.6, 27.9, 29.3, 29.5, 29.6, 29.9, 31.9, 32.5, 36.7, 37.1, 38.6, 51.9, 52.0, 52.9, 61.8, 61.9, 62.0, 82.8, 126.0, 126.1,

127.7, 147.1, 147.2, 148.3, 149.9, 165.1, 165.2, 170.8, 171.0, 171.2, 171.4, 172.0, 172.3, 173.7, 173.9

MS (ESI): $m/z = 634,4$ ($M+H$)⁺, M_r (izrač.) = 633,82

HR-MS ($C_{34}H_{56}N_3O_8$) = 634,4078 ($M+H$)⁺, izračunana 634,4067

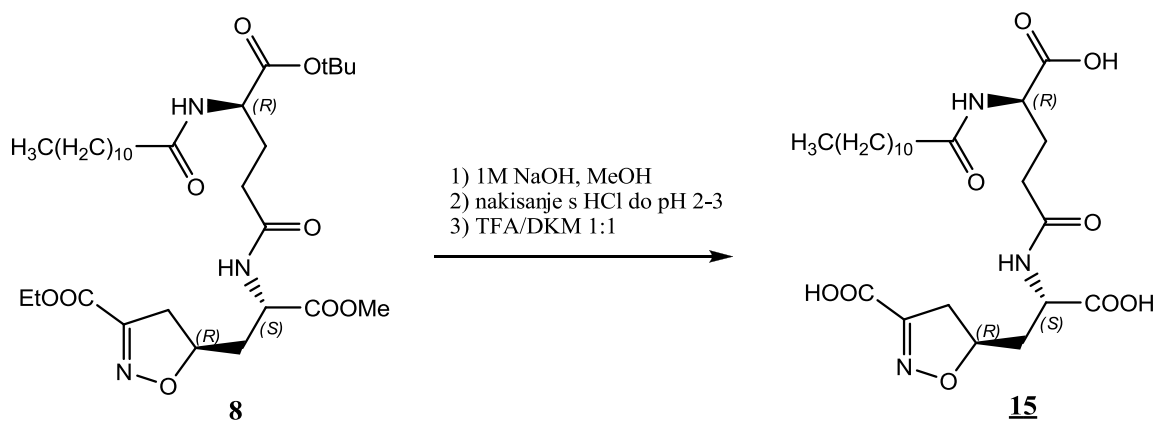
IR (ATR, cm^{-1}): 589, 655, 686, 730, 786, 851, 928, 995, 1029, 1064, 1128, 1157, 1209, 1246, 1300, 1367, 1458, 1538, 1605, 1644, 1727, 2854, 2923, 3301

$[\alpha]_D, 23$ = $-5,0^\circ$ ($c = 0,06$, CH_2Cl_2)

HPLC: $t_R = 30,174$ min, 100 % ($\lambda = 254$ nm)

4.15. SINTEZA (R)-5-((S)-2-KARBOKSI-2-((R)-4-KARBOKSI-4-DODEKANAMIDOBUTANAMIDO)ETIL)-4,5-DIHIDROIZOKSAZOL-3-KARBIKSILNE KISLINE (**15**)

Kemijska reakcija:



Izvedba sinteze: V bučko smo natehtali spojino **8** (0,090 g, 1,15 mmol) in jo raztopili v 3-4 ml MeOH. Nato smo v bučko s pipeto odmerili 6 eq 1M NaOH (885 μ l, 0,883 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali na sobni temperaturi in reakcijo prekinili po 70 minutah, ko v reakcijski zmesi nismo več zaznali izhodne spojine.

Izolacija: Reakcijski zmesi smo s HCl uravnali vrednost pH na 2 do 3. Nato smo vodno fazo ekstrahirali z 2×20 ml etilacetata. Združene organske faze smo sušili nad Na_2SO_4 in odparili topilo pod znižanim tlakom. Izpadli produkt smo raztopili v 2 ml DKM in reakcijsko zmes ohladili na ledeni kopeli, ter ji po kapljicah dodali 2 ml TFA. Reakcijsko zmes smo nato mešali na sobni temperaturi in reakcijo prekinili po 24 urah. Reakcijsko zmes smo odparili do suhega in dobili 0,073 g produkta.

FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE:

Izgled: oljnat produkt svetlo rjave barve (viskozna tekočina), **Izkoristek:** 97% (73 mg)

Rf (CH₃CN:MeOH:H₂O = 3:1:1) = 0,56

¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄): δ (ppm) = 0,91 (t, 3H, J = 6,8 Hz, CH₃(CH₂)₁₀CO), 1,30-1,33 (m, 16H, CH₃(CH₂)₈), 1,64 (t, 2H, J = 6,8 Hz, CH₃(CH₂)₈CH₂), 1,92-2,05 (m, 1H, CH_{2a}), 2,11-2,32 (m, 7H, CH_{2a}, izoksazolin-CH₂ in 2×CH₂CO), 2,97 (dd, 1H, J_1 = 8,0 Hz, J_2 = 9,6 Hz, izoksazolin-H_{4a}), 3,32-3,41 (m, 1H, izoksazolin-H_{4b}), 4,40-4,47 (m, 1H, CH), 4,55-4,58 (m, 1H, CH), 4,91-5,00 (m, 1H, izoksazolin-H₅)

Op. Na spektru niso vidni signali za 3×COOH in 2×NH (protoni so se izmenjali)

¹³C NMR (100 MHz, MeOH-d₄): δ (ppm) = 14.5, 15.5, 23.8, 27.0, 28.3, 28.5, 30.4, 30.5, 30.7, 30.8, 33.1, 36.9, 37.9, 39.8, 50.9, 51.0, 51.1, 53.1, 53.2, 67.0, 82.7, 111.6, 114.6, 117.4, 117.5, 118.6, 127.4, 128.4, 135.3, 153.7, 163.2, 174.4, 174.8, 174.9, 175.0, 176.6

MS (ESI): m/z = 512,3 (M-H)⁻, Mr (izrač.) = 513,58

HR-MS (C₂₄H₃₈N₃O₉) = 512,2609 (M-H)⁻, izračunana 512,2608

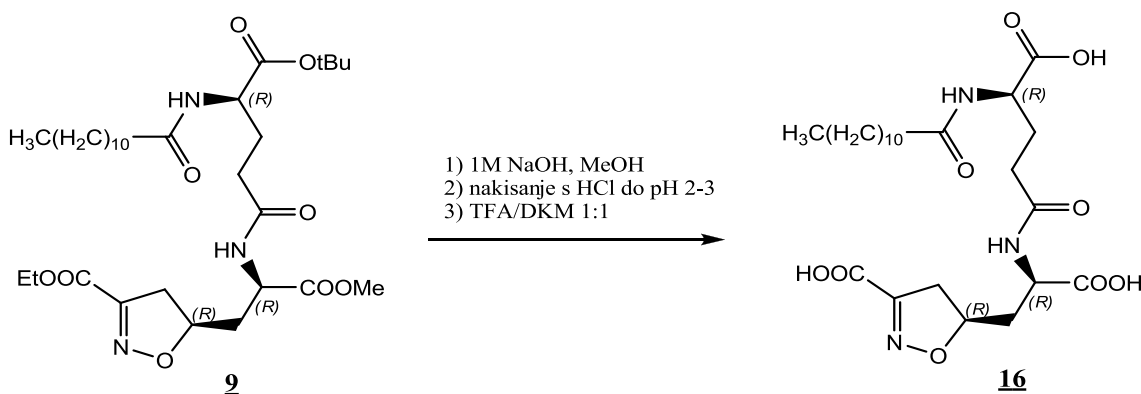
IR (ATR, cm⁻¹): 720, 930, 1023, 1085, 1205, 1377, 1439, 1540, 1626, 1721, 2361, 2854, 2923

[α]_{D, 23} = -3,6° (c = 0,055, CH₂Cl₂)

HPLC: t_R = 18,160 min, 97,5% (λ = 215 nm)

4.16. SINTEZA(R)-5-((R)-2-KARBOKSI-2-((R)-4-KARBOKSI-4-DODEKANAMIDOBUTANAMIDO)ETIL)-4,5-DIHIDROIZOKSAZOL-3-KARBOKSILNE KISLINE (**16**)

Kemijska reakcija:



Izvedba sinteze: V bučko smo natehtali spojino **9** (0,051 g, 0,083 mmol) in jo raztopili v 3-4 ml MeOH. Nato smo v bučko s pipeto odmerili 6 eq 1M NaOH (500 μ l, 0,500 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali na sobni temperaturi. Nastajanje produkta smo spremljali s tankoplastno kromatografijo in reakcijo prekinili po 70 minutah, ko v reakcijski zmesi nismo več zaznali izhodne spojine.

Izolacija: Reakcijski zmesi smo s HCl uravnali vrednost pH na 2 do 3. Nato smo vodno fazo ekstrahirali z 2 $\times$ 20 ml etilacetata. Združene organske faze smo sušili nad Na₂SO₄ in jim pod znižanim tlakom odparili topilo. Izpadli suhi produkt smo nato raztopili v 2 ml DKM in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Po kapljicah smo v reakcijsko zmes dodali 2 ml TFA in pustili reakcijo potekati na sobni temperaturi. Nastajanje produkta smo spremljali s tankoplastno kromatografijo. Reakcijo smo prekinili po 24 urah. Topilo smo odparili in produkt nekajkrat sprali z dietiletrom ter tako dobili 0,027 g produkta.

FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE:

Izgled: kristalinični produkt svetlo rjave barve, **Izkoristek:** 63% (27 mg)

Rf (CH₃CN:MeOH:H₂O = 3:1:1) = 0,58, **T_{tal}** = 85,1-87,0 °C

¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄): δ (ppm) = 0,94 (t, 3H, J = 7,2 Hz, CH₃(CH₂)₁₀), 1,31-1,34 (m, 16H, CH₃(CH₂)₈CH₂CO), 1,64 (t, 2H, J = 6,8 Hz, CH₃(CH₂)₈CH₂CO), 1,96-2,03 (m, 1H, COCH₂CH₂), 2,15-2,31 (m, 4H, 2 $\times$ CH₂CO), 2,39-2,43 (m, 2H, izoksazolin-CH₂), 2,92-2,99 (m, 1H, izoksazolin-H_{4a}), 3,36-3,40 (m, 1H, izoksazolin-H_{4b}), 4,40-4,45 (m, 1H, CH), 4,58-4,63 (m, 1H, CH), 4,86-4,95 (m, 1H, izoksazolin-H₅)

Op. Na spektru niso vidni signali za 3 $\times$ COOH in 2 $\times$ NH (protoni so se izmenjali)

¹³C NMR (100 MHz, MeOH-d₄): δ (ppm) = 14.5, 23.8, 26.9, 28.3, 28.5, 30.4, 30.5, 30.7, 30.8, 33.1, 33.2, 36.9, 37.7, 37.9, 39.7, 50.9, 53.2, 53.3, 81.8, 153.9, 163.2, 174.7, 175.0, 175.1, 176.6

MS (ESI): m/z = 512,3 (M-H)⁻, Mr (izrač.) = 513,58

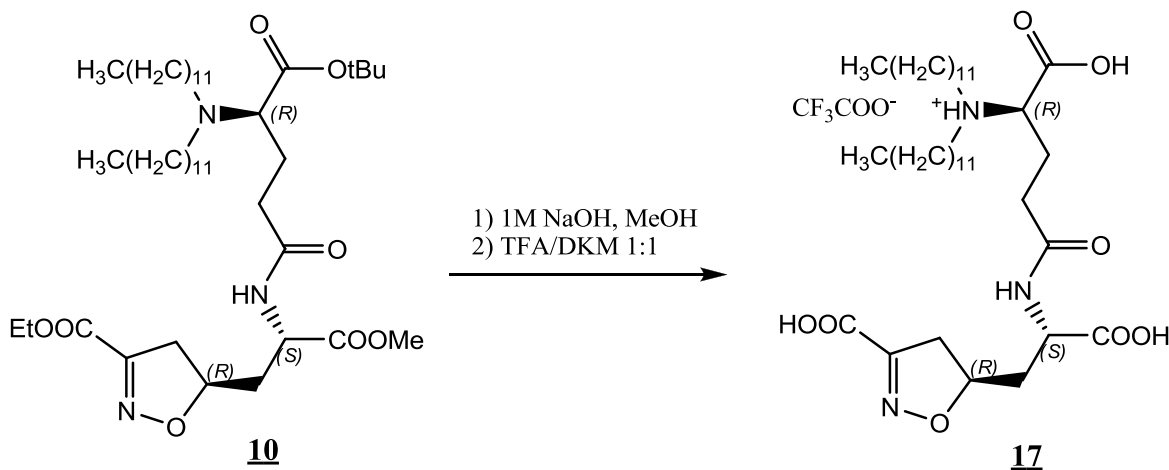
HR-MS (C₂₄H₃₈N₃O₉) = 512,2602 (M-H)⁻, izračunana 512,2608

IR (ATR, cm⁻¹): 590, 719, 800, 929, 1134, 1236, 1434, 1539, 1620, 1719, 2853, 2923

[α]_{D, 23} = +10,0° (c = 0,05, MeOH), **HPLC:** t_R = 18,035 min, 95,3% (λ = 215 nm)

4.17. SINTEZA *N*-((*R*)-1-KARBOKSI-4-((*S*)-1-KARBOKSI-2-((*R*)-3-KARBOKSI-4,5-DIHIDROIZOKSAZOL-5-IL)ETILAMINO)-4-OKSOBUTIL)-*N*-DODECILDODEKAN-1-AMINIJEVEGA 2,2,2-TRIFLUOROACETATA (**17**)

Kemijska reakcija:



Izvedba sinteze: V bučko smo natehtali spojino **10** (0,040 g, 0,052 mmol) in jo raztopili v 4 ml MeOH. Nato smo v bučko s pipeto odmerili 6 eq 1M NaOH (315 μ l, 0,313 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali na sobni temperaturi in spremljali nastajanje produkta s tankoplastno kromatografijo. Po 1 uri nismo več zaznali izhodne spojine, zato smo reakcijo prekinili. Reakcijsko zmes smo nato nevtralizirali z 2M HCl (158 μ l, 0,313 mmol) in topilo odparili pod znižanim tlakom. Izpadli suhi produkt smo raztopili v 2 ml DKM in reakcijsko zmes ohladili na ledeni kopeli. Po kapljicah smo s pipeto dodali 2 ml TFA. Reakcijsko zmes smo nato pustili potekati na sobni temperaturi. Nastajanje produkta smo spremljali s tankoplastno kromatografijo in reakcijo prekinili po 24 urah. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom, produkt nekajkrat sprali z dietiletrom in dobili 0,041 g produkta.

FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE:

Izgled: kristalinični produkt svetlo rjave barve, **Izkoristek:** 100% (41 mg)

R_f (CH₃CN:MeOH:H₂O = 3:1:1) = 0,61

¹H NMR (400 MHz, MeOH-*d*₄): δ (ppm) = 0,91 (t, 6H, J = 6,8 Hz, 2 $\times$ CH₃(CH₂)₁₁), 1,30-1,38 (m, 36H, CH₃(CH₂)₉CH₂), 1,77-1,79 (m, 4H, 2 $\times$ CH₃(CH₂)₉CH₂CH₂), 2,13-2,40 (m, 4H, CH₂CH₂CO in CH₂CH₂CO), 2,66-2,68 (m, 2H, izoksazolin-CH₂), 2,93-3,01 (m, 1H,

izoksazolin-H_{4a}), 3,15-3,35 (m, 4H, 2×CH₂N), 3,36-3,41 (m, 1H, izoksazolin-H_{4b}), 4,17-4,23 (m, 1H, CH), 4,57-4,66 (m, 1H, CH)

Op. Signal za izoksazolin-H₅ je prekrit s signalom za vodo v topilu. Na spektru ni signalov za 3×COOH in 2×NH, ker so se izmenjali s topilom.

¹³C NMR (100 MHz, MeOH-d₄): δ (ppm) = 15.5, 23.8, 25.8, 27.6, 30.2, 30.5, 30.7, 30.8, 33.1, 37.8, 40.0, 51.3, 53.1, 53.9, 54.0, 158.8, 159.2, 162.5, 163.2, 163.4, 163.5, 170.8, 170.9, 173.2, 174.3, 174.4, 174.5

MS (ESI): m/z = 668,5 (M+H)⁺, Mr (izrač.) = 781,94 (667,92 + 114) – sol s TFA

HR-MS (C₃₆H₆₆N₃O₈) = 668,4863 (M+H)⁺, izračunana 668,4850

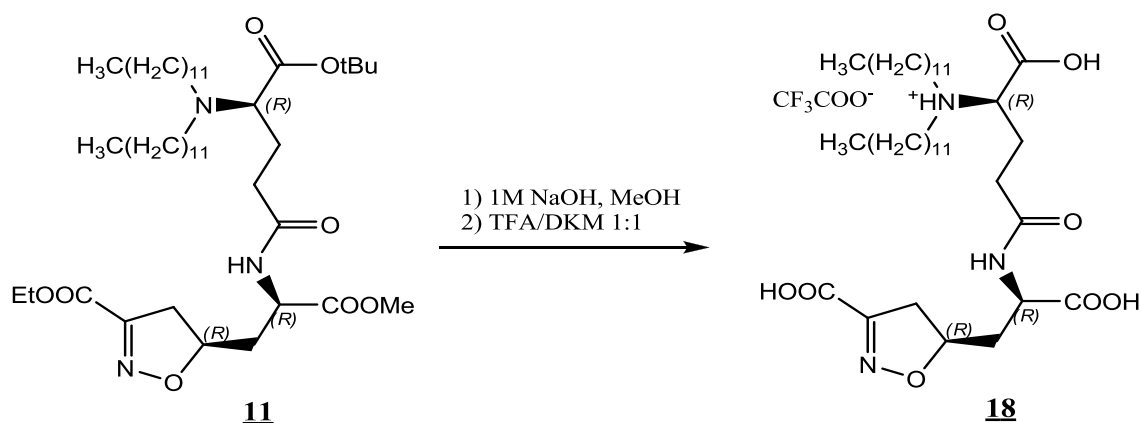
IR (ATR, cm⁻¹): 599, 723, 801, 842, 1135, 1182, 1439, 1674, 2855, 2925

[α]_{D, 23} = +2,2° (c = 0,09, MeOH)

HPLC: t_R = 32,116 min, 100% (λ = 215 nm)

4.18. SINTEZA *N*-((*R*)-1-KARBOKSI-4-((*R*)-1-KARBOKSI-2-((*R*)-3-KARBOKSI-4,5-DIHIDROIZOKSAZOL-5-IL)ETILAMINO)-4-OKSOBUTIL)-*N*-DODECILDODEKAN-1-AMINIJEVEGA 2,2,2-TRIFLUOROACETATA (**18**)

Kemijska reakcija:



Izvedba sinteze: V bučko smo natehtali spojino **11** (0,048 g, 0,0627 mmol) in jo raztopili v 4 ml MeOH. Nato smo v bučko s pipeto odmerili 6 eq 1M NaOH (380 μl, 0,380 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali na sobni temperaturi in spremljali nastajanje produkta s tankoplastno kromatografijo. Po 1 uri nismo več zaznali izhodne spojine, zato smo reakcijo

prekinili. Reakcijsko zmes smo nato nevtralizirali z 2M HCl (190 μ l, 0,380 mmol) in topilo odparili pod znižanim tlakom. Izpadli suhi produkt smo raztopili v 2 ml DKM in reakcijsko zmes ohladili na ledeni kopeli. Po kapljicah smo s pipeto dodali 2 ml TFA. Reakcijsko zmes smo nato mešali na sobni temperaturi. Nastajanje produkta smo spremljali s tankoplastno kromatografijo in reakcijo prekinili po 24 urah. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom, produkt nekajkrat sprali z dietiletrom in dobili 0,049 g produkta.

FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE:

Izgled: kristalinični produkt svetlo rjave barve, **Izkoristek:** 100% (49 mg), **Rf** (EA) = 0,12

^1H NMR (400 MHz, MeOH- d_4): δ (ppm) = 0,91 (t, 6H, J = 6,8 Hz, $2\times\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}$), 1,31-1,39 (m, 36H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2$), 1,75-1,85 (m, 4H, $2\times\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1,96-2,50 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ in $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 2,62-2,78 (m, 2H, izoksazolin- CH_2), 2,93-3,02 (m, 1H, izoksazolin- H_{4a}), 3,15-3,37 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2\text{N}$), 3,36-3,42 (m, 1H, izoksazolin- H_{4b}), 4,20-4,22 (m, 1H, CH), 4,64-4,67 (m, 1H, CH)

Op. signal za izoksazolin- H_5 je prekrit s signalom za vodo v topilu. Na spektru ni signalov za $3\times\text{COOH}$ in $2\times\text{NH}$, ker so se izmenjali s topilom.

^{13}C NMR (100 MHz, MeOH- d_4): δ (ppm) = 14.5, 23.8, 24.1, 25.8, 27.6, 28.0, 30.2, 30.4, 30.5, 30.7, 30.8, 33.1, 37.6, 39.7, 43.1, 50.9, 54.0, 61.2, 81.8, 113.8, 116.7, 119.6, 154.1, 162.7, 163.1, 163.3, 174.6, 175.3, 178.2

MS (ESI): m/z = 668,5 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, M_r (izrač.) = 781,94 (667,92 + 114) – sol s TFA

HR-MS ($\text{C}_{36}\text{H}_{66}\text{N}_3\text{O}_8$) = 668,4857 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, izračunana 668,4850

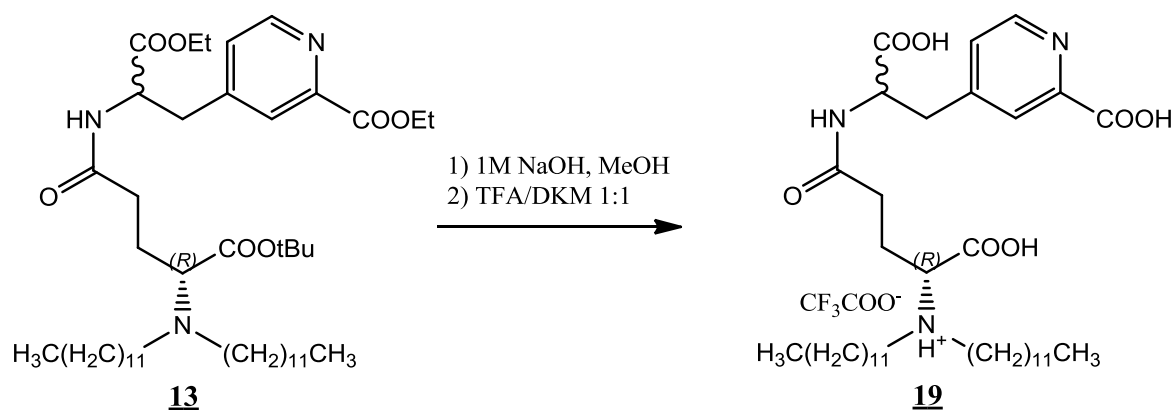
IR (ATR, cm^{-1}): 599, 723, 801, 841, 943, 1135, 1182, 1434, 1672, 2855, 2925

$[\alpha]_{\text{D}, 23}$ = +8,0° (c = 0,05, MeOH)

HPLC: t_R = 31,997 min, 100% (λ = 215 nm)

4.19. SINTEZA N-((1R)-KARBOKSI-4-((1-KARBOKSI-2-(2-KARBOKSIPIRIDIN-4-IL)ETIL)AMINO)-4-OKSOBUTIL)-N-DODECILDODEKAN-1-AMINIJEVEGA 2,2,2-TRIFLUOROACETATA (**19**)

Kemijska reakcija:



Izvedba sinteze: V bučko smo natehtali spojino **13** (0,060 g, 0,076 mmol) in jo raztopili v 4 ml MeOH. Nato smo v bučko s pipeto odmerili 6 eq 1M NaOH (460 μ l, 0,457 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali na sobni temperaturi in spremljali nastajanje produkta s tankoplastno kromatografijo. Po 35 minutah nismo več zaznali izhodne spojine. Reakcijsko zmes smo nato nevtralizirali z 2M HCl (230 μ l, 0,457 mmol) in topilo odparili pod znižanim tlakom. Izpadli suhi produkt smo raztopili v 2 ml DKM in reakcijsko zmes ohladili na ledeni kopeli. Po kapljicah smo s pipeto dodali 2 ml TFA. Reakcijsko zmes smo nato pustili potekati na sobni temperaturi. Nastajanje produkta smo spremljali s tankoplastno kromatografijo in reakcijo prekinili po 24 urah. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom, produkt nekajkrat sprali z dietiletrom in dobili 0,060 g produkta.

FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE:

Izgled: kristalinični produkt svetlo rjave barve, **Izkoristek:** 100% (60,1 mg)

R_f (CH₃CN:MeOH:H₂O = 3:1:1) = 0,78

¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄): δ (ppm) = 0,92 (t, 6H, J = 7,2Hz, 2 $\times$ CH₃(CH₂)₁₁), 1,31-1,37 (m, 36H, 2 $\times$ CH₃(CH₂)₉CH₂), 1,69-1,73 (m, 4H, 2 $\times$ CH₃(CH₂)₉CH₂), 1,94-2,13 (m, 2H, CH₂CH₂CO), 2,44-2,59 (m, 2H, CH₂CH₂CO), 3,04-3,22 (m, 4H, 2 $\times$ CH₂N), 3,47-3,50 (m,

2H, Py-CH₂), 3,71-3,76 (m, 1H, CH), 4,72-4,78 (m, 1H, CH), 7,56-7,59 (m, 1H, Py-H), 8,10 (d, 1H, *J* = 5,6 Hz, Py-H), 8,58-8,60 (m, 1H, Py-H)

Op. Na spektru ni signalov za 3×COOH in 2×NH, ker so se izmenjali s topilom.

¹³C NMR (100 MHz, MeOH-d₄): δ (ppm) = 14.5, 23.7, 23.8, 25.5, 27.6, 30.2, 30.5, 30.7, 30.8, 33.1, 53.1, 53.4, 54.5, 67.1, 113.9, 116.8, 119.7, 127.3, 129.6, 150.5, 155.8, 162.9, 163.3, 166.1, 174.7

MS (ESI): *m/z* = 676,5 (M+H)⁺, Mr (izrač.) = 789,96 (675,94 + 114) – sol s TFA

HR-MS (C₃₈H₆₆N₃O₇) = 676,4899 (M+H)⁺, izračunana 676,4901

IR (ATR, cm⁻¹): 574, 722, 801, 839, 1130, 1179, 1204, 1325, 1405, 1674, 2855, 2924

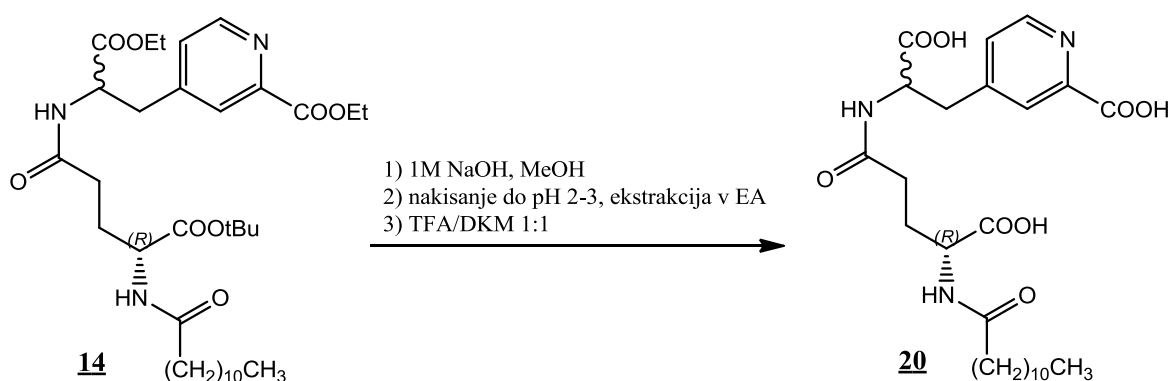
[α]_{D, 23} = +7,1° (*c* = 0,07, MeOH)

HPLC: *t_R* = 12,515min, 31,4% (λ = 254 nm)

T_{tal} = 88-92 °C

4.20. SINTEZA 4-(2-KARBOKSI-2-((R)-4-KARBOKSI-4-DODEKANAMIDOBUTANAMIDO)ETIL) PIKOLINSKE KISLINE (**20**)

Kemijska reakcija



Izvedba sinteze: V bučko smo natehtali spojino **14** (0,022 g, 0,035 mmol) in jo raztopili v 4 ml MeOH. Nato smo v bučko s pipeto odmerili 6 eq 1M NaOH (210 μl, 0,208 mmol) in reakcijsko zmes mešali na sobni temperaturi. Nastajanje produkta smo spremljali s tankoplastno kromatografijo in reakcijo prekinili po 85 minutah, ko v reakcijski zmesi nismo več zaznali izhodne spojine.

Izolacija: Reakcijski zmesi smo z 2M HCl uravnali vrednost pH na 2 do 3. Nato smo vodno fazo ekstrahirali z 2×20 ml etilacetata. Združene organske faze smo sušili nad Na₂SO₄ in topilo odparili. Izpadli beli suhi produkt smo raztopili v 2 ml DKM in raztopino ohladili na ledeni kopeli ter ji po kapljicah dodali 2 ml TFA. Reakcijsko zmes smo nato mešali na sobni temperaturi. Nastajanje produkta smo spremljali s tankoplastno kromatografijo. Reakcijo smo prekinili po 24 urah, ko v reakcijski zmesi nismo več zaznali izhodne spojine. Topilo smo nato odparili pod znižanim tlakom, surov produkt nekajkrat sprali z dietiletrom in tako dobili 0,018 g produkta.

FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE:

Izgled: oljnat produkt rjave barve (viskozna tekočina), **Izkoristek:** 100% (18 mg)

R_f (CH₃CN:MeOH:H₂O = 3:1:1) = 0,67

¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄): δ (ppm) = 0,92 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, CH₃(CH₂)₁₀), 1,20-1,40(m, 16H, CH₃(CH₂)₈CH₂CH₂), 1,62 (m, 2H, CH₃(CH₂)₈CH₂CH₂), 1,80-1,93 in 2,04-2,14 (2m, 2H, CH₂CH₂CO), 2,23-2,30 (m, 4H, 2×CH₂CO), 3,16-3,23 in 3,45-3,58 (2m, 1H, Py-CH₂), 4,27-4,34 (m, 1H, CH), 4,82-4,88 (m, 1H, CH), 7,70-7,75 (m, 1H, Pyr-H), 8,19-8,22 (m, 1H, Py-H), 8,66-8,70 (m, 1H, Py-H)

Op. Na spektru ni signalov za 3×COOH in 2×NH, ker so se izmenjali s topilom.

¹³C NMR (100 MHz, MeOH-d₄): δ (ppm) = 14.5, 23.8, 26.9, 30.3, 30.5, 30.7, 30.8, 33.1, 36.8, 36.9, 37.8, 37.9, 53.1, 53.5, 53.7, 114.6, 117.5, 127.7, 129.9, 147.5, 147.6, 149.6, 152.3, 165.8, 173.6, 174.8, 176.5

MS (ESI): *m/z* = 520,3 (M-H)⁻, *Mr* (izrač.) = 521,60

HR-MS (C₂₆H₃₈N₃O₈) = 520,2645 (M-H)⁻, izračunana 520,2659

IR (ATR, cm⁻¹): 593, 664, 720, 786, 977, 1085, 1134, 1186, 1308, 1443, 1539, 1643, 1730, 2853, 2923

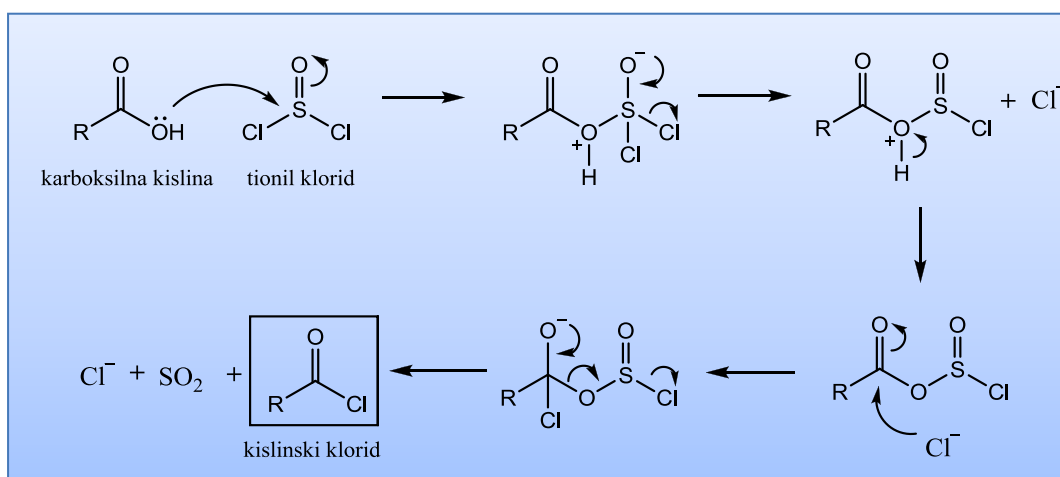
[α]_{D, 23} = +14,5° (*c* = 0,055, MeOH)

HPLC: *t_R* = 14,838 min, 48,6 % (λ = 254 nm)

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. O-ACILIRANJE (TVORBA METILNEGA ESTRA)

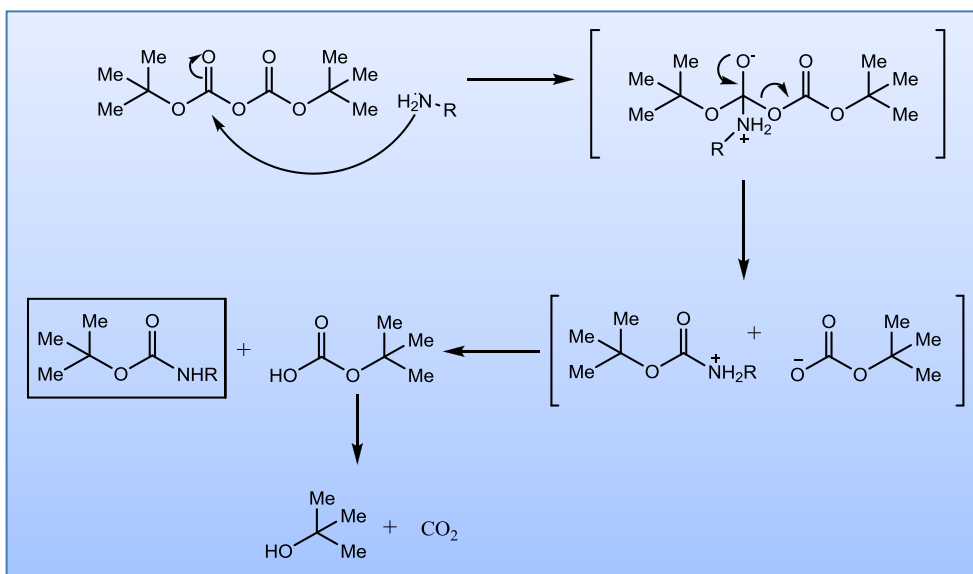
Cilj prve stopnje je bila tvorba metilnega estra na izhodni spojini (+/-)-2-amino-4-pentanojski kislini, ki bi omogočala nadaljnji selektivni potek reakcij. Za pretvorbo karboksilne kisline v reaktivnejši kislinski klorid, ki je bolj dovzeten za nukleofilni napad metanola, smo uporabili reagent tionil klorid (SOCl_2) (33). Njegova prednost pred ostalimi acilirnimi reagenti (PCl_3 , POCl_3 , PBr_3) je v tem, da pri sintezi kislinskega klorida nastanejo hlapni stranski produkti, izolacija kislinskega klorida pa je razmeroma enostavna (34). Mehanizem reakcije lahko razložimo kot nukleofilno substitucijo, pri kateri pride do nukleofilnega napada karboksilne kisline na elektrofilni žveplov atom tionil klorida, ki mu sledi odcep kloridnega iona. Po izgubi protona nastane mešan anhidrid, ki ga napade sproščeni kloridni ion. Sledi premik elektronov, izstop dobre izstopajoče skupine ($-\text{SOCl}$), ki disociira v žveplov dioksid in kloridni ion, ter nastanek kislinskega klorida (slika 15) (35). Nastali kislinski klorid je nato reagiral z metanolom do metilnega estra. Pri sami reakciji in izolaciji ni bilo nobenih posebnosti, saj smo topilo odparili pod znižanim tlakom, prebitnega tionil klorida pa smo se znebili s spiranjem surovega produkta z dietiletom. Slednji se namreč v njem dobro topi, medtem ko se je spojina **1** nahajala v obliki soli in ni prešla v dietileter (izkoristek 100%).



Slika 15. Predlagan mehanizem aktivacije karboksilne kisline s tionil kloridom (35).

5.2. ZAŠČITA AMINSKE SKUPINE V OBLIKI *TERC*-BUTIL KARBAMATA

V naslednjem koraku smo z uporabo Boc-anhidrida in Na_2CO_3 sintetizirali ester karbaminske kisline (karbamat), spojino **2**, in tako zaščitili še prosto aminsko skupino spojine **1**. Spojina **2** tako ni imela več kislega in bazičnega centra in smo jo lahko uporabili v naslednji stopnji sinteze. Za topilo smo uporabili zmes dioksana in vode. Pred dodatkom Na_2CO_3 in Boc-anhidrida smo topilo ohladili na ledeni kopeli, saj je reakcija uvedbe Boc zaščite eksotermna. Prebitna količina Na_2CO_3 (2,5 eq) je imela pri reakciji dve nalogi. Prva je bila pretvorba aminijeve izhodne soli v neionizirano obliko, ki je nato reagirala z Boc-anhidridom. Po drugi strani pa je Na_2CO_3 tudi nevtraliziral HCl, ki je nastal "*in situ*" med reakcijo. Pri izolaciji smo izvedli ekstrakcijo v etno fazo, nakar smo se nezreagiranega izhodnega produkta znebili s spiranjem z 1M HCl, ki je morebitni prosti amin pretvoril v protonirano obliko, tako da je le-ta prešel v vodno fazo. Zaostalo topilo (dioksan in eter) in *tert*-butanol, ki je nastal med reakcijo, smo odstranili s stopenjskim odparevanjem na rotavaporju ($T = 30 \rightarrow 60\text{ }^\circ\text{C}$) (izkoristek 93%).

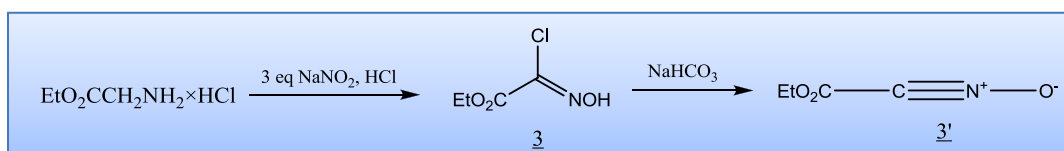


Slika 16. Mehanizem zaščite aminske skupine z Boc-anhidridom (36).

Predpostavljeni mehanizem uvedbe Boc zaščite poteka po reakciji nukleofilne substitucije, pri čemer se nukleofilna aminska skupina adira na elektrofilni C-atom karbnilne skupine Boc-anhidrida. Pri tem pride do nastanka tetraedričnega intermediata, ki nato razpade v *tert*-butilni ester ogljikove in karbaminske kisline. *Terc*-butilni ester ogljikove kisline za razliko od karbamata ni stabilen in razpade do *tert*-butanola in ogljikovega dioksida (slika 16).

5.3. SINTEZA KARBETOKSIFORMONITRIL OKSIDA (»CEFNO-a«) (**3'**)

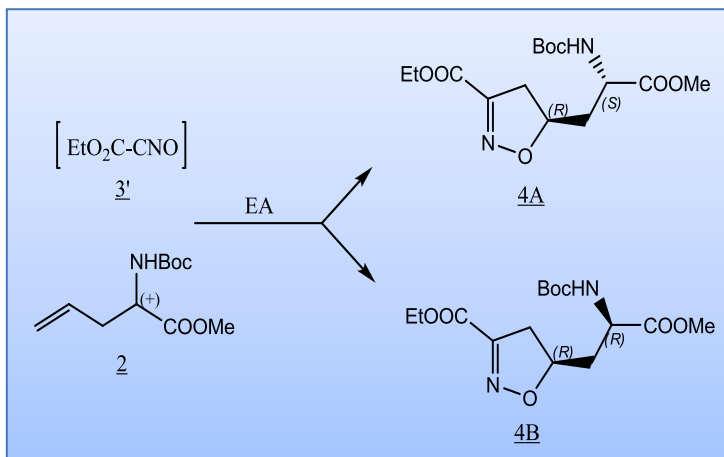
Pri načrtovanju CEFNO-a (karbetoksiformonitril oksida) smo sledili sinteznemu postopku Kozikowskega in sodelavcev (37). Kot prekursor smo uporabili etil 2-kloro-2-(hidroksiimino)acetat **3**, ki je nastal pri reakciji etilnega estra glicina (v obliki soli s HCl) v prisotnosti natrijevega nitrita in klorovodikove kisline. V reakcijski zmesi smo poleg produkta **3** zaznali še nezreagiran etilni ester glicina, zato smo napravili ekstrakcijo z dietiletrom, v katerem se je skoncentriral produkt, medtem ko je vsa nezreagirana izhodna spojina (aminijeva sol!) ostala v vodni fazi. Izkoristek izolacije je znašal 81% in je nekoliko višji od tistega, opisanega v prej omenjenem članku Kozikowskega in sodelavcev (37).



Slika 17. Shema sinteze karbetoksiformonitril oksida.

5.4. SINTEZA IZOKSAZOLINSKEGA OBROČA

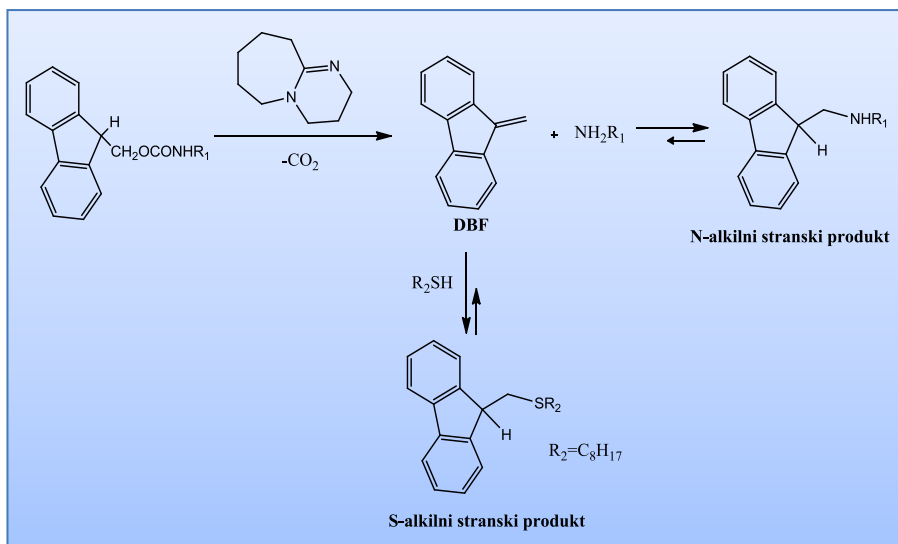
Eno glavnih stopenj sinteze tarčnih spojin **15**, **16**, **17** in **18** predstavlja 1,3-dipolarna cikloadicija etoksikarbonilformonitril oksida (**3'**), ki nastane "in situ" ob prisotnosti baze (NaHCO₃) in etil 2-kloro-2-(hidroksiimino)acetata (**3**), na ustrezno zaščiten alilglicin (**2**). Periciklična reakcija povzroči nastanek racemne zmesi dveh 3,5-disubstituiranih izoksazolinskih diastereoizomerov **4a** in **4b** (38). Reakcija v našem primeru ni popolnoma potekla, saj je v reakcijski mešanici poleg produktov in prebitnega klorooksimskega derivata ostalo še nekaj nezreagiranega alilglicinskega derivata. Ločbo in izolacijo smo napravili s kolonsko kromatografijo pod povišanim tlakom. Tako smo uspešno izolirali želeni produkta sinteze **4a** in **4b** v razmerju 1:1,6, kar sovpada s podatkom navedenim v literaturi (38). Rahlo favoriziranje reakcije v smeri nastanka spojine **4b** (glede na **4a**) lahko pojasnimo z manjšim steričnim oviranjem metilne in Boc zaščitne skupine na alilglicinu za napad **3'**, če sta ti dve skupini v položaju (*R*).



Slika 18. Periciklična reakcija nastanka dveh diastereoizomerov **4a** in **4b**.

5.5. ODSTRANITEV Fmoc ZAŠČITNE SKUPINE (sinteza spojine **5**)

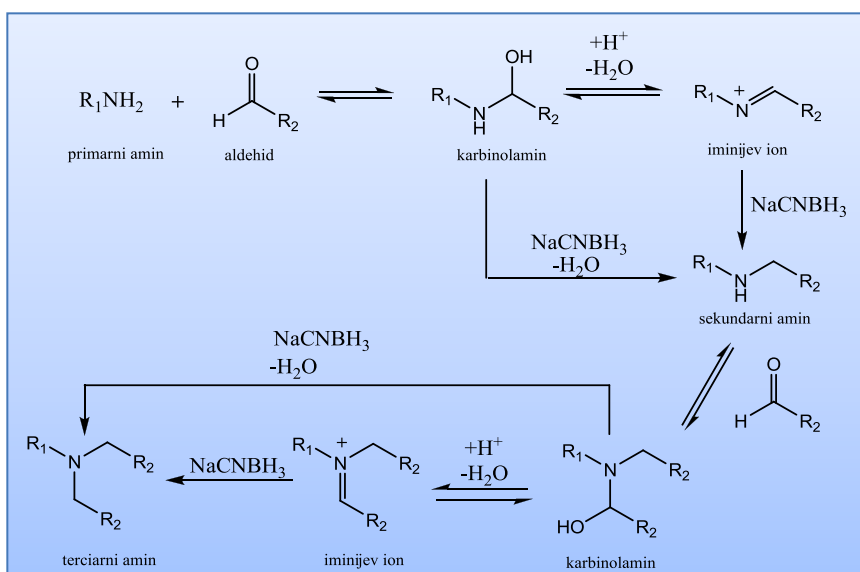
Prekurzorska molekula acilnih in dialkilnih D-glutamatnih fragmentov **6** in **7**, ki smo jih nato uporabili pri sintezah vseh šestih končnih spojin, je bila komercialno dostopna zaščitena aminokislina Fmoc-D-Glu-OtBu. Acilne in dialkilne fragmente D-glutaminske kisline smo sintetizirali v dveh stopnjah. Najprej smo prekursorju odstranili zaščitno skupino Fmoc in tako dobili spojino **5**. Odstranitev je potekala s pomočjo baze DBU, ki odcepi kisli proton na mestu 9 fluorenskega obroča. Temu sledi prerazporeditev elektronov in odcep zaščitne skupine v obliki dibenzofulvena (DBF) in ogljikovega dioksida. Ker nastali DBF deluje kot elektrofil in bi lahko ponovno tvoril adukt z aminom, smo v reakcijsko zmes dodali 1-oktantiol. Ta je deloval kot lovilec DBF-ja, saj je močnejši nukleofil od amina in smo s tem ravnotežje pomaknili v nastanek tioetra. Prvotni načrt za izolacijo je bila brezvodna ekstrakcija v dvofaznem mediju MeOH/heksan. V heksanu naj bi bili topne nepolarne nečistote DBU, DBF in 1-oktantiol, medtem ko bi se produkt **5** nahajal v metanolu. Ker pa se fazi iz neznanega razloga nista ločili, smo zmes odparili do suhega in produkt izolirali s spiranjem z dietiletom. Kljub temu, da smo pri tem nekaj produkta izgubili, je bil končni izkoristek reakcije visok (96%).



Slika 19. Shema odstranitve Fmoc zaščitne skupine z DBU in 1-oktantiolom, kot lovilec DBF-ja (prirejeno po shemi (39)).

5.6. REDUKTIVNO AMINIRANJE (sinteza spojine 6)

N,N-dialkilni derivat D-glutaminske kisline smo pripravili z reduktivnim aminiranjem imina, ki nastane pri reakciji med spojino 5 in dodecil aldehydom v kislem mediju. Kot reducent smo uporabili NaCNBH₃. V iniciacijskem delu reakcije pride do nastanka intermediata karbinolamina, ki ob ustreznih reakcijskih pogojih dehidrira v imin. Protonacija imina in sledeča redukcija iminijevega iona ali karbinolamina vodita v nastanek monoalkiliranega amina. Sekundarni amin lahko nato ponovno reagira z molekulo aldehyda, kar po predstavljenem mehanizmu na sliki 20 vodi do nastanka terciarnega amina (40, 41).

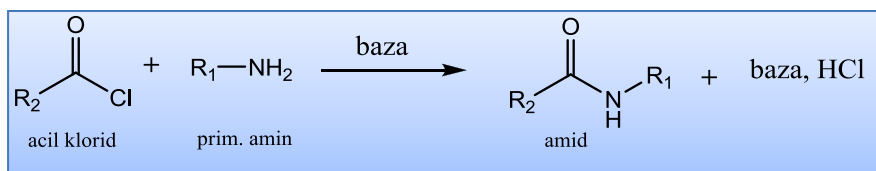


Slika 20. Shema reduktivnega aminiranja (40, 41).

Reakcijo smo prekinili po 19 urah. V reakcijski mešanici je ostalo nekaj nezreagiranega amina. Produkt smo izolirali s kolonsko kromatografijo pod zvišanim tlakom. V mobilno fazo smo dodali tudi 0,5% trietilamina, ki je preprečil protonacijo bazičnih aaminskih dušikov in s tem morebitno zadrževanje teh substanc na koloni. Izkoristek je bil dokaj nizek (41%), kar lahko pripišemo nepopolno zreagirani izhodni spojini. Reakcijo bi zato morali pustiti potekati še nekaj časa ali pa uporabiti večji prebitek aldehida in reducenta. Druga možnost bi bila tudi izbira drugega reducenta, npr. cianoborhidrida vezanega na silicijev dioksid. V članku, ki je primerjal učinkovitost omenjenega reducenta z $\text{Na}(\text{CN})\text{BH}_3$ v reakcijah reduktivnega aminiranja, so ugotovili povprečno 25% višji izkoristek reakcije, če so uporabili cianoborhidrid vezan na silicijev dioksid (42). Prednost slednjega reagenta je tudi manjša toksičnost, poleg tega pa ne pride do sproščanja NaCN in HCN v reakcijsko zmes in je tako zmanjšana možnost nastanka stranskih produktov. Pogosto se za redukcijo iminov uporabljajo tudi $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, NaBH_4 , LiBH_4 , H_2 in Pd/C . Izkoristek so nekateri raziskovalci poskušali povišati tudi z ostalimi metodami, kot je npr. brezvodno reduktivno aminiranje s pomočjo mikrovalov (43).

5.7. N-ACILIRANJE (sinteza spojine **7**)

Za pripravo spojine **7**, ki je po svoji kemijski naravi amid, smo uporabili splošno metodo N-aciliranja primarnega amina z acil kloridom v bazičnem mediju. Postopek priprave sta prva opisala nemška kemika Carl Schotten in Eugen Baumann leta 1883, po katerih je ta reakcija dobila tudi ime. Reakcija je močno eksotermna, zato jo je bilo potrebno skrbno kontrolirati in reakcijsko zmes pred dodatkom acil klorida ohladiti (0 °C). Stranski produkt te reakcije je HCl , zaradi česar smo v reakcijsko zmes za nevtralizacijo dodali bazo (NaHCO_3), saj bi v kislem mediju prišlo do protonacije primarnega amina, ki ne bi več reagiral kot nukleofil in reakcija ne bi potekla. (34)



Slika 21. Shema N-aciliranja z acil kloridom (44).

Z N-aciliranjem spojine **5** smo v molekuli izgubili bazični center, ostala pa nam je še ena prosta karboksilna skupina. To smo izkoristili za razmeroma enostavno izolacijo. Z dodatkom dietiletra v reakcijsko zmes, ki smo jo predhodno naalkalili do pH 9-10, smo se

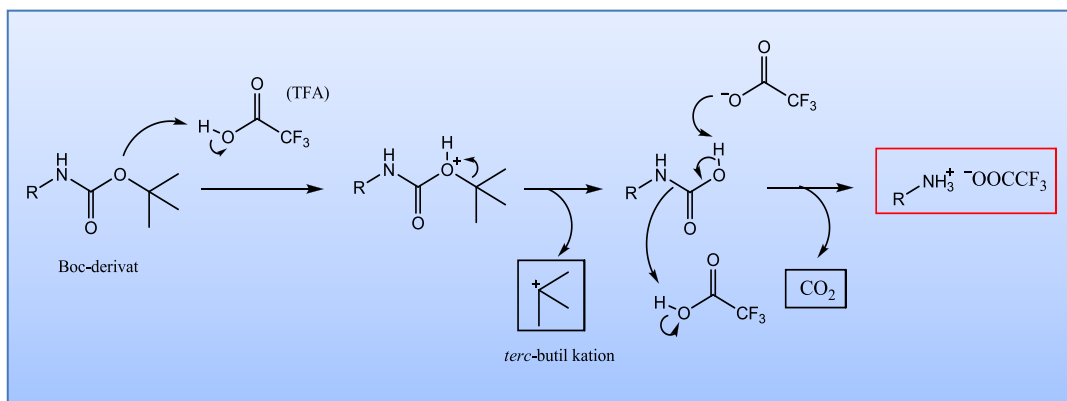
znebili prebitnega lavroil klorida. Nato smo vodno fazo nakisali do pH okoli 2 pri katerem se je karboksilna skupina nahajala v protonirani obliki, čemur je sledila ekstrakcija v etil acetat. Izkoristek reakcije je bil razmeroma nizek in je znašal 62%. Do manjšega izkoristka je verjetno prišlo že zaradi same izvedbe sinteze, saj smo reakcijo prekinili, ko še ni potekla do konca. Tako smo na TLC kromatogramu reakcijske zmesi zaznali še nekaj nezreagiranega amina **5**. Do izgub je prišlo tudi pri izolaciji, saj je nekaj produkta prehajalo v dietileter, s katerim smo se želeli znebiti nezreagiranega lavroil klorida. Izkoristek bi izboljšali tako, da bi pustili reakcijo poteči do konca in reakcijo po možnosti termostatali na temperaturo 25 °C, saj je bila temperatura laboratorija v času sinteze (pozna jesen) kar nekaj stopinj nižja od privzete sobne temperature. Navkljub morebitnim izgubam produkta zaradi zadrževanja na silikagelu, bi izkoristek izolacije lahko izboljšali tudi z uporabo kolonske kromatografije. Druga možnost bi bila sprememba metode *N*-aciliranja s t.i. sklopitvenimi reagenti, ki selektivno aktivirajo karboksilne kisline v intermediate, ki reagirajo z aminom. Taki reagenti so npr. DCC (dicikloheksil karbodiimid), CDI (karbonil diimidazol) in BOP (benzotriazol-1-il-oksi-tris-(dimetilamino)-fosfonijev heksafluorofosfat). Ker ima spojina **5** prosto γ -karboksilno skupino, bi jo bilo v tem primeru potrebno v dodatni stopnji ustrezno zaščititi (npr. v metilni ester). S tem bi se izognili nastanku stranskih produktov, ki bi nastali med samimi molekulami spojine **5**.

5.8. TVORBA AMIDNE VEZI (SKLOPITEV) S TBTU (SINTEZA SPOJIN **8, **9**, **10**, **11**)**

Dialkilne in acilne derivate D-glutaminske kisline (**6**, **7**) smo s pomočjo sklopitvenega reagenta TBTU (*O*-(Benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronijev tetrafluoroborat) in nenukleofilne baze NMM pripeli na rigidna analoga mezo-DAP (**4a** in **4b**). Tvorba peptidne vezi med dvema aminokislinama zajema dva koraka. V prvi stopnji preko aktivacije karboksilne skupine na koncu prve aminokisline zagotovimo potrebno energijo za tvorbo amidne vezi. Hitrost aktivacije je odločilnega pomena za uspešnost sinteze, saj v primeru prepočasne aktivacije grozi razpad sklopitvenega reagenta. V drugi stopnji sledi nukleofilni napadaminske skupine druge AK na aktivirano kislino (**45**).

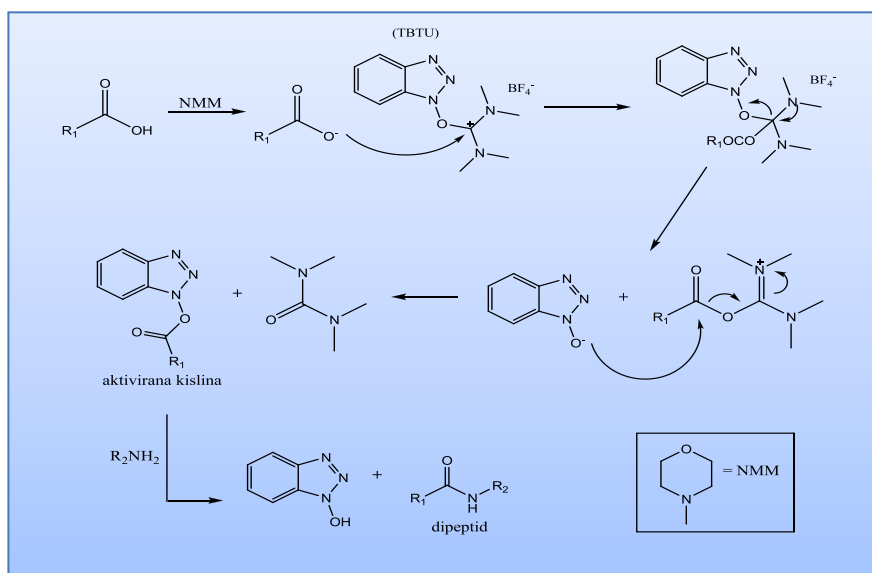
Najprej smo spojinam **4a** in **4b** z acidolizo (TFA/DKM = 4:1) selektivno odstranili Boc zaščitno skupino (glej sliko 21). Presežek TFA smo odstranili s spiranjem z dietiletrom. Izolirana produkta smo nato raztopili v DKM/NMM. Hkrati smo v drugih dveh bučkah aktivirali karboksilno skupino spojinam **6** in **7**. To smo naredili z uporabo sklopitvenega

reagenta TBTU in NMM v topilu DKM. Okvirni časi sinteze (1 dan) smo določili na podlagi predhodnih diplomskih del (48, 49). Aktivirano kislino smo nato združili z Boc-odščitenima analogoma mezo-DAP in dobili spojine **8-11**. Izolacija dialkilnih derivatov **10** in **11** z ekstrakcijo v našem primeru ni bila uspešna, saj smo poleg produkta v organski fazi zaznali še dve spojini (najverjetneje nezreagirana reagenta NMM in TBTU). Zato smo se odločili za kolonsko kromatografijo in pri tem uspešno izolirali spojini **10** (izkoristek 47%) in **11** (izkoristek 59%). Ker acilna derivata v svoji strukturi ne vsebujeta nobenega kislega in bazičnega centra, smo izvedli ekstrakcijo v DKM, nezreagirane reagente pa smo odstranili s spiranjem organske faze z 1M HCl in NaHCO₃. Nadalje smo organsko fazo posušili, topilo pa odparili. Izkoristek reakcije pri spojini **8** je bil visok (100%), medtem ko je za spojino **9** znašal 57%. Glede na to, da smo pri obeh eksperimentih uporabili enake množine istih reagentov, je do tako velike razlike v izkoristku najverjetneje prišlo zaradi različnega časovnega poteka sintez, saj smo v primeru spojine **8** pustili reakcijo potekati 4 dni (zaradi vikenda in prostega dneva), medtem ko smo reakcijo pri spojini **9** prekinili že po 1 dnevu, ko vsa izhodna snov še ni zreagirala do konca. Potek reakcije bi zato morali v prihodnje skrbneje spremljati s TLC in reakcijo prekiniti šele takrat, ko v reakcijski zmesi ne bi več zasledili izhodnih spojin.



Slika 22. Mehanizem odstranitve zaščitne skupine Boc s TFA (36).

V prvi stopnji potече protonacija terc-butil karbamata, ki ji sledi odcep terc-butilnega kationa in nastanek nestabilne karbaminske kisline. Slednja je podvržena spontani dekarboksilaciji. Po odcepu CO₂ tako nastane prosti amin, ki se v kislem mediju nahaja v obliki soli s TFA.



Slika 23. Shema aktivacije kisline s TBTU in sinteza peptidne vezi (46).

5.9. ODSTRANITEVALKILNIH ESTROV(SINTEZA SPOJIN 15, 16, 17, 18)

Metilne in etilne estre spojin 8, 9, 10 in 11 smo odstranili z alkalno hidrolizo (1M NaOH, MeOH) pri čemer so nastale ustrezne karboksilne kisline. Odstranjeni zaščitni skupini v obliki metanola in etanola smo se skupaj s topilom znebili z odparevanjem pod znižanim tlakom. NaCl, ki je nastal pri nevtralizaciji, je prispeval k presežku izkoristka. Kasneje smo ga odstranili tako, da smo ga oborili v MeOH- d_4 , ki smo ga dodali spojinam za potrebe NMR analize. Terc-butilne estre smo odstranili z acidolizo. Spojinam, ki smo jim predhodno odstranili alkilne estre, smo dodali TFA v ohlajenem DKM (1:1). Prebitne TFA smo se znebili s spiranjem z dietiletrom, pri čemer je prišlo tudi do manjših izgub našega produkta.

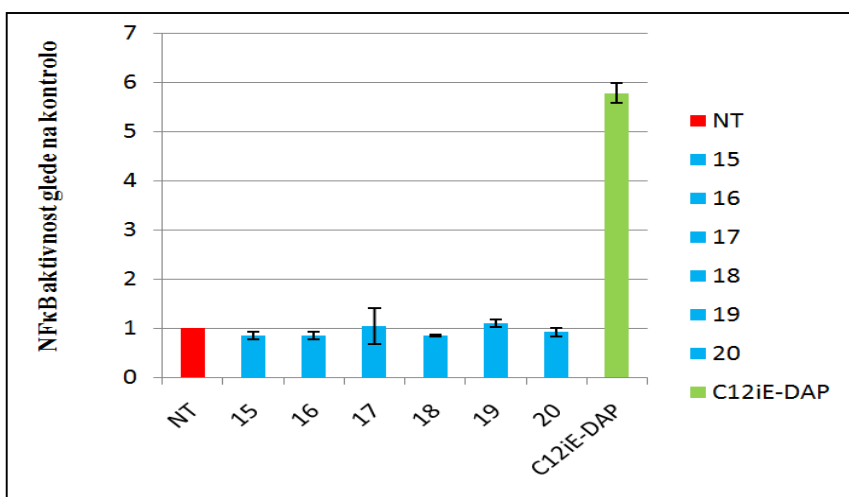
5.10. SINTEZA PIRIDINSKIH RIGIDIZIRANIH DERIVATOV D-GLU-MEZO-DAP (sintaza spojin 19, 20)

V drugem delu načrtovanja analogov spojine D-Glu-mezo-DAP smo fragment mezo DAP ciklizirali v piridinski obroč. Spojino 12 smo sintetizirali iz dietil 2-acetamido-2-((cianopiridin-4-il)metil)malonata, ki je bil podvržen ostrim pogojem kisle acidolize (5-6M HCl). Pri tem se je odstranila acetatna in acetamidna skupina, nitrilna skupina na mestu 2 piridinskega obroča pa je hidrolizirala do karboksilne kisline (34). Slednjo smo v drugi stopnji aktivirali z reagentom SOCl_2 in jo po standardnem postopku zaščitili v etilni ester (glej poglavje 5.1.). Spojini 12 smo po že opisanem postopku pod točko 5.8. z reagentom

TBTU pripeli dialkilne in acilne derivate D-glutaminske kisline (**6**, **7**). Po čiščenju produkta z ekstrakcijo in izolaciji spojin **13**, **14** s kolonsko kromatografijo, je sledila še odstranitev zaščitnih skupin. Te smo izvedli po analogiji opisani pod točko 5.9. Odstranitev zaščitnih spojin je potekla brez težav in z visokim izkoristkom (~100%). Nekoliko so nas presenetili rezultati HPLC analize, saj smo v obeh primerih končnih spojin **19** in **20** dobili dodatne tri nečistote, ki jih v predhodno posnetih ^1H NMR spektrih nismo zaznali. Predvidevamo, da so te nečistote posledica razpada končnih spojin in so nastale med izvajanjem HPLC analize. Specifični pogoji pri izvajanju HPLC analize so lahko povzročili tudi nastanek zmesi diastereomerov, saj spojini **19** in **20** na enem kiralnem centru nista bili čisti.

5.11. TESTIRANJE SPOJIN NA NOD1 AGONISTIČNO DELOVANJE

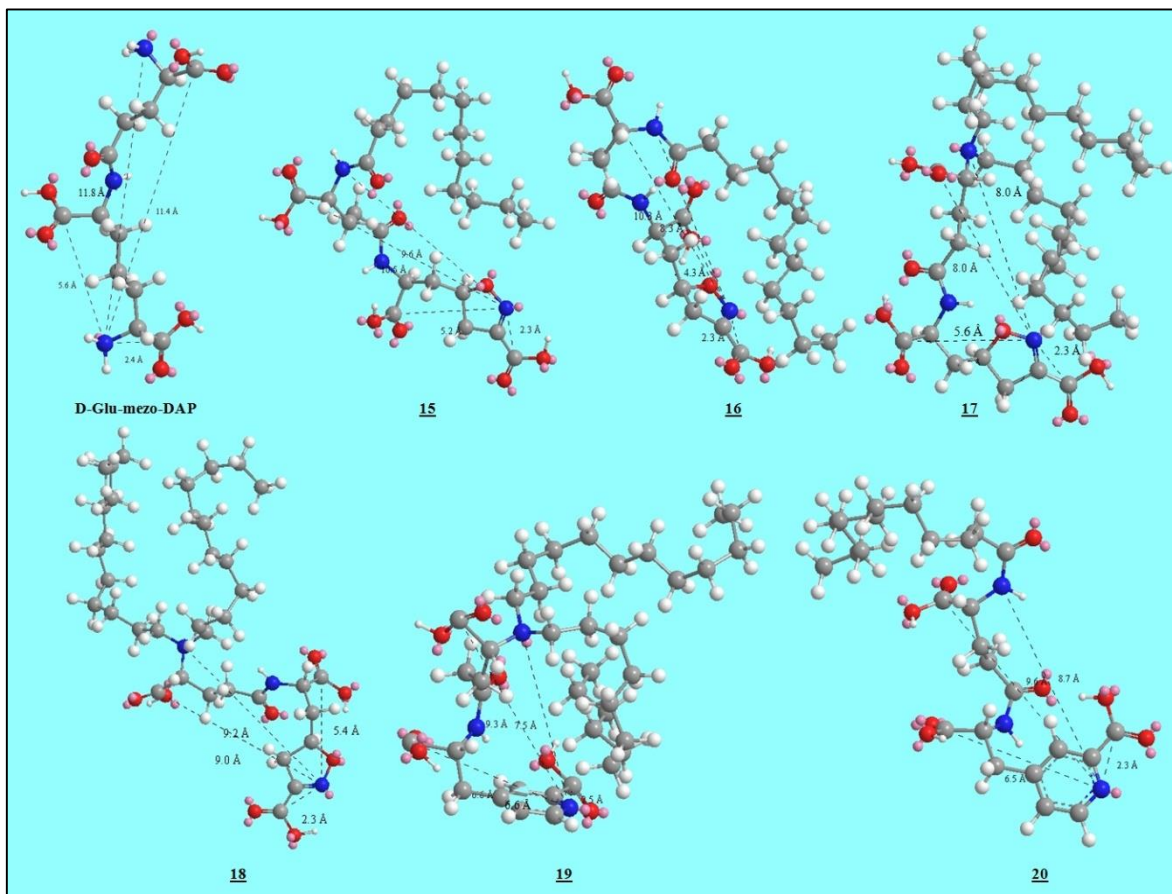
Rezultati meritev testiranih spojin **15-20** se niso razlikovali od negativne kontrole.



Graf 1. Primerjava NFκB aktivnosti testiranih spojin na celični liniji Ramos-Blue™ glede na pozitivno (zelena) in negativno kontrolo (rdeča).

Ker so spojine s C_{12} dialkilnimi in acilnimi verigami na dušiku glutaminske kisline dipeptida D-Glu-mezo-DAP znani NOD1 agonisti (**15**), ugotavljamo, da smo z rigidizacijo mezo-DAP preko uvedbe različnih obročev (izoksazolinski in piridinski) izgubili željeno delovanje. Kljub temu, da obroča ohranita določene lastnosti amino skupine (proton-akceptor), sta v del mezo-DAP poleg rigidizacije vnesla tudi planarnost, ki je spremenila »nativno« prostorsko pozicijo amino skupine pod kotom 110° . V 3D strukturah končnih spojin lahko opazimo tudi nekoliko skrajšane razdalje med funkcionalnimi skupinami in obročnim dušikom napram prvotni spojini D-Glu-mezo-DAP. Poleg tega smo s ciklizacijo

povečali tudi velikost molekule in vanjo uvedli dodatni lipofilni element. Naštete strukturne spremembe so verjetno neugodno vplivale na vezavo naših spojin v aktivno mesto NOD1.



Slika 24. 3D strukture spojine vodnice D-Glu-mezo-DAP in končnih spojin 15-20.

5.12. REZULTATI TESTIRANJ INHIBITORNE AKTIVNOSTI SPOJIN NA LIGAZAH MurE IN MurF TER KOMENTAR

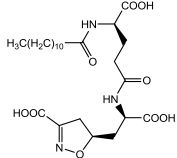
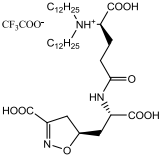
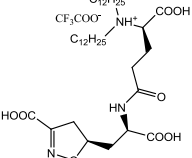
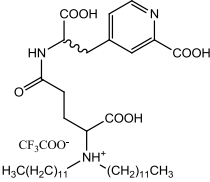
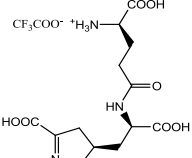
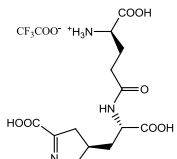
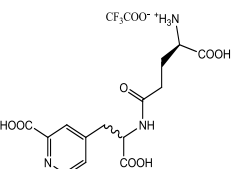
Testirane so bile spojine od **16-19** pri koncentraciji 500 μM . Kot najučinkovitejši zaviralec MurE se je izkazala spojina **17** z RA 8% in vrednostjo $\text{IC}_{50} = 179 \mu\text{M}$. Zmerno visoko inhibitorno aktivnost zasledimo tudi pri spojini **18** (RA 32%), ki je njena diastereomerna oblika. Spojinama **16** in **19** je inhibitorna aktivnost na MurE padla, saj je bila izmerjena RA le še 71% oz. 75%.

Slabše so se spojine izkazale pri inhibiciji encima MurF. Tudi v tem primeru se je kot najučinkovitejši zaviralec izkazala spojina **17** z RA 43%. Ostale spojine so imele RA v razponu od 66-78%.

Izven okvira magistrske naloge so določili tudi inhibitorne aktivnosti derivatov spojin **17**, **18** in **19** brez dialkilnih verig na dušiku D-glutaminske kisline (v preglednici označeni kot **ZJ-48**, **ZJ-49** in **ZJ-84**). Samo derivat **ZJ-49** je bil učinkovit pri inhibiciji encima MurE. Izračunana RA je znašala 37%, vrednost IC₅₀ pa 517 µM. Noben derivat ni izkazoval posebne aktivnosti na MurF.

S pomočjo zbranih rezultatov lahko potrdimo, da je ključni element za inhibitorno aktivnost na encimu MurE rigidizirana aminokislina (4*R*,6*S*) mezo-DAP v obliki izoksazolina, ki deluje kot substratni inhibitor omenjenega encima, medtem ko aciliran/dialkiliran fragment D-Glu le prispeva k boljšim hidro-lipofilnim lastnostim spojine. Za aktivnost na encimu MurF pa je odgovoren kemično spremenjen dipeptid D-Glu-mezo-DAP, ki posnema zadnja dva aminokislinska preostanka produkta encima MurE UDP-*N*-acetilmuramoil-L-alanil-D-glutamil-mezo-DAP. Poleg tega lahko vidimo, da je uvedba dialkilnih verig v obeh primerih (inhibicija MurE in MurF) pripomogla k boljši učinkovitosti spojin, verjetno zaradi vzpostavitve dodatnih (hidrofobnih) interakcij med hidrofobnimi aminokislinskimi preostanki blizu aktivnega mesta in učinkovinami. Če primerjamo **ZJ-49** s spojino **17**, ki je njen strukturni analog z dialkilnima verigama, lahko opazimo kar 3-kratno znižanje vrednosti IC₅₀ na MurE zaradi dialkilacije, in sicer s 517 µM pri spojini **ZJ-49** na 179 µM pri spojini **17**. Aciliranje, s katerim smo izgubili bazični center na fragmentu D-Glu, se je izkazalo za manj učinkovito, saj se je RA glede na neaciliran derivat znižala iz 99% le na 71%. To kaže na morebitno pomembnost bazičnega centra v tem delu molekule. Lipofilne verige verjetno pripomorejo tudi k obsežnejšemu prehodu učinkovin skozi membrane bakterij do tarčnih encimov, a te predpostavke s tem testom ne moremo potrditi, saj smo test izvajali na izoliranem encimu. Tudi ciklizacija fragmenta mezo-DAP je vplivala na učinkovitost. Kot boljši inhibitorji encima MurE so se izkazali izoksazolinski derivati, medtem ko so piridinski bolje inhibirali encim MurF. Glede na to, da se spojini **17** in **18** razlikujeta le po različni konfiguraciji na enem kiralnem centru (mezo-DAP), lahko trdimo, da sprememba iz konfiguracije (4*R*,6*R*) v (4*R*,6*S*) pripomore k boljši aktivnosti na obeh encimih.

Preglednica 3. Določene rezidualne aktivnosti testiranih spojin na MurE in MurF.

Spojina	Kem. struktura	MM (g/mol)	RA 500 μ M MurE	RA 500 μ M MurF
16		513,58	71%	78%
17		781,94	8% IC ₅₀ = 179 μ M	43%
18		781,94	32% 91% pri 350 μ M	73%
19		903,99	75%	66%
ZJ-48		445,30	99%	92%
ZJ-49		445,30	37% IC ₅₀ = 517 μ M	79%
ZJ-84		453,32	104%	83%

6. SKLEPI

- Po načrtovani sintezni poti smo uspešno sintetizirali šest rigidiziranih derivatov dipeptida D-Glu-mezo-DAP.
- Končne spojine niso izkazovale nobenega agonističnega delovanja na receptorjih NOD1 celične linije Ramos-BlueTM. Ugotovili smo, da je za agonistično delovanje na receptorjih NOD1 ključna pravilna prostorska usmerjenost -NH₂ skupine na fragmentu mezo-DAP, in sicer v konformaciji (*R*). Z obročno rigidizacijo, ki je v molekulo vnesla planarnost in spremenila razdalje med funkcionalnimi skupinami, pa smo v tem delu porušili specifične 3D zahteve za uspešno vezavo na receptor.
- Spojinam smo določili inhibitorno (rezidualno) aktivnost na ligazah MurE in MurF, najboljšim spojinam pa še IC₅₀. Spojina **17** je pri koncentraciji 500 µM izkazovala najmočnejše inhibitorno delovanje na MurE z RA 8% in IC₅₀ = 179 µM. Zmerno visoko aktivnost smo zasledili tudi pri spojinu **18** (RA 32% pri 500 µM).
- Spojine niso izkazovale posebne inhibitorne aktivnosti na encimu MurF. Tudi v tem primeru smo določili najnižjo RA spojinu **17** (43% pri 500 µM).

Do sedaj so raziskovalci sintetizirali razmeroma malo analogov mezo-DAP, ki izkazujejo zaviralno delovanje na encimu MurE. Z magistrskim delom smo sintetizirali nove derivate dipeptida D-Glu-mezo-DAP, med katerimi je spojina **17** izkazovala celo boljšo inhibitorno aktivnost na MurE napram nekaterim znanim zaviralcem (31, 47). Glede na rezultate lahko sklepamo, da je uvedba dialkilnih verig pripomogla k boljši inhibitorni učinkovitosti spojin. Aciliranje, s katerim smo izgubili bazični center na fragmentu D-Glu, se je izkazalo za manj učinkovito. Tudi ciklizacija fragmenta mezo-DAP je vplivala na učinkovitost. Kot boljši inhibitorji encima MurE so se izkazali izoksazolinski derivati, medtem ko so piridinski bolje inhibirali encim MurF. Glede na to, da se spojinu **17** in **18** razlikujeta le po različni konfiguraciji na verigi mezo-DAP, lahko trdimo, da sprememba iz konfiguracije (4*R*,6*R*) v (4*R*,6*S*) pripomore k boljši aktivnosti na obeh encimih.

V prihodnjih raziskavah bi bilo zanimivo spojine **15-20** biološko testirati tudi na antagonistično delovanje na receptorju NOD1 saj predvidevamo, da imajo spojine (kljub odsotnosti intrinzične aktivnosti) določeno afiniteto do receptorjev. Spojino **17**, ki izkazuje najmočnejše inhibitorno delovanje napram izoliranemu encimu MurE, pa bi bilo smiselno ovrednotiti tudi na "*in vitro*" bakterijskih testih. Ker imajo naše končne spojine proste kar

tri karboksilne skupine, predvidevamo, da bodo težko prehajale skozi biološke membrane in sloj peptidoglikana. Prevzem učinkovin v bakterijske celice bi zato lahko povečali z vezavo sideroforov (kelatorjev železa) na spojino **17** ali s kakšno drugo metodo.

7. LITERATURA

1. Kraigher A, Ihan A, Avčin T. Cepljenje in cepiva, Dobre prakse varnega cepljenja. Ljubljana: Inštitut za varovanje zdravja RS; 2011. p. 33, 134–5, 147.
2. Kindt, Thomas J, Osborne Barbara A GRA. Kuby Immunology. 6th ed. W.H Freeman and Company; 2004. p. 8–19, 62–4, 160.
3. Male David, Brostoff Johnathan, Roth David RI. Immunology. 7th ed. Elsevier; 2006. p. 3–18.
4. Vozelj M. Temelji imunologije. 1st ed. Ljubljana: DZS; 2000. p. 2.
5. Pattern Recognition Receptors [Internet]. [cited 2014 Apr 7]. Available from: <http://www.rndsystems.com/Resources/Images/26231.pdf>
6. Hontelez S, Sanecka a, Netea MG, van Sriel a B, Adema GJ. Molecular view on PRR cross-talk in antifungal immunity. Cell Microbiology. 2012;14(4):467–74.
7. Botos I, Segal DM, Davies DR. The structural biology of Toll-like receptors. Structure. Cell Press. 2011;19:447–59.
8. Okun E, Griffioen KJ, Lathia JD, Tang SC, Mattson MP, Arumugam T V. Toll-like receptors in neurodegeneration. Brain Research Reviews. 2009. p. 278–92.
9. Kanneganti T-D, Lamkanfi M, Núñez G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. ImmunityReview. 2007;27(4):549–59
10. Askari N, Correa RG, Zhai D, Reed JC. Expression, purification, and characterization of recombinant NOD1 (NLRC1): A NLR family member. Journal of Biotechnology. 2012;157:75–81.
11. Jakopin Ž, Gobec M, Kodela J, Hazdovac T, Mlinarič-Raščan I, Sollner Dolenc M. Synthesis of conformationally constrained γ -D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid derivatives as ligands of nucleotide-binding oligomerization domain protein 1 (Nod1). European Journal of Medicinal Chemistry. 2013; 69:232–43
12. Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. Nature Reviews Immunology. 2006;6(1):9–20
13. Philpott DJ, Sorbara MT, Robertson SJ, Croitoru K, Girardin SE. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. Nature Reviews Immunology. 2014;14(1):9–23
14. Laroui, Hamed YY et al. l-Ala- γ -d-Glu-meso-diaminopimelic Acid (DAP) Interacts Directly with Leucine-rich Region Domain of Nucleotide-binding Oligomerization Domain 1, Increasing Phosphorylation Activity of Receptor-interacting

- Serine/Threonine-protein Kinase 2 and Its Interaction with NOD1. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(35):3100-13
15. Agnihotri G, Ukani R, Malladi SS, Warshakoon HJ, Balakrishna R, Wang X, et al. Structure-activity relationships in nucleotide oligomerization domain 1 (Nod1) agonistic γ -glutamyl-diaminopimelic acid derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2011;54(5):1490–510
 16. Inohara N, Nuñez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nature Reviews Immunology*. 2003;3(5):371–82
 17. Hasegawa M, Kawasaki A, Yang K, Fujimoto Y, Masumoto J, Breukink E, et al. A role of lipophilic peptidoglycan-related molecules in induction of Nod1-mediated immune responses. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007;282:11757–64.
 18. Correa RG, Milutinovic S, Reed JC. Roles of NOD1 (NLRC1) and NOD2 (NLRC2) in innate immunity and inflammatory diseases. *Bioscience Reports*. 2012;32(6):597–608
 19. Oehlers SH, Flores MV, Hall CJ, Swift S, Crosier KE, Crosier PS. The inflammatory bowel disease (IBD) susceptibility genes NOD1 and NOD2 have conserved anti-bacterial roles in zebrafish. *Disease Models and Mechanisms*. 2011;4(6):832–41
 20. Nuyts a H, Lee WP, Bashir-Dar R, Berneman ZN, Cools N. Dendritic cells in multiple sclerosis: key players in the immunopathogenesis, key players for new cellular immunotherapies? *Multiple Sclerosis Journal*. 2013;19(8):995–1002
 21. Nishio H, Kanno S, Onoyama S, Ikeda K, Tanaka T, Kusuhara K, et al. Nod1 ligands induce site-specific vascular inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2011;31:1093–9.
 22. Kutikhin AG. Role of NOD1/CARD4 and NOD2/CARD15 gene polymorphisms in cancer etiology. *Human Immunology*. 2011. p. 955–68.
 23. Vollmer W, Blanot D, de Pedro M a. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*. 2008;32(2):149–67
 24. Typas A, Banzhaf M, Gross C a, Vollmer W. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nature Reviews Microbiology*. 2012;10(2):123–36
 25. El Zoeiby A, Sanschagrin F, Levesque RC. Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Molecular Microbiology*. 2003; 47(1):1–12
 26. Rang H. P., Dale M.M., Ritter J.M., Flower R.J. HG. Rang and Dale's Pharmacology. 7th ed. Elsevier; 2012. p. 611–3.

27. Mengin-Lecreulx D, Blanot D, van Heijenoort J. Replacement of diaminopimelic acid by cystathionine or lanthionine in the peptidoglycan of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1994;176:4321–7.
28. Humljan J, Kotnik M, Boniface A, Šolmajer T, Urleb U, Blanot D, et al. A new approach towards peptidosulfonamides: synthesis of potential inhibitors of bacterial peptidoglycan biosynthesis enzymes MurD and MurE. *Tetrahedron*. 2006;62(47):10980–8
29. Perdih A, Kovac A, Wolber G, Blanot D, Gobec S, Solmajer T. Discovery of novel benzene 1,3-dicarboxylic acid inhibitors of bacterial MurD and MurE ligases by structure-based virtual screening approach. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2009;19(10):2668–73
30. Sova M, Kovac A, Turk S, Hrast M, Blanot D, Gobec S. Phosphorylated hydroxyethylamines as novel inhibitors of the bacterial cell wall biosynthesis enzymes MurC to MurF. *Bioorganic Chemistry*. 2009;37(6):217–22
31. Barreateau H, Kovac A, Boniface A, Sova M, Gobec S, Blanot D. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*. 2008;32(2):168–207
32. Hilpert H. Synthese von 3-(2-Carboxy-4-Pyridyl)- und 3-(6-Carboxy-3-pyridyl)-DL-alanin. *Helvetica Chimica Acta*. 1987;70:1307–11.
33. Tišler M. *Organska kemija*. Ljubljana: DZS Ljubljana; 1991. p. 293, 244.
34. Smith, M.B., March J. *March's advanced organic chemistry, reactions, mechanisms and structure*. 6th ed. 2007. p. 16–72, 1224, 1268–9, 1427–9.
35. Paul M. Dewick. *Nucleophilic reactions of carbonyl groups. Essentials of Organic Chemistry: For Students of Pharmacy, Medicinal Chemistry and Biological Chemistry*. 2006. p. 251,252.
36. Boc Protection. *Common Organic Chemistry* [Internet]. [cited 2014 Apr 24]. Available from: http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_Mech.htm
37. Kozikowski AP, Adamczyk M. Methods for the Stereoselective Cis Cyanohydroxylation and Carboxyhydroxylation of Olefins. *Journal of Organic Chemistry*. 1983;42:366–72.
38. Conti P, De Amici M, Grazioso G, Roda G, Barberis Negra FF, Nielsen B, et al. Design, synthesis, and pharmacological characterization of novel, potent NMDA receptor antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2004;47:6740–8.
39. Sheppeck JE, Kar H, Hong H. A convenient and scaleable procedure for removing the Fmoc group in solution. *Tetrahedron Letters*. 2000. p. 5329–33.

40. Tripathi RP, Verma SS, Pandey J, Tiwari VK. Recent Development on Catalytic Reductive Amination and Applications. *Current Organic Chemistry*. 2008. p. 1093–115.
41. Gomez, Silvia, Peters, Joop A., Maschmeyer T. The Reductive Amination of Aldehydes and Ketones and the Hydrogenation of Nitriles: Mechanistic Aspects and Selectivity Control. *Reviews*. 2002;344:1037-1057
42. Grenga PN, Sumbler BL, Beland F, Priefer R. Reductive amination agents: comparison of Na(CN)BH₃ and Si-CBH. *Tetrahedron Letters*. Elsevier Ltd; 2009;50(48):6658–60
43. Rajender S., Varma, Rajender D. Sodium Borohydride on Wet Clay: Solvent-free Reductive Amination of Carbonyl Compounds Using Microwaves. *Tetrahedron*. 1998;54(6293-6298).
44. Montalbetti CAGN, Falque V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*. 2005. p. 10827–52.
45. Al-Warhi TI, Al-Hazimi HMA, El-Faham A. Recent development in peptide coupling reagents. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2012. p. 97–116.
46. Coupling Reagents, Peptide coupling reagents IV (1) benzotriazole N-oxytrisdimethylamino [Internet]. [cited 2014 Apr 23]. Available from: http://www.biocis.u-psud.fr/IMG/pdf/Coupling_Reagents.pdf
47. Auger G., van Heijenoort J., Vederas C.J. Effect of analogues of diaminopimelic acid on the meso-diaminopimelate-adding enzyme from *Escherichia coli*. *FEBS Letters*. 1996;391(171-174).
48. Kodela J. Načrtovanje in sinteza N,N-dialkilnih analogov dipeptida D-Glu-mezo-DAP s potencialnim imunomodulatornim delovanjem. Diplomaska naloga. Fakulteta za farmacijo. Ljubljana. 2013. p. 54-55
49. Hazdovac T. Načrtovanje in sinteza aciliranih derivatov dipeptida D-Glu-mezo-DAP s potencialnim imunomodulatornim učinkom. Diplomaska naloga. Fakulteta za farmacijo. Ljubljana. 2013. p 60-61