

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



ODINEJA RATEK

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



ODINEJA RATEK

**SINTEZA IN VREDNOTENJE MODULATORJEV TOLL-U
PODOBNEGA RECEPTORJA 7 S KINOLINSKIM IN
KINAZOLINSKIM SKELETOM**

**SYNTHESIS AND EVALUATION OF TOLL-LIKE RECEPTOR 7
MODULATORS WITH QUINOLINE AND QUINAZOLINE SCAFFOLD**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem izdelala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, na Katedri za farmacevtsko kemijo, ter na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sove, mag. farm., in somentorstvom doc. dr. Urbana Švajgerja, mag. farm.

Spektroskopske meritve so bile izvedene na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani in v Centru za masno spektrometrijo Inštituta Jožef Stefan v Ljubljani.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju, doc. dr. Mateju Sovi, mag. farm., in somentorju, doc. dr. Urbanu Švajgerju, mag. farm., za vso pomoč, potrpežljivost in deljenje strokovnega znanja. Za pomoč in skupne ure v laboratoriju se zahvaljujem prijateljici Ani Dolšak. Moja velika zahvala gre tudi sošolcem in prijateljem, s katerimi smo premagovali izzive in ustvarjali lepe in nepozabne trenutke.

Magistrsko nalogo posvečam svojim staršem. Na svetu ni dovolj besed, s katerimi bi se jima lahko za vse zahvalila.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja, doc. dr. Mateja Sove, mag. farm., in somentorja, doc. dr. Urbana Švajgerja, mag. farm.

Odineja Ratek

Predsednik komisije: prof. dr. Janko Kos, mag. farm.

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

VSEBINA

I POVZETEK.....	VII
II ABSTRACT	VIII
III SEZNAM OKRAJŠAV.....	IX
1 UVOD	1
1.1 IMUNSKI SISTEM.....	1
1.2 LOČEVANJE MED LASTNIMI IN TUJIMI MOLEKULAMI KOT DEL PRIROJENEGA IMUNSKEGA SISTEMA.....	2
1.3 POVEZAVA PRIROJENEGA IN PRIDOBLJENEGA IMUNSKEGA ODZIVA.....	3
1.4 TOLL-U PODOBNI RECEPTORJI (TLR)	4
1.5 TOLL-U PODOBNI RECEPTORJI 7 (TLR7)	6
1.6 TERAPEVTSKA PODROČJA AGONISTOV TLR7.....	9
1.7 RAZVOJ AGONISTOV TLR7 KOT ZDRAVILNIH UČINKOVIN	11
2 NAMEN DELA.....	13
3 MATERIALI IN METODE.....	14
3.1 KEMIJSKA SINTEZA	14
3.2 BIOLOŠKO TESTIRANJE	16
4 EKSPERIMENTALNI DEL	18
4.1 KEMIJSKA SINTEZA	18
4.1.1 1. stopnja: sinteza spojine 1:	18
4.1.2 2. stopnja:sinteza spojine 2:	19
4.1.3 Sinteza spojine 3:	21
4.1.4 Sinteza spojine 4:	22
4.1.5 Sinteza spojine 5:	23
4.1.6 Sinteza spojine 6:	25

4.1.7 Sinteza spojine 7:	26
4.1.8 Sinteza spojine 8:	28
4.1.9 Sinteza spojine 9:	29
4.1.10 Sinteza spojine 10:	30
4.1.11 Sinteza spojine 11:	32
4.1.12 Sinteza spojine 12:	33
4.1.13 Sinteza spojine 13:	34
4.1.14 Sinteza spojine 14:	35
4.2 BIOLOŠKO TESTIRANJE	38
4.2.1 ROKOVANJE S CELICAMI	38
4.2.2 PRIPRAVA RAZTOPIN TESTIRANIH SPOJIN IN PREVERJANJE TOPNOSTI V CELIČNEM GOJIŠČU	39
4.2.3 SEZNAM TESTIRANIH SPOJIN	40
4.2.4 TESTI CITOTOKSIČNOSTI	42
4.2.5 PRELIMINARNI TEST AGONIZMA	44
4.2.6 DOLOČANJE EC ₅₀ AGONISTOV	46
5 REZULTATI IN RAZPRAVA	47
5.1 KEMIJSKA SINTEZA	47
5.2 BIOLOŠKO VREDNOTENJE	49
5.2.1 ROKOVANJE S CELICAMI	49
5.2.2 PRIPRAVA RAZTOPIN SPOJIN V DMSO IN TOPNOST RAZTOPIN V CELIČNEM GOJIŠČU	50
5.2.3 CITOTOKSIČNOST SPOJIN	52
5.2.4 PRELIMINARNI TESTI AGONIZMA	55
5.2.5 DOLOČITEV EC ₅₀	58
5.2.6 VPLIV CITOTOKSIČNOSTI NA IZRAŽANJE AGONIZMA	59

6 SKLEP.....	60
7 LITERATURA.....	61

KAZALO SLIK

Slika 1: Povezava prirojene in pridobljene imunosti.	3
Slika 2: Prostorska razporeditev podvrst hTLR.	4
Slika 3: Proteinska struktura dimernega hTLR7.	6
Slika 4: Shematski prikaz strukturne ureditve TLR7.	7
Slika 5: Prikaz vezave naravnega liganda na hTLR7.	7
Slika 6: Signalizacijska pot TLR7.	8
Slika 7: Struktura imikvimoda.	11
Slika 8: Struktura resikvimoda.	12
Slika 9: Struktura loxoribina.	12
Slika 10: Načrtovani novi derivati 2-trifluorometilkinazolina in 2-trifluorometilkinolina z različnimi substituenti na mestu 4.	13
Slika 11: Reakcijska shema sinteze spojine (1).	18
Slika 12: Reakcijska shema sinteze spojine (2).	19
Slika 13: Reakcijska shema sinteze spojine (3).	21
Slika 14: Reakcijska shema sinteze spojine (4).	22
Slika 15: Reakcijska shema sinteze spojine (5).	23
Slika 16: Reakcijska shema sinteze spojine (6).	25
Slika 17: Reakcijska shema sinteze spojine (7).	26
Slika 18: Reakcijska shema sinteze spojine (8).	28
Slika 19: Reakcijska shema sinteze spojine (9).	29
Slika 20: Reakcijska shema sinteze spojine (10).	30
Slika 21: Reakcijska shema sinteze spojine (11).	32
Slika 22: Reakcijska shema sinteze spojine (12).	33
Slika 23: Reakcijska shema sinteze spojine (13).	34
Slika 24: Reakcijska shema sinteze spojine (14).	35
Slika 25: Pregled rasti celic pod mikroskopom pri stokratni povečavi.	39
Slika 26: Pretvorba MTS barvila v formazan.	43
Slika 27: Dokazna reakcija preliminarnega testa agonizma.	45
Slika 28: Mehanizem nastanka kinazolinskega skeleta.	47
Slika 29: Nukleofilna substitucija alkoholne skupine na mestu 4 s klorom.	47
Slika 30: Citotoksičnost pri $C_{max}/2$ glede na topnost.	52

Slika 31: Citotoksičnost pri $C_{max}/4$ glede na topnost.	52
Slika 32: Citotoksičnost pri $C_{max}/8$ glede na topnost.	53
Slika 33: Citotoksičnost pri $C_{max}/16$ glede na topnost.	53
Slika 34: Primerjava morfologije mrtvih celic, tretiranih s spojino 9, z netretiranimi, živimi celicami.	54
Slika 35: Preliminarni test agonizma, 1. ponovitev za spojine 1–15..	55
Slika 36: Preliminarni test agonizma, 2. ponovitev za spojine 1–15.	56
Slika 37: Preliminarni test agonizma, 1. ponovitev za spojine 16–27.	56
Slika 38: Preliminarni test agonizma, 2. ponovitev za spojine 16–27.	57
Slika 39: Graf odvisnosti odziva od logaritma koncentracije.	58

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Pregled podvrst hTLR.	4
Preglednica 2: Lastnosti in analitika spojine 1.	19
Preglednica 3: Lastnosti in analitika spojine 2.	20
Preglednica 4: Lastnosti in analitika spojine 3.	21
Preglednica 5: Lastnosti in analitika spojine 4.	23
Preglednica 6: Lastnosti in analitika spojine 5.	24
Preglednica 7: Lastnosti in analitika spojine 6.	25
Preglednica 8: Lastnosti in analitika spojine 7.	27
Preglednica 9: Lastnosti in analitika spojine 8.	28
Preglednica 10: Lastnosti in analitika spojine 9.	29
Preglednica 11: Lastnosti in analitika spojine 10.	31
Preglednica 12: Lastnosti in analitika spojine 11.	32
Preglednica 13: Lastnosti in analitika spojine 12.	33
Preglednica 14: Lastnosti in analitika spojine 13.	35
Preglednica 15: Lastnosti in analitika spojine 14.	36
Preglednica 16: Čistost kupljenih spojin.	37
Preglednica 17: Pregled aminov, ki smo jih uvedli na mesto 4 osnovnega trifluorometil kinazolinskega in kinolinskega ogrodja.	48
Preglednica 18: Koncentracije osnovnih raztopin, pri katerih so spojine topne v celičnem gojišču pri 25 °C.	51
Preglednica 19: Koncentracije spojin v celičnem gojišču, pri katerih ni citotoksičnosti, in delež DMSO v celičnem gojišču zaradi različnih volumnov raztopin spojin.	55
Preglednica 20: Vrednosti absorbcanc za spojino 20.	58
Preglednica 21: Analitika in lastnosti spojine 20.	59

I POVZETEK

Imunski sistem predstavlja glavno obrambo človeškega organizma proti škodljivim dejavnikom in tako preprečuje razvoj številnih bolezni. Temelj njegovega uspešnega delovanja je sposobnost prepoznavanja in ločevanja med tujimi in lastnimi molekulskimi vzorci. Tovrstno prepoznavanje vršijo receptorji za prepoznavo molekulskih vzorcev, od katerih ima osrednjo vlogo družina Toll-u podobnih receptorjev (TLR). Njihova aktivacija vodi v prepis številnih z vnetjem povezanih genov, ki kodirajo različne topne in površinsko vezane efektorske proteine, preko katerih organizem aktivno odstranjuje mikroorganizme in spremenjene maligne celice. Znanih je 13 različnih sesalskih TLR, med katerimi so TLR7 ključni za prepoznavanje in odgovor na viruse, ki vsebujejo RNK. Modulacija TLR7 s sintetičnimi nizkomolekularnimi ligandi z agonističnim delovanjem izkazuje izjemen terapevtski potencial na področju zdravljenja raka in virusnih obolenj, ki trenutno predstavljajo velik problem moderne družbe. V sklopu naše magistrske naloge smo sintetizirali derivate 2-trifluorometilkinazolina in 2-trifluorometilkinolina z uvedbo različnih aminov na mesto 4 s potencialnim agonističnim delovanjem na TLR7. Sintetizirane spojine in pridružene kupljene spojine smo biološko ovrednotili na transgenih celicah HEK-BlueTMhTLR7. Izvedli smo teste topnosti v DMSO in celičnem gojišču ter določili citotoksičnost na osnovi MTS-testa. Pri končnih koncentracijah spojin, pri katerih ni bilo več citotoksičnosti, smo izvedli preliminarne teste agonističnega delovanja. Na podlagi rezultatov biološkega testiranja nismo uspeli opredeliti odnosa med strukturo in delovanjem, kar lahko pripišemo visoki stopnji citotoksičnosti sintetiziranih spojin. V ta namen smo predlagali ustrezne modifikacije sinteznega postopka s ponovnim testiranjem agonističnega delovanja sintetiziranih spojin. Med izbranimi spojinami je agonistično delovanje izkazovala samo kupljena spojina **20** (*N*-ciklopropil-2-(trifluorometil)kinazolin-4-amin), kateri smo določili EC₅₀. S tem smo dokazali, da lahko derivati 2-trifluorometilkinazolina in 2-trifluorometilkinolina z uvedbo različnihaminskih substituentov na mesto 4 izkazujejo agonistično delovanje na TLR7. Optimizirani derivati bi bili lahko uporabni predvsem kot adjuvanti v cepivih ali kot topikalno uporabne učinkovine. V ustrezni formulaciji bi lahko omogočali učinkovitejšo in varnejšo imunoterapijo, uporabno za uspešnejše zdravljenje astme, rakavih in virusnih bolezni.

Ključne besede: TLR7, 2-trifluorometilkinazolin, 2-trifluorometilkinolin, rak, virusna obolenja

II ABSTRACT

Immune system represents the main human defense against harmful factors and prevents formation of many diseases. The key of successful defense is in differentiation between foreign and self molecular patterns. This kind of recognition is well-known for pattern recognition receptors, which include the family of Toll like receptors (TLR) as the most important member. Activation of TLR triggers transcription of inflammation-related genes that encode soluble and surface-bound proteins that orchestrate elimination of microorganisms and malignant cells of organism. Among 13 different mammalian TLR identified, TLR7 are crucial for recognition and response on RNA viruses. Modulation of TLR7 with synthetic small molecule ligands with agonist activity shows great therapeutic potential in the field of cancer and infectious diseases that represent one of the main health problems in modern society. Within our master thesis we synthesized 4-substituted 2-trifluoromethylquinazoline and 2-trifluoromethylquinoline derivatives with different amines that possess potential TLR7 agonist activity. In the second part we performed biological evaluation of synthesized and purchased compounds on transgenic cell line HEK-BlueTMhTLR7. We determined solubility of compounds in DMSO and cell culture, and evaluate cytotoxicity of each compound in a cell viability assay (MTS). After determination of final non-toxic concentrations of compounds we performed QUANTI-BlueTM reporter assay to test the potential TLR7 agonist activity. Based on the results from biological evaluation we couldn't obtain any information about structure activity relationship due to cytotoxicity of synthesized compounds. Therefore, we can only suggest suitable modifications of synthetic procedures and repetition of QUANTI-BlueTM reporter assay. Among evaluated compounds we proved the agonist activity for compound **20** (*N*-cyclopropyl-2-(trifluoromethyl)quinazolin-4-amine), for which we determined the EC₅₀ value. Accordingly, we proved that substitution with amines on position 4 can lead to TLR7 agonist activity of substituted 2-trifluoromethylquinazolines and 2-trifluoromethylquinolines. This type of compounds could be very useful as adjuvants or topical agents. In the appropriate formulation they could represent more effective and safer immunotherapy useful for treatment of asthma, cancer and viral diseases.

Key words: TLR7, 2-trifluoromethylquinazoline, 2-trifluoromethylquinoline, cancer, viral diseases

III SEZNAM OKRAJŠAV

Ab	protitelo
angl.	angleško
APC	antigen predstavljajoče celice (angl. antigen presenting cells)
cDMEM	popolno celično gojišče DMEM
Cmax	najvišja koncentracija glede na topnost in citotoksičnost
CpG DNK	sekvence citozinskega in gvaninskega nukleotida v zaporedju v nukleinski kislini
DAMP	s poškodbami povezani molekularni vzorci (angl. damage-associated molecular pattern)
DC	dendritična celica
DMEM	po Dulbeccu spremenjeno celično gojišče (angl. Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO	dimetil sulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
DPBS	celični pufer (angl. Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) (glej zgoraj)
dsRNK	dvoverižna ribonukleinska kislina (angl. double-stranded ribonucleic acid)
EC ₅₀	efektivna koncentracija snovi, ki izzove polovični maksimalni biološki odgovor
FBS	goveji serum zarodka (angl. fetal bovine serum)
HIV	virus humane imunsko pomanjkljivosti (angl. human immunodeficiency virus)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. high pressure liquid chromatography)

hTLR7	humani TLR7
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IL	interlevkin
IR	infrardeč
IRF7	interferon regulatorni dejavnik 7
<i>J</i>	sklopitvena konstanta
LAF	laminarni pretok zraka (angl. laminar air flow)
LPS	lipopolisaharid
LRR	z levcinom bogata regija (angl. leucin rich repeats)
PAMP	s patogeni povezani molekularni vzorci (angl. pathogen-associated molecular pattern)
MHC	poglavitni kompleks tkivne skladnosti (angl. major histocompatibility complex)
MS	masna spektroskopija (angl. mass spectroscopy)
MTS	reagent, sestavljen iz tetrazolijeve soli [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol]-MTS, in elektron sklopitvenega reagenta fenazin metosulfata
MyD88	diferenciacijski mieloidni protein 88 (angl. myeloid differentiation primary response protein 88)
NADH	reducirana oblika nikotinamid adenin dinukleotida
NADPH	reducirana oblika nikotinamid adenin dinukleotid fosfata
NF- κ B	jedrni dejavnik κ B (angl. nuclear factor κ B)
NK	celica naravna ubijalka
NLR	NOD-u podobni receptor (angl. NOD like receptor)

NMR	jedrska magnetna resonanca (angl. nuclear magnetic resonance)
pDC	plazmacitoidne dendritične celice
PMS	fenazin metosulfat
PRR	receptorji za prepoznavo molekulskih vzorcev (angl. pattern recognition receptors)
Rf	retencijski faktor
RNK	ribonukleinska kislina (angl. ribonucleic acid)
RLR	RIG-u podoben receptor (angl. RIG-I like receptor)
SAR	odnos med strukturo in delovanjem (angl. structure activity relationship)
SEAP	sekretorna embrionska alkalna fosfataza (angl. secreted embryonic alkaline phosphatase)
siRNK	mala interferenčna RNA
ssRNK	enoverižna ribonukleinska kislina (angl. single-stranded ribonucleic acid)
Tc	citotoksične celice T (angl. Cytotoxic T cells)
TFA	trifluoroocetna kislina (angl. trifluoroacetic acid)
Th celica	T-pomagalka (ang. T helper cell)
TIR	Toll/Il-1-receptor
TLC	tankoplastna kromatografija (ang. thin layer chromatography)
TLR	Toll-u podoben receptor (angl. Toll like receptor)
TNF	dejavnik tumorske nekroze (angl. tumor necrosis factor)
Treg	regulatorne celice T

1 UVOD

1.1 IMUNSKI SISTEM

Človek je vsakodnevno izpostavljen številnim škodljivim dejavnikom, med katere sodijo patogeni organizmi, kot so bakterije, virusi, glive, paraziti, ter škodljive snovi okolja. Skozi evolucijo se je zato razvil imunski sistem, ki uničuje organizmu škodljive dejavnike in tako ohranja stabilno notranje okolje. Kompleksen sistem obrambe sestavljajo komponente prirojene in pridobljene imunosti, ki tesno sodelujejo pri preživetju organizma in njegovem ravnovesju (1, 2).

Prirojen imunski sistem predstavlja prvo linijo obrambe proti mikroorganizmom in spremenjenim lastnim celicam. Mehanizmi prirojenega imunskega sistema se aktivirajo takoj ob nastopu infekcije ali poškodbe, zanje pa je značilno pomanjkanje specifičnosti. Sestavljajo ga:

- ❖ epitelijske pregrade, med katere sodijo koža, mukozne membrane respiratornega, genitourinarnega in gastrointestinalnega trakta, ki mehansko in kemijsko preprečujejo vdor mikroorganizmov v telo,
- ❖ topne molekule, prisotne v telesnih tekočinah (proteini sistema komplementa, proteini akutne faze, citokini), ter
- ❖ cirkulirajoče in tkivne celice.

Glavne celice prirojenega imunskega sistema so fagociti (makrofagi, nevtrofilci), dendritične celice (DC) in celice naravne ubijalke (NK). Celice s sproščanjem citokinov spodbujajo fagocitozo in vnetje. Na mestu vnetja levkociti in plazemski proteini aktivno odstranjujejo škodljive mikroorganizme. Prirojen imunski sistem večinoma ne uspe odstraniti škodljivega mikroba, zato se aktivirajo mehanizmi pridobljenega imunskega sistema (1–4).

Pridobljen imunski sistem predstavlja nadgradnjo prirojenemu imuskemu sistemu in je značilen samo za vretenčarje. Njegovi kompleksni obrambni mehanizmi so usmerjeni proti **specifičnemu antigenu** in za svoj razvoj potrebujejo dlje časa kot mehanizmi prirojene, nespecifične imunosti. Sestavljata ga celično posredovana in s protitelesi posredovana (humoralna) imunost. Glavne celice pridobljenega imunskega sistema so **limfociti** (celice T in

B). Pridobljeni imunski sistem se aktivira z *začetno fazo* predstavitve antigena nativnemu limfocitu T, ki ji sledi *končna faza* odgovora na antigen.

Limfociti B so nosilci **humoralne imunosti**. Po antigensko specifični aktivaciji se preobrazijo v efektorske celice-plazmatke, proizvajalke protiteles (Ab). Ab preko različnih mehanizmov odstranjujejo številne zunajcelične mikrobo.

Nosilci **celično posredovane imunosti** so **limfociti T**. Po predstavitvi antigena se nativni limfociti T preobrazijo v citotoksične celice T (Tc) ali v celice T-pomagalko (Th). Celice (Th) lahko diferencirajo v več podvrst, med katerimi imajo s sproščanjem zanje značilnih citokinov osrednjo vlogo:

- ❖ **celice Th1**, odgovorne za aktivacijo makrofagov in proliferacijo ter diferenciacijo Tc,
- ❖ **celice Th2**, usmerjene v humoralno imunost s proizvodnjo Ab, in
- ❖ **regulatorne celice T (Treg)**, ki preprečujejo pretiran imunski odgovor in nastanek avtoimunskih bolezni z zaviranjem celične in humoralne imunosti in z ohranjanjem tolerance do lastnih antigenov.

Poleg celične klonske ekspanzije je za pridobljen imunski sistem značilna tudi tvorba imunskega spomina preko spominskih celic (tipa B in T), ki ob ponovnem srečanju z antigenom zagotavljajo hitrejši in učinkovitejši imunski odziv (2, 5, 6).

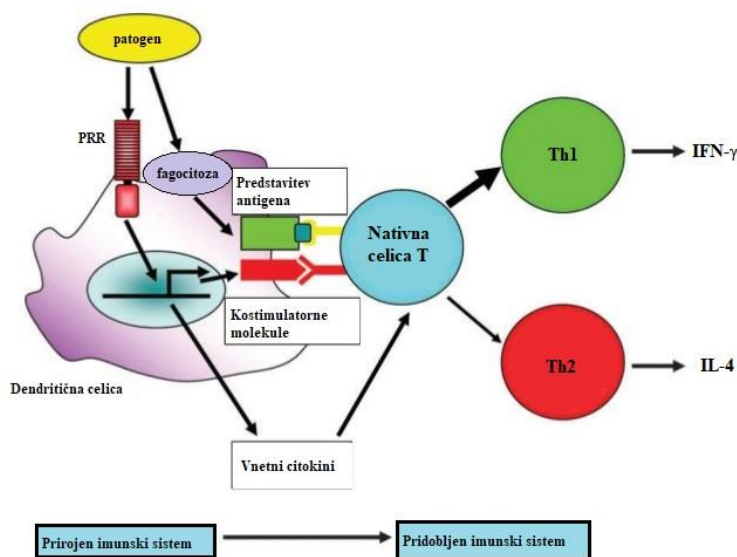
1.2 LOČEVANJE MED LASTNIMI IN TUJIMI MOLEKULAMI KOT DEL PRIROJENEGA IMUNSKEGA SISTEMA

Osnovna lastnost imunskega sistema je ločevanje med lastnimi in tujimi molekulami. V prirojenem imunskem sistemu to vlogo opravljajo zarodno kodirani receptorji za prepoznavo molekulskih vzorcev (**PRR**: pattern recognition receptors). PRR prepoznavajo **molekulske vzorce, značilne za patogene, (PAMP**: pathogen-associated molecular pattern) in **molekulske vzorce, povezane s poškodbami, (DAMP**: damage-associated molecular pattern). Izraz PAMP označuje skupino molekul, nujnih za preživetje mikrobov, ki v človeškem organizmu normalno niso prisotne. Mednje sodijo bakterijski lipopolisaharidi, virusne in bakterijske nukleinske kisline ter bakterijski peptidoglikan. Prirojen imunski sistem s PRR prepozna organizmu lastne molekule (DAMP). Slednje izzovejo imunski odgovor ob poškodbah, stresu in celični smrti, ko je njihova normalna koncentracija presežena. Med DAMP se uvrščajo proteini vročinskega šoka, fibrinogen, fibronektin in še nekatere druge molekule (7, 8). PRR izražajo

celice prirojene imunosti in celice fizičnih pregrad. Delujejo lahko kot prosti topni receptorji ali kot citosolni in transmembranski proteini. Med osrednje signalizirajoče PRR sodijo Toll-u podobni receptorji (TLR), NOD-u podobni receptorji (NLR) in RIG-u-podobni receptorji (RLR) (9, 10).

1.3 POVEZAVA PRIROJENEGA IN PRIDOBLJENEGA IMUNSKEGA ODZIVA

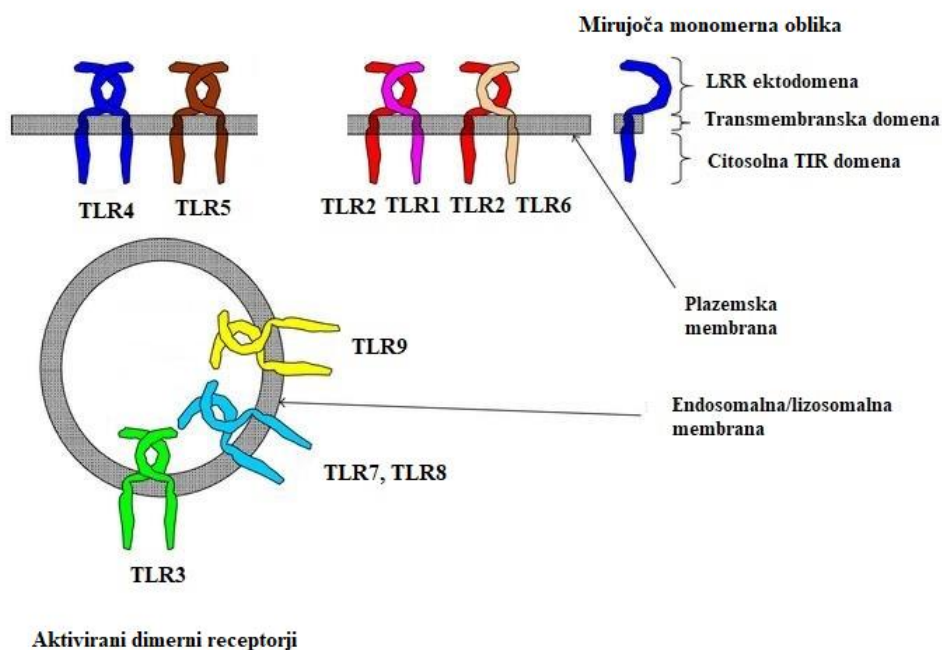
Ločitev imunskega sistema na prirojeno in pridobljeno imunost je umetna in služi lažji predstavitvi kompleksnih mehanizmov obrambe. Most med prirojeno in pridobljeno imunostjo predstavljajo fagociti z osrednjo vlogo DC preko izraženih PRR. Fagociti imunogene molekule prevzamejo, ustrezno predelajo in jih kot antigen predstavljajoče celice (APC) predstavijo na svoji površini. V okviru pridobljenega imunskega sistema jih s specifičnimi membranskimi receptorji lahko prepoznajo limfociti T in B in prosta Ab (5, 10, 11). Komunikacija med celicami poleg omenjenega direktnega stika sočasno poteka še preko topnih dejavnikov, citokinov. Citokini so polipeptidi z majhno molekulsko maso. Proizvajajo jih celice imunskega sistema kot odgovor na imunogeno molekulo. Delujejo lahko avtokrino, parakrino ali redkeje endokrino. Izražajo pleiotropnost, kar pomeni, da ima lahko en citokin različne ali celo nasprotujoče učinke. Glavni citokini imunskega sistema so interferoni (IFN), interleukini (IL) in dejavniki tumorske nekroze (TNF). Ustrezen imunski odgovor na imunogene molekule je tako rezultat dvosmerne komunikacije med celicami, površinsko vezanimi proteini in topnimi biogenimi dejavniki prirojene in pridobljene imunosti (slika 1) (4, 12).



Slika 1: Povezava prirojene in pridobljene imunosti, prirejeno po (13).

1.4 TOLL-U PODOBNI RECEPTORJI (TLR)

Prvi TLR z imenom *Drosophila* Toll je bil odkrit v vinski mušici *Drosophila*. Strukturne homologe tega receptorja so kmalu zatem odkrili tudi pri človeku (13). Znanih je deset tipov človeških TLR (TLR1–10), med katerimi vsak prepozna zase specifičen ligand. Glede na vrsto patogena, ki ga prepoznava, so ločeni na **zunaj-** in **znotrajcelične receptorje**. Prvi se nahajajo na **plazemski membrani**, kjer prepoznava proteinsko-lipidne komponente mikrobov, medtem ko znotrajcelični receptorji prepoznava nukleinske kisline mikrobov na **membrani endosoma**. Prostorska ločitev receptorjev v dve skupini omogoča selektivno prepoznavanje različnih vrst ligandov in pripomore k toleranci do lastnih antigenov (8, 14). Humane TLR (hTLR) sestavljajo tri funkcijsko različne domene. Zunanji del receptorja predstavlja **ektodomena z levcinom bogatih regij (LRR)**, ki je preko **transmembranske domene (TM)** povezana s citosolno **domeno receptorja Toll/IL-1 (TIR)**, odgovorno za prenos signalov (slika 2). Vsak tip receptorja se med seboj razlikuje po strukturi podkvasto oblikovane ektodomena LRR, na kateri poteka prepoznavanje ligandov. Prosti neaktivirani TLR so večinoma monomeri, le izjemoma so določene podvrste v obliki dimerov. Danes predstavljajo funkcijsko najbolj opredeljeno družino PRR z velikim potencialom na področju imunoterapije (15). V tabeli 1 so predstavljeni tipi TLR in njihove glavne lastnosti.



Slika 2: Prostorska razporeditev tipov hTLR, prirejeno po (16).

Preglednica 1: Pregled hTLR in njihovih naravnih ligandov (17, 18).

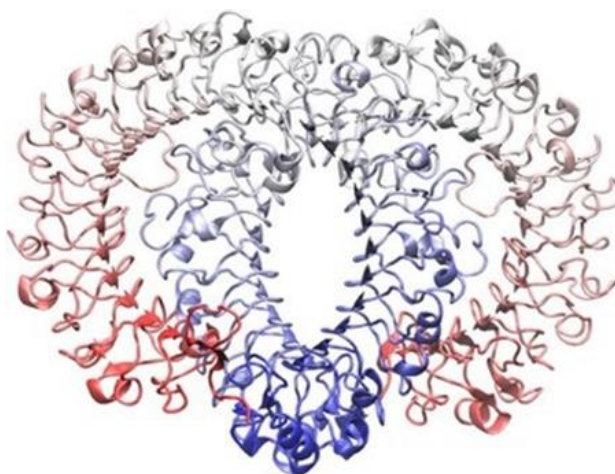
TLR	LOKACIJA	LIGAND	IZVOR LIGANDA
<u>TLR1</u>	Plazemska membrana	Triacilirani lipoproteini	Bakterije
<u>TLR2</u>	Plazemska membrana	Lipoproteini	Bakterije, virusi, paraziti, lastne molekule
<u>TLR3</u>	Endosomalna membrana	Dvoverižna RNK	Virusi
<u>TLR4</u>	Plazemska in endosomalna membrana	Lipopolisaharid (LPS)	Bakterije, virusi, lastne molekule
<u>TLR5</u>	Plazemska membrana	Flagelin	Bakterije
<u>TLR6</u>	Plazemska membrana	Diacilirani lipoproteini	Bakterije, virusi
<u>TLR7</u>	Endosomalna membrana	Enoverižna RNK	Virusi, bakterije, lastne molekule
<u>TLR8</u>	Endosomalna membrana	Enoverižna RNK	Virusi, bakterije, lastne molekule
<u>TLR9</u>	Endosomalna membrana	CpG DNK	Virusi, bakterije, protozoa, lastne molekule
<u>TLR10</u>	Plazemska membrana	Neznan	Neznan

1.5 TOLL-U PODOBNI RECEPTORJI 7 (TLR7)

Toll-u podobni receptorji 7 (TLR7) so transmembranski proteini endosoma. Pri človeku so izraženi v plazmacitoidnih dendritičnih celicah (pDC), limfocitih B, monocitih, makrofagih in epitelijskih celicah. Prepoznavajo virusno enoverižno RNA (ssRNK) in so pomembni senzorji virusnih okužb. Poleg naravnega liganda prepoznavajo še kratko interferenčno RNA (siRNK) in nizkomolekularne sintetične ligande (19, 20).

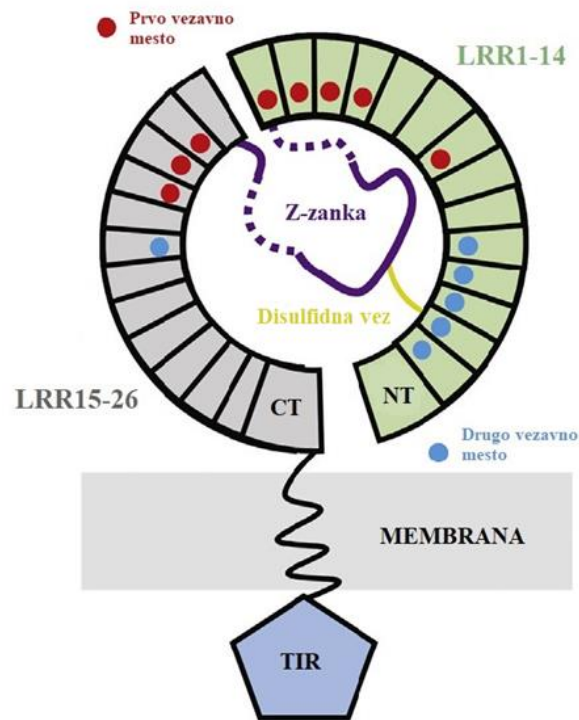
STRUKTURA TLR7

Ektodomena TLR7 je bila ovrednotena šele pred kratkim s kristalno strukturo rekombinantnega opičjega proteina TLR7 vrste *Macaca mulatta* (*Mm*), ki se v 96,8 % ujema s hTLR7. V strukturnih in biokemijskih študijah so preučevali komplekse omenjenega proteina z naravnimi in sintetičnimi ligandi in tako opredelili strukturo in naravo delovanja receptorja.

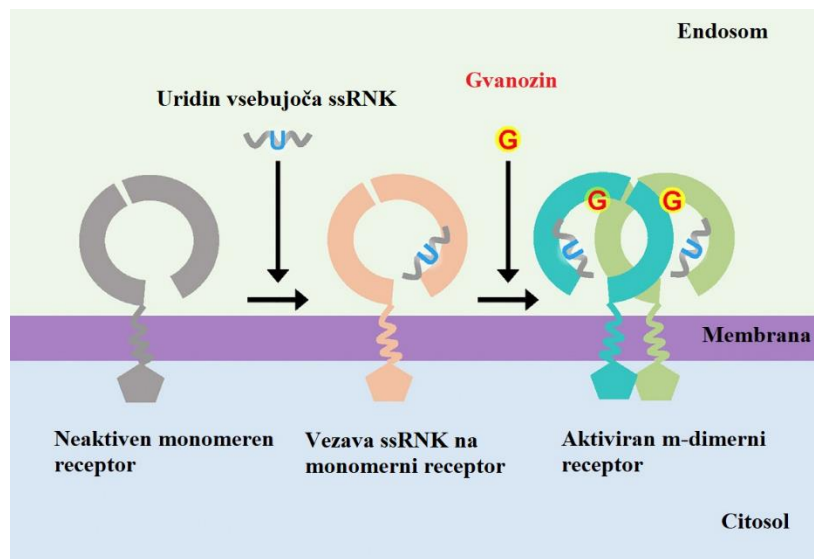


Slika 3: Proteinska struktura dimernega hTLR7 (19).

Ugotovili so, da je ektodomena sestavljena iz **šestindvajsetih enot LRR** in deluje pri prepoznavanju naravnega liganda ssRNK kot dvojni receptor. Na prvo vezavno mesto se veže gvanozin in s tem utrdi vezavo uridinskega zaporedja ssRNK na drugo vezavno mesto. Edinstven strukturni element, pomemben za vezavo ssRNK na TLR7, je **disulfidna vez**, ki povezuje N- in C-terminalna konca LRR-enot (slika 4). Sintetični ligandi receptor aktivirajo s samostojno vezavo na prvo vezavno mesto, brez interakcij s strukturnimi elementi drugega vezavnega mesta. Vezava liganda povzroči proteolizno cepitev **Z-zanke** in nastanek aktivnega m-dimernega receptorja, preko katerega poteka prenos signalov (slika 5) (19, 20).



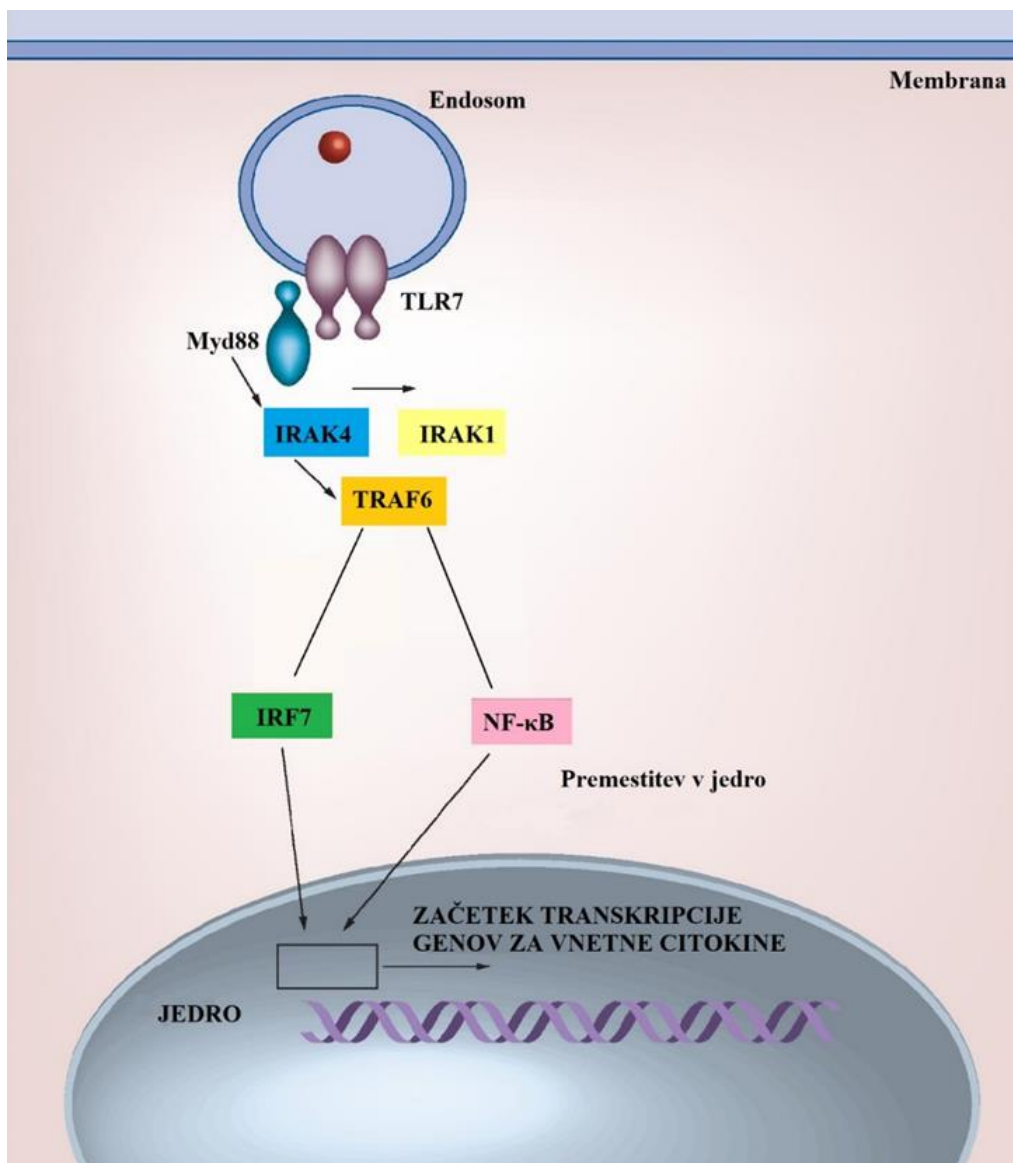
Slika 4: Shematski prikaz strukturne ureditve TLR7 na tri enote. Na podkvasti so z rdečimi in modrimi pikami označena področja prvega in drugega vezavnega mesta. Z-zanka se nahaja med LRR14 in LRR15. Transmembranska domena povezuje C-terminalni konec ektodomene s TIR-domeno, ki je shematsko prikazana s petkotnikom, prirejeno po (20).



Slika 5: Prikaz vezave naravnega liganda na hTLR7, prirejeno po (20).

PRENOS SIGNALOV PO AKTIVACIJI TLR7

Prenos signalov pri TLR7 poteka po **MyD88-odvisni signalni poti**. Začne se z vezavo istoimenskega adapterskega proteina MyD88 na citosolno TIR-domeno receptorja, kar omogoči nastanek kompleksa IRAK4-IRAK1. Nastali kompleks se veže na TRAF6, ki aktivira nastanek signalnega mediatorja IRF7 in transkripcijskega faktorja NF- κ B. Po njuni premestitvi v jedro se sproži izražanje genov za vnetne citokine, kemokine in interferone tipa I (slika 6) (13, 21).



Slika 6: Signalizacijska pot TLR7, prirejeno po (19).

1.6 TERAPEVTSKA PODROČJA AGONISTOV TLR7

Preučevanje modulacije TLR7 in terapevtskih učinkov ligandov je privedlo do spoznanja, da je aktivacija tega proteina terapevtsko uporabna za zdravljenje virusnih infekcij, alergij in rakavih obolenj (22).

RAK

Oslabljen imunski sistem je značilen za številna rakava obolenja. Neustrezen imunski odgovor posledično pripomore k neizbežnemu napredovanju bolezni. Ustrezen terapevtski pristop zato predstavlja aktivacija imunskega sistema, kar je možno z uporabo agonistov TLR7. Na trgu je zaenkrat registrirana samo topikalna formulacija imikvimoda z dokazanim protitumorskim in protivirusnim delovanjem. Njegova terapevtska učinkovitost je posledica delovanja IFN- α in drugih topnih dejavnikov vnetja. IFN- α neposredno zavira proliferacijo tumorskih celic, hkrati pa aktivira in privlači efektorske celice na mesto tumorja (23, 24). Efektorske celice (NK, Tc) s svojimi mehanizmi nato povzročijo lizo tumorskih celic. Zaradi filogenetske sorodnosti s TLR8 se je področje zdravljenja raka razširilo na dvojno delujoče agoniste TLR7/8. Resikvimod, dvojno delujoči agonist, izkazuje močnejše protivirusno in protitumorsko delovanje od svojega predhodnika imikvimoda. Uporaba agonistov TLR7 in TLR7/8 je usmerjena predvsem na področja zdravljenja različnih vrst kožnega raka in kronične limfatične levkemije. Poudariti je potrebno, da agonisti TLR7 pri nekaterih vrstah raka z zaviranjem apoptoze in regulatornega T-celičnega odziva spodbujajo angiogenezo in tumorsko rast. Njihova uporaba mora biti zato preiščljena in ustrezno načrtovana (25, 26).

VIRUSNE INFEKCIJE

Prepoznavanje virusne ssRNK s TLR7 je ključno za dolgotrajno in specifično virusno imunost. Receptor prepozna viruse, ki vsebujejo ssRNK, med drugimi tudi virus gripe, HIV, virus hepatitisa C in virus *Herpes Simplex*. Številni virusi se lahko s svojimi mehanizmi izognejo prepoznavanju imunskega sistema, kar ima za posledico upad interferonov tipa I. Primer takšnega virusa je virus hepatitisa C, ki se zdravi s kombinacijo intravensko apliciranega IFN- α in peroralne protivirusne učinkovine ribavirina. Omenjena kombinacijska terapija ima številne neželene stranske učinke. Agonisti TLR7 so predmet kliničnih preiskav za zdravljenje hepatitisa C. V prihodnosti bi lahko predstavljali ustrezno zamenjavo za obstoječ način zdravljenja. Prednost njihove uporabe je aktivacija obeh tipov imunosti preko IFN- α in

nastanek specifičnega protivirusnega T-celičnega odgovora. V primerjavi s kombinacijsko terapijo pa bi povzročali manj neželenih stranskih učinkov (26–28).

ASTMA

Alergijske bolezni, vključno z astmo, spremlja povečan nastanek odziva Th2. Močan celični odziv vrste Th2 lahko preko nastanka interferonov tipa I nevtralizirajo agonisti TLR7, ki preusmerijo imunski sistem k nastanku Th1-celičnega odgovora. Preko svojih mehanizmov so dokazano sposobni izzvati dlje časa trajajoče mirovanje bolezni, kar bi bilo koristno predvsem za zdravljenje astme v obdobju otroštva. Njihova uporaba je trenutno problematična zaradi neželenih sistemskih učinkov in neustreznega doseganja visokih lokalnih koncentracij. Razvoj ustrezne formulacije agonistov TLR7 predstavlja osrednji izziv na vseh omenjenih področjih njihove uporabe (22, 29).

NAČINI UPORABE AGONISTOV TLR7

S sposobnostjo aktivacije nastanka specifičnega T-celičnega odgovora in interferonov se agonisti TLR7 uvrščajo med pomembne razvijajoče se imunoterapevtike. Preučevana je tako njihova samostojna uporaba kot tudi uporaba v kombinaciji z različnimi že uveljavljenimi zdravili in metodami zdravljenja.

MONOTERAPIJA

Uspešnost uporabe agonistov TLR7 v obliki monoterapije se močno razlikuje glede na sistemsko ali lokalno uporabo. Sistemska uporaba agonistov TLR7 zaenkrat ne prinaša želenih terapevtskih učinkov. V terapevtskih koncentracijah izzove številne neželene učinke v obliki gripi podobnih simptomov. V nasprotju s sistemsko uporabo je lokalna uporaba varnejša in učinkovitejša, kar potrjuje topikalna uporaba trenutno edinega registriranega agonista TLR7 imikvimoda.

KOMBINACIJSKA TERAPIJA

Samostojna uporaba agonistov TLR7 je omejena, saj pri koncentracijah brez prisotnih stranskih učinkov izzveni tudi njihovo protivirusno in protitumorno delovanje. Najoptimalnejši način uporabe agonistov TLR7 je v obliki cepiv, kjer imajo vlogo adjuvansov. V cepivih se nahajajo v takšni koncentraciji, pri kateri ne povzročajo neželenih učinkov, izraženo pa je njihovo terapevtsko delovanje. Dodatek agonistov TLR7 v peptidna cepiva je povzročilo povečanje

protitumornega delovanja cepiv s povečanjem antigenske prezentacije, inhibicijo regulatornih mehanizmov imunosti in preko T-celičnih efektorskih mehanizmov (30). Pri tem je potrebno poudariti, da ima agonist večji učinek z vgradnjo v ustrezno formulacijo. Daleč največji terapevtski učinki so bili doseženi s konjugacijo agonista in peptida, z direktno vezavo na antigen (tumorski ali virusni) ter z vgradnjo v lipidno emulzijo ali mikrodelce. Na področju zdravljenja raka bi bili kot adjuvansi ustrezna dopolnilna terapija ustaljenim metodam zdravljenja, kot sta kemoterapija in ionizirajoče sevanje. Tako pri rakavih kot virusnih boleznih ima uporaba tovrstnih cepiv potencial za njihovo učinkovitejše zdravljenje, kar je podkrepljeno še z zmožnostjo tvorbe imunskega spomina (23, 31).

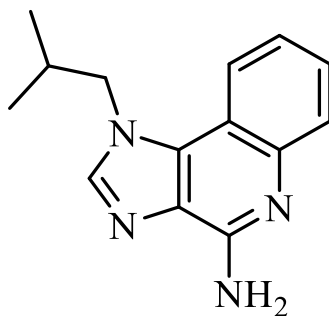
1.7 RAZVOJ AGONISTOV TLR7 KOT ZDRAVILNIH UČINKOVIN

Mnoge raziskave so usmerjene v načrtovanje učinkovitih sintetičnih ligandov aktivacije TLR7. Trenutno klinično obravnavani agonisti TLR7 so nukleozidni analogi, ki se kemijsko ločijo na **imidazokinolinske spojine** in **gvanozinske analoge**. Mnoge izmed teh spojin so bile razvite in obravnavane še pred odkritjem njihove tarče TLR7.

Imidazokinolinske spojine

Imikvimod-R837

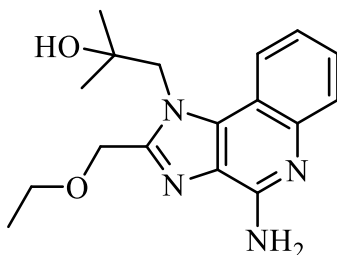
Edini agonist TLR7, odobren za zdravljenje, je imidazokinolinski derivat imikvimod (slika 7). Uporablja se kot lokalni imunomodulator za zdravljenje **genitalnih bradavic**, **bazalnoceličnega karcinoma** in **aktinične keratoze**. Aplicira se topikalno v obliki kreme (Aldara®, 5 % Imikvimod). Njegova uporaba je varna in enostavna za paciente. Trenutno je vključen v več kliničnih študij za zdravljenje različnih vrst raka in je klinično najbolj obravnavan agonist TLR7.



Slika 7: Struktura imikvimoda.

Resikvimod-R848

Nekateri sintetični ligandi poleg TLR7 sočasno aktivirajo tudi filogenetsko sorodni TLR8. Primer liganda z dvojnimi delovanjem je imidazokinolinaminski derivat resikvimod (slika 8). Izkazuje protitumorno in protivirusno delovanje. Nahaja se v različnih fazah kliničnih študij za zdravljenje genitalnega herpesa in kožnega limfoma celic T. Načrtovana je aplikacija v obliki gela (32, 33).



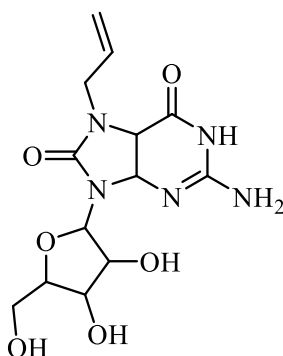
Slika 8: Struktura resikvimoda.

Gvanzinski analogi

Gvanzinski analogi s substitucijo na C8 ali C8 in N7 so imunomodulatorji s protitumornim delovanjem. Dvojno substituirani analogi imajo močnejši imunostimulatorni učinek.

Loxoribin

Potencialni ligand za zdravljenje različnih vrst raka. Je disubstituiran gvanzinski analog, specifičen za TLR7 (slika 9) (34).



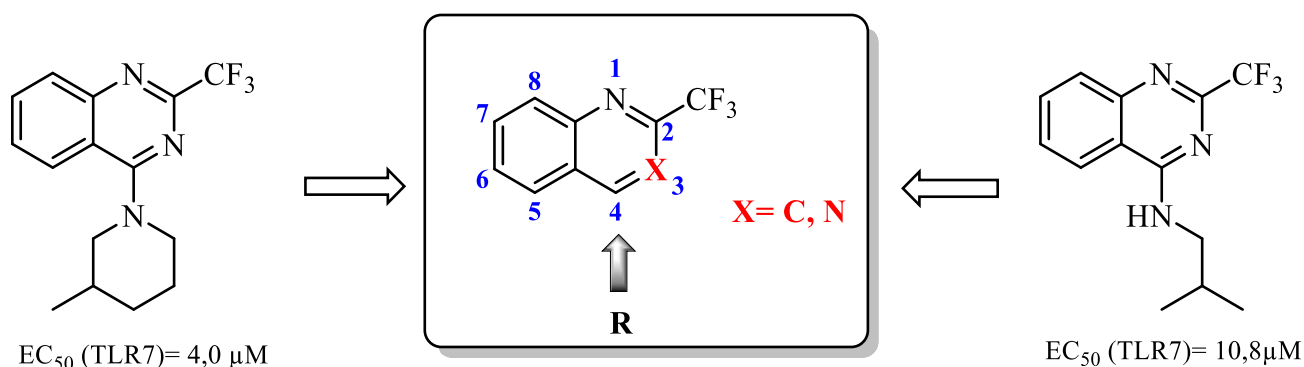
Slika 9: Struktura loxoribina.

2 NAMEN DELA

Namen našega dela je sinteza in biološko vrednotenje novih ligandov TLR7 na osnovi dveh spojin zadetkov iz virtualnega rešetanja (slika 10). Poleg sintetiziranih spojin bomo ovrednotili tudi agonistično delovanje kupljenih analogov spojin zadetkov.

1. Kemijska sinteza

Na Fakulteti za farmacijo bomo sintetizirali derivate 2-trifluorometilkinazolina in 2-trifluorometilkinolina z uvedbo različnih aminov na mesto 4. Uvedli bomo različne ligande glede na dostopne reagente. Z uvedbo bazičnega centra na mesto 4 bomo skušali doseči izražanje agonizma našim izbranim derivatom na podoben način kot je navedeno v literaturi (35).



Slika 10: Načrtovani novi derivati 2-trifluorometilkinazolina in 2-trifluorometilkinolina z različnimi substituenti na mestu 4 na osnovi dveh spojin zadetkov iz virtualnega rešetanja.

2. Biološko vrednotenje spojin na celičnih linijah

Na Zavodu za transfuzijsko medicino v Ljubljani bomo opravili biološka testiranja sintetiziranih spojin in ostalih kupljenih derivatov 2-trifluorometilkinazolina in 2-trifluorometilkinolina. Izvedli bomo teste topnosti v DMSO in celičnem gojišču ter določili citotoksičnost na osnovi MTS testa. Pri koncentracijah spojin, pri katerih ne bo več citotoksičnosti, bomo izvedli preliminarne teste agonističnega delovanja spojin na transgenih celicah HEK-BlueTMhTLR7. Aktivnim spojinam bomo določili tudi vrednosti EC₅₀.

3. Ugotavljanje odnosa med strukturo in delovanjem (SAR)

Na osnovi rezultatov biološkega testiranja bomo skušali opredeliti SAR 2-trifluorometilkinazolinskih in 2-trifluorometilkinolinskih derivatov na TLR7.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 KEMIJSKA SINTEZA

Reagenti in topila

Uporabljali smo topila in reagente proizvajalcev Acros Organics, Alkaloid, Carlo Erba reagents, Emsure, Gram-mol, Janssen, Merck, Sigma Aldrich (Aldrich, Fluka, Sigma), ki so ustrezali specifikacijam proizvajalca.

Pri sintezi smo uporabili naslednje reagente: 4-aminobenzilamin, amonijev hidroksid, antranilamid, 2-aminoetanol, etiltrifluoroacetat, 1-(2-aminoetil-piperidin), 2-bromoetan-1-ol, fosforil klorid (fosforjev (V) oksiklorid), izobutilamin, histaminijev diklorid, kalijev karbonat, 4-kloro-2-(trifluorometil)kinolin, metil glicinat hidroklorid, 1-metilpiperazin, morfolin, natrijev hidrogenkarbonat, natrijev etanolat, natrijev klorid, propilamin, toluen, tetrahidrofuran.

Topila, ki smo jih uporabljali pri sintezi in čiščenju spojin: absolutni etanol, acetonitril, etilacetat, eter/petroleter, dietileter, diklorometan, klorovodikova kislina, natrijev klorid, prečiščena voda, tetrahidrofuran, toluen.

Laboratorijska oprema

- ❖ Laboratorijska tehtnica Mettler Toledo PB403-S
- ❖ Rotavapor Buchi waterbath R-114
- ❖ Magnetno mešalo IKA RTC basic
- ❖ UV-svetilka Lamag cabinet II
- ❖ Grelna pištola Einhell
- ❖ Peč za sušenje

Kromatografske metode

Tankoplastna kromatografija (TLC)

Za stacionarno fazo smo uporabili plošče proizvajalca Merck, TLC Silica Gel 60 F₂₅₄, prevlečene s plastjo silikagela na aluminijskem nosilcu z dodatkom fluorescenčnega označevalca. Za detekcijo smo uporabili UV svetlobo valovne dolžine 254 nm in ninhidrin kot orositveni reagent.

Kolonska kromatografija

Za stacionarno fazo smo izbrali silikagel proizvajalca Merck, Silica Gel 60 z velikostjo delcev 0,040–0,063 mm in mobilno fazo eter/ petroleter (1/10).

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Čistost sintetiziranih spojin smo preverili z reverzno-fazno HPLC-kromatografijo na Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 system (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Uporabili smo kolono Agilent Eclipse Plus C18 z velikostjo delcev 5 μm in dimenzijami 4,6 x 150 mm. Analiza injiciranega vzorca (15 μL) je potekala pri 25 °C s pretokom mobilne faze 1,0 ml/min. Detekcija je potekala pri 254 nm. Čas posamezne analize je trajal 15 minut. Uporabili smo sledeč elucijski sistem:

- ❖ Zmes elucijskih topil: acetonitril (MeCN) in 0,1 % vodna raztopina trifluoroocetne kisline (TFA)
- ❖ Elucijski gradient:
 - 0–12 min: 10 % proti 90% MeCN v 0,1% TFA
 - 12–14 min: 90 % MeCN v 0,1% TFA
 - 14–15 min: 90 % proti 10 % MeCN v 0,1% TFA

Spektroskopske metode

Jedrska magnetna resonanca (NMR)

Spektre ^1H -NMR in ^{13}C -NMR smo posneli na spektrometru Bruker Avance DPX400 na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Vzorci so bili raztopljeni v CDCl_3 ali DMSO-d_6 , kot interni standard smo uporabili tetrametilsilan (TMS). Sklopitvene konstante (J) smo podali v hertzih (Hz), kemijske premike (δ) v »parts per million« (ppm). Obliko vrhov smo označevali s standardnimi okrajšavami za singlet (s), dublet (d), triplet (t), dublet tripletov (dt), triplet dubletov (td), dublet dubleta (dd), dublet dubletov (ddd) in multiplet (m). Spektre ^1H -NMR smo posneli pri 400 MHz, ^{13}C -NMR pri 100 MHz pri temperaturi 25 °C. Spektre smo interpretirali s programom MestReC 6.1.

Masna spektroskopija (MS)

Spektri so bili posneti na spektrometru Q-TOF Premier v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani. Opravljena je bila ESI HR-MS meritev ionov m/z .

Infrardeča spektroskopija (IR)

Spektre smo posneli na spektrometru Perkin Elmer Spectrum BX System FT-IR na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Določanje tališč

Tališča smo končnim spojinam določali na Koflerjevem talilnem mikroskopu z ogrevalno mizico proizvajalca Leica. Določena tališča so nekorrigirana.

Računalniška programska oprema

Za risanje struktur in reakcijskih shem smo uporabili računalniški program ChemBioDraw ULTRA 12, Cambridge Soft. Znanstvene članke in literaturo smo iskali z brskalnikoma PubMed in SciFinder.

3.2 BIOLOŠKO TESTIRANJE

Materiali

- ❖ Popolno celično gojišče (cDMEM) sestavljajo:
 - ❖ celično gojišče DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) z visoko vsebnostjo glukoze in L-glutamina, brez piruvata, z indikatorjem fenol rdeče (proizvajalec Gibco)
 - ❖ fetalni goveji serum (FBS) v koncentraciji 100 μ L/ml (proizvajalec Gibco)
 - ❖ antibiotik gentamicin v koncentraciji 1 μ L/ml (proizvajalec Sigma-Aldrich).
- ❖ celični pufer DPBS brez Ca^{2+} in Mg^{2+} (proizvajalec Gibco),
- ❖ reagent MTS (proizvajalec Promega),
- ❖ QUANTI-BlueTM-barvilo (proizvajalec InvivoGen),
- ❖ imikvimod Imiquimod (R837) (proizvajalec InvivoGen),
- ❖ topilo dimetilsuloksid (DMSO) (proizvajalec Wak-chemie Medical GmbH)
- ❖ celice HEK-BlueTM hTLR7 (proizvajalec Invivo Gen)
- ❖ Kleralcohol[®] 70 % v/v denaturiran etanol za razkuževanje površin (proizvajalec Ecolab)

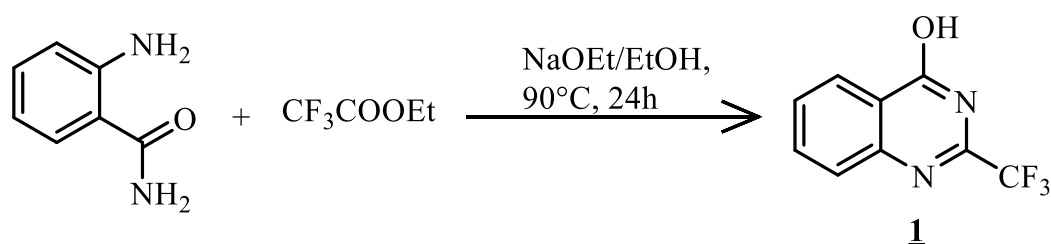
Laboratorijska oprema

- ❖ analitska tehtnica (proizvajalec Mettler Toledo),
- ❖ epice STEAM (proizvajalec Eppendorf),
- ❖ komora z laminarnim pretokom zraka (LAF-komora),
- ❖ centrifuga Sepatech Megafuge 1.0 (proizvajalec Heraeus),
- ❖ mala centrifuga MiniSpin (proizvajalec Eppendorf),
- ❖ mešalo vorteks Vibromix 114 (proizvajalec Tehnica),
- ❖ optični mikroskop Eclipse TE2000-S (proizvajalec Nikon),
- ❖ inkubator HERA Cell 150 (proizvajalec Heraeus),
- ❖ števec Vicell XR Cell viability analyzer (proizvajalec Beckman Coulter),
- ❖ pipete (proizvajalec Eppendorf),
- ❖ multikanalna pipeta (proizvajalec Eppendorf),
- ❖ elektronske pipete PIPETBOY Comfort (proizvajalec INTEGRA Biosciences),
- ❖ tipsi Physio Care (proizvajalec Eppendorf),
- ❖ serološke pipete 10 ml, 25 ml (proizvajalec Greiner CELLSTAR®),
- ❖ sterilne serumske pipete (proizvajalec Greiner Bio-One),
- ❖ 50 ml centrifugirke (proizvajalec Sarstedt),
- ❖ gojitvene posode TC Flask T75 in TC Flask T175 (proizvajalec Greiner),
- ❖ tkivne plošče z 48 polji (proizvajalec Thermo Fischer Scientific),
- ❖ mikrotitrna ploščica BioLite 96 Well Multidish (proizvajalec Thermo Fischer Scientific),
- ❖ optični čitalec mikrotitrskih ploščic Epoch (BioTek Instruments)
- ❖ stresalnik Vari-shaker (Dynatech),
- ❖ računalniški program Microsoft Excel 2007
- ❖ računalniški program BioTek Gen5 Data Analysis Software
- ❖ računalniški program GraphPad Prism 7.

4 EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 KEMIJSKA SINTEZA

4.1.1 Sinteza spojine 1:

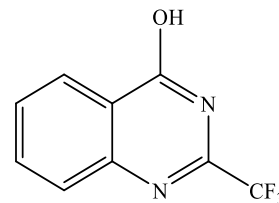


Slika 11: Reakcijska shema sinteze spojine 1.

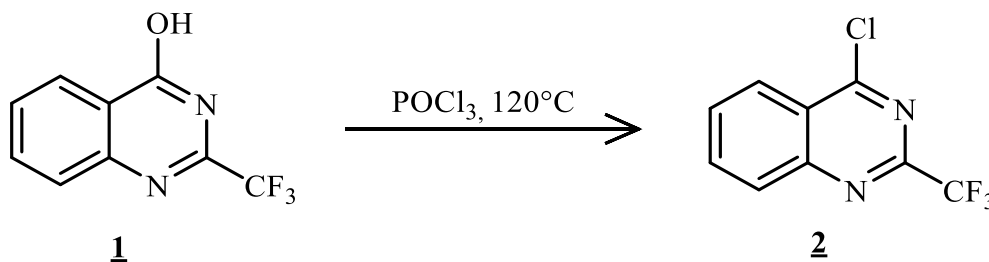
Najprej smo pripravili natrijev etanolat (NaOEt). V suho 250 ml bučko smo dodali absolutni etanol (100 ml) in vanj postopno dodajali vnaprej odmerjeno količino elementarnega natrija (2,783 g). Reakcija je po naravi eksotermna, zato smo bučko opremili s povratnim hladilnikom. Po končani reakciji med natrijem in etanolom smo dodali antranilamid (4,9 g) in etil trifluoroacetat (5 ml). Reakcijsko zmes smo segrevali in mešali na oljni kopeli 24 h pri refluxu pri 90°C . Po končani reakciji smo odparili topilo pod znižanim tlakom in dodali vodo (100 ml). pH pripravljene raztopine je znašal 13. Sledilo je nakisanje z 1 M HCl do pH 2–3. Nastalo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem in izolirani produkt prekrystalizirali tako, da smo dodali 70 ml absolutnega etanola in segrevali do vrenja. Reakcijsko zmes smo ohlajali na ledu, dokler niso izpadli kristali. Oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem in produkt pred tehtanjem sušili na sobni temperaturi 24 h. Dobili smo 2,443 g produkta.

Preglednica 2: Lastnosti in analitika spojine 1.

2-(TRIFLUOROMETIL)KINAZOLIN-4-OL	
Sestava	C ₉ H ₅ F ₃ N ₂ O
Molska masa	214,15 g/mol
Opis	Beli kristali
Izkoristek	31,7 %
Rf (DKM/EtOH) = 9 : 1	0,60
Temperatura tališča	192–195 °C
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ(ppm)	δ(ppm) 7,69 (ddd, <i>J</i> ₁ = 1,2 Hz, <i>J</i> ₂ = 7,0 Hz, <i>J</i> ₃ = 8,1 Hz; 1H, Ar-H); 7,83 (dd, <i>J</i> ₁ = 0,4 Hz, <i>J</i> ₂ = 8,1 Hz; 1H, Ar-H); 7,93 (ddd, <i>J</i> ₁ = 1,5 Hz, <i>J</i> ₂ = 7,2 Hz, <i>J</i> ₃ = 8,6 Hz , 1H, Ar-H); 8,20 (ddd, <i>J</i> ₁ = 0,4 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,4 Hz, <i>J</i> ₃ = 8,0 Hz , 1H, Ar-H); 13.60 (s, 1H, OH)
IR (cm ⁻¹)	3051, 2360, 2000, 1683, 1616, 1560, 1489, 1470, 1394, 1353, 1305, 1265, 1250, 1193, 1166, 1136, 1111, 1030, 991, 974, 957, 886, 875, 849, 803, 772, 755, 691, 632, 585, 557, 522, 509 cm ⁻¹
MS	Izračunana vrednost za C ₉ H ₅ F ₃ N ₂ O: 214,147 [M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z): 214,25
HPLC (t _r)	6,380 min (99,58 % čistost)



4.1.2 2. stopnja:sinteza spojine 2:

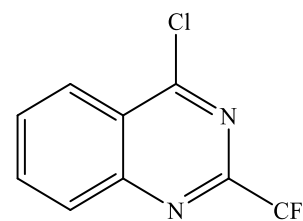


Slika 12: Reakcijska shema sinteze spojine 2.

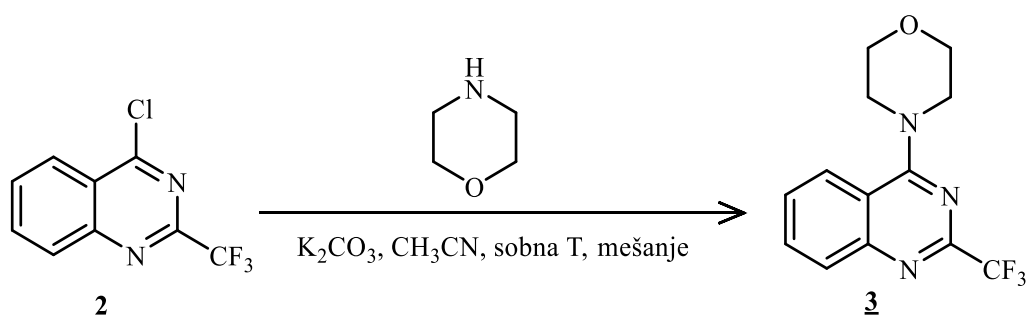
Spojino **1** (2,443 g) smo prenesli v visokotlačni reaktor (angl. sealed tube). Dodali smo POCl₃ (50 ml) in zmes segrevali pri 120 °C čez noč. Po končani reakciji smo »sealed tube« ohlajali na ledu. V suho 250 ml bučko smo k reakcijski zmesi dodali toluen (100 ml) in odparili topilo pod znižanim tlakom. Oljnat zaostanek smo raztopili v etilacetatu (150 ml). Organsko fazo smo spirali z nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (2x50 ml) in nasičeno vodno raztopino NaCl (1x 50 ml). Po prvem spiranju z nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ smo zmes mešali na ledu 15 min, da smo izgnali CO₂. Po spiranju smo organsko fazo sušili nad Na₂SO₄. Raztopino smo filtrirali in topilo odparili pod znižanim tlakom. Produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo, kot mobilno fazo smo uporabili eter/petroleter (1 : 10). Dobili smo 2,180 g produkta.

Preglednica 3: Lastnosti in analitika spojine 2.

4-KLORO-2-(TRIFLUOROMETIL)KINAZOLIN	
Sestava	C ₉ H ₄ ClF ₃ N ₂
Molska masa	232,59 g/mol
Opis	Rumeno-zeleni igličasti kristali
Izkoristek	79,4 %
R _f (DKM/EtOH) = 9 : 1	0,85
Temperatura tališča	56-58 °C
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ(ppm)	δ(ppm) 8,04-8,11 (m, 1H, Ar-H), 8,27-8,29 (m, 1H, Ar-H), 8,42 (td, <i>J</i> ₁ = 0,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 8,4 Hz; 1H, Ar-H);
IR (cm ⁻¹)	3051, 2959, 1616, 1560, 1489, 1470, 1394, 1353, 1305, 1265, 1250, 1194, 1166, 1250, 1194, 1166, 1136, 1111, 1029, 991, 974, 876, 861, 849, 839, 803, 772, 755, 736, 691, 632, 585, 556, 522, 509 cm ⁻¹
HPLC (t _r)	10,130 min (98,19 % čistost)



4.1.3 Sinteza spojine 3:



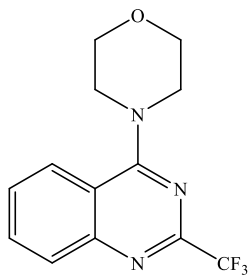
Slika 13: Reakcijska shema sinteze spojine 3.

Natehtali smo spojino 2 (0,80 mmol, 0,186 g) in K_2CO_3 (1,20 mmol, 0,166 g) in ju raztopili v acetonitrilu (8 ml) (postopek A). Bučko smo opremili s septumom in balonom z argonom, s čimer smo preprečili vdor zračne vlage. Po dodatku morfolina (0,88 mmol, 80 μl) smo reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi 24 h.

Po poteku reakcije smo odparili topilo pod znižanim tlakom in preostanku dodali prečiščeno vodo (20 ml) in spirali z etilacetatom (2x40 ml). Združene organske faze smo spirali z nasičeno vodno raztopino NaCl (20 ml), sušili nad Na_2SO_4 , filtrirali in topilo odparili pod znižanim tlakom (postopek B).

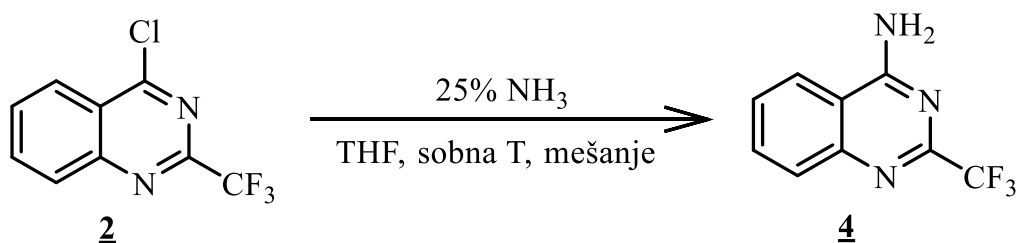
Produkt smo prekristalizirali tako, da smo dodali majhno količino vode in segrevali do vrenja. Reakcijsko zmes smo ohlajali na ledu, da je prišlo do izpadanja kristalov. Raztopino smo odfiltrirali z odsesavanjem in produkt sušili pri sobni temperaturi 24 h. Dobili smo 0,198 g produkta.

Preglednica 4: Lastnosti in analitika spojine 3.

4-(2-(TRIFLUOROMETIL)KINAZOLIN-4-IL)MORFOLIN		
Sestava	$\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}$	
Molska masa	283,25 g/mol	
Opis	Beli kristali	
Izkoristek	87,4 %	
R _f (DKM/EtOH) = 9 : 1	0,74	
Temperatura tališča	98–100 °C	

¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃): δ(ppm)	δ(ppm) 3,83–3,86 (m, 4H, 2 x CH ₂); 3,88–3,91 (m, 4H, 2 x CH ₂); 7,52 (ddd, <i>J</i> ₁ = 1,3 Hz, <i>J</i> ₂ = 7,0 Hz, <i>J</i> ₃ = 8,3 Hz; 1H, Ar-H); 7,77 (ddd, <i>J</i> ₁ = 1,4 Hz, <i>J</i> ₂ = 7,0 Hz, <i>J</i> ₃ = 8,4 Hz, 1H, Ar-H); 7,88 (dd, <i>J</i> ₁ = 0,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 8,4 Hz; 1H, Ar-H); 7,96 (dd, <i>J</i> ₁ = 0,7 Hz, <i>J</i> ₂ = 8,4 Hz, 1H, Ar-H)
¹³ C-NMR (100 MHz, CDCl ₃): δ(ppm)	δ(ppm) 49,9; 66,5; 115,9; 119,8 (q, <i>J</i> _{C-F} = 275,9 Hz); 124,7; 126,9; 129,3; 133,3; 151,4; 151,5 (q, <i>J</i> _{C-F} = 32,1 Hz); 164,6
IR (cm ⁻¹)	2967, 2900, 2860, 1614, 1573, 1551, 1507, 1448, 1403, 1360, 1343, 1306, 1275, 1245, 1187, 1126, 1113, 1101, 1068, 1036, 1016, 954, 877, 856, 822, 808, 791, 770, 757, 744, 713, 691, 685, 639, 621, 592, 546, 526, 516 cm ⁻¹
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za: C ₁₃ H ₁₂ F ₃ N ₃ O: 284,1011 [M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z): 284,1013
HPLC (t _r)	9,090 min (100,00 % čistost)

4.1.4 Sinteza spojine **4**:

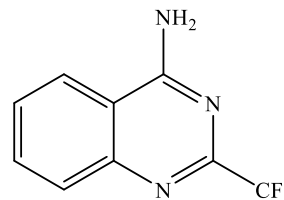


Slika 14: Reakcijska shema sinteze spojine **4**.

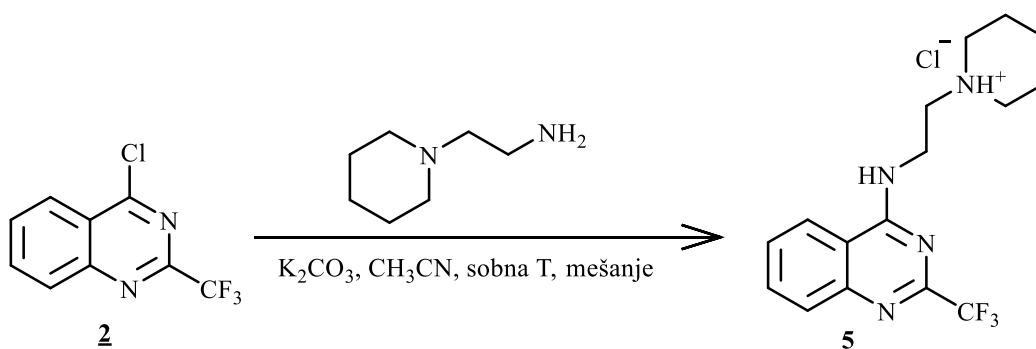
Natehtali smo spojino **2** (0,80 mmol, 0,186 g) in jo raztopili v THF (8 ml). Po dodatku topila smo dodali 500 µl 25 % vodne raztopine amonijaka. Zmes smo mešali pri sobni temperaturi 24 h. Izolacijo smo izvedli po postopku **B**. Produkt smo prekrizalizirali. Dodali smo dietileter in eter v razmerju 1 : 1 in segrevali do vrenja. Raztopino smo ohlajali v zmrzovalniku, da je prišlo do izpadanja kristalov. Oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem in produkt sušili pri sobni temperaturi 24 h. Dobili smo 0,098 g produkta.

Preglednica 5: Lastnosti in analitika spojine 4.

2-(TRIFLUOROMETIL)KINAZOLIN-4-AMIN	
Sestava	C ₉ H ₆ F ₃ N ₃
Molska masa	213,16 g/mol
Opis	Bela amorfna snov
Izkoristek	57,5 %
Rf (DKM/EtOH) = 9 : 1	0,74
Temperatura tališča	208–210 °C
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃): δ(ppm)	δ(ppm) 6,19 (br s, 2H, NH ₂); 7,62-7,68 (m, 1H, Ar-H); 7,83 (dd; <i>J</i> ₁ = 0,8 Hz, <i>J</i> ₂ = 8,3 Hz, 1H, Ar-H); 7,87-7,92 (m; 1H, Ar-H); 8,03 (d; <i>J</i> = 8,3 Hz, 1H, Ar-H)
¹³ C-NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ(ppm)	δ(ppm) 114,3; 120,0 (q, <i>J</i> _{C-F} = 276,3 Hz), 123,7; 127,5; 127,9; 134,0; 148,6; 152,1(q, <i>J</i> _{C-F} = 34,1 Hz); 162,9
IR (cm ⁻¹)	3517, 3338, 3153, 2988, 1664, 1652, 1616, 1581, 1510, 1468, 1415, 1406, 1386, 1339, 1286, 1258, 1204, 1177, 1147, 1125, 1048, 955, 775, 761, 736, 724, 600, 535 cm ⁻¹
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za: C ₉ H ₆ F ₃ N ₃ :214,0592[M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z): 214,0593
HPLC (t _r)	6,407 min (100,00 % čistost)



4.1.5 Sinteza spojine 5:

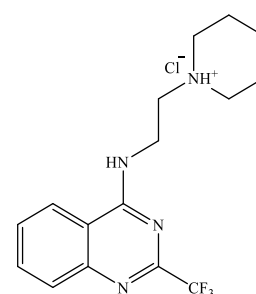


Slika 15: Reakcijska shema sinteze spojine 5.

Po izvedbi postopka **A** smo reakcijski zmesi dodali 1-(2-aminoetil)-piperidin (0,08 mmol, 0,125 ml). Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi 24 h. Po poteku reakcije smo odparili topilo pod znižanim tlakom. Po odparevanju smo dobili oljnat zaostanek, ki smo mu dodali dietileter (50 ml). Zmes smo kvantitativno razdelili v dve 25 ml bučki in v obeh odparili topilo pod znižanim tlakom. Po odparevanju smo v vsako dodali dietileter (5 ml) in 2 M HCl (1 ml). Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi 24 h in nato filtrirali z odsesavanjem. Dobili smo 0,040 g produkta.

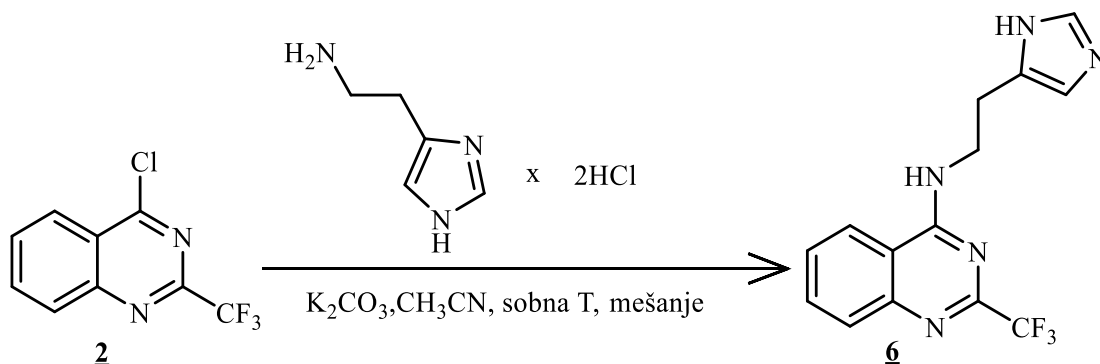
Preglednica 6: Lastnosti in analitika spojine **5.**

<i>N</i> -(2-(PIPERIDIN-1-IL)ETIL)-2-(TRIFLUOROMETIL)KINAZOLIN-4-AMIN	
Sestava	C ₁₆ H ₁₉ F ₃ N ₄
Molska masa	324,35 g/mol
Opis	Rumeno-oranžna amorfna snov
Izkoristek	15,4 %
R _f (DKM/EtOH) = 9 : 1	0,28
Temperatura tališča	94–96 °C
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃): δ(ppm)	δ(ppm); 1,46-1,53 (m, 2H, CH ₂); 1,60-1,66 (m, 4H, 2xCH ₂); 2,22-2,29 (m, 2H, CH ₂); 2,44-2,52 (m, 3H, CH ₂ in NH ⁺); 2,64-2,68 (m, 2H, CH ₂); 3,71–3,76 (m, 2H, CH ₂); 7,27 (br s, 1h NH); 7,56(ddd, <i>J</i> ₁ = 1,2 Hz, <i>J</i> ₂ = 7,1 Hz, <i>J</i> ₃ = 8,3 Hz, 1H, Ar-H); 7,78 (ddd, <i>J</i> ₁ = 1,4 Hz, <i>J</i> ₂ = 7,1 Hz, <i>J</i> ₃ = 8,4 Hz, 1H, Ar-H); 7,83 (ddd, <i>J</i> ₁ = 0,5 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,3 Hz, <i>J</i> ₃ = 8,3 Hz, 1H, Ar-H); 7,94 (dd, <i>J</i> ₁ = 0,4 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,1 Hz, <i>J</i> ₃ = 8,4 Hz, 1H, Ar-H)
¹³ C-NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ(ppm)	δ(ppm) 23,9; 25,5; 38,2; 54,0; 56,9; 114,8; 119,9 (q, <i>J</i> _{C-F} = 276,2 Hz); 122,8; 127,6; 128,0; 133,6; 148,1; 151,8 (q, <i>J</i> _{C-F} = 34,0 Hz); 160,4
IR (cm ⁻¹)	3339, 2930, 2854, 2796, 1618, 1588, 1549, 1493, 1475, 1443, 1411, 1367, 1350, 1338, 1313, 1282, 1253, 1226, 1187, 1167, 1125, 1085, 1056, 1044, 1011, 962, 905, 885, 867, 843, 790, 762, 734, 682, 649, 607, 582, 561, 534, 510 cm ⁻¹



ESI-HRMS	Izračunana vrednost za: C ₁₆ H ₁₉ F ₃ N ₄ : 325,1646 [M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z): 325,1640
HPLC (t _r)	6,347 min (99,38 % čistost)

4.1.6 Sinteza spojine **6**:



Slika 16: Reakcijska shema sinteze spojine **6**.

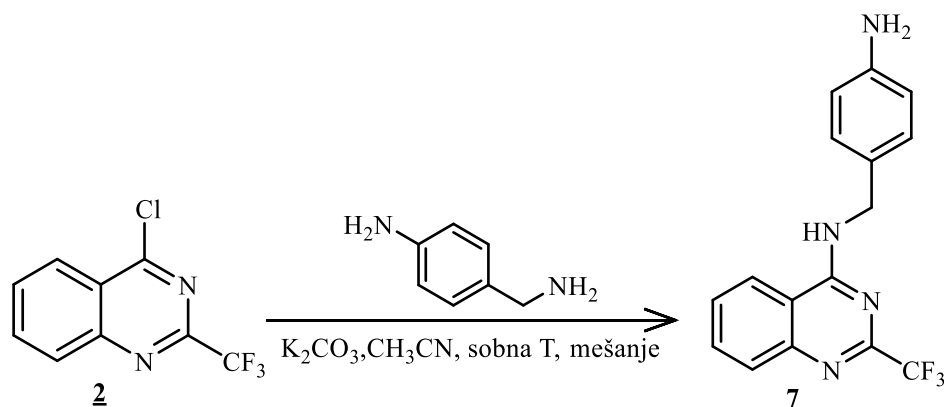
Po izvedbi postopka **A** smo reakcijski zmesi dodali histaminijev diklorid (0,88 mmol, 0,162 g). Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi 24 h. Izolacijo smo izvedli po postopku **B**. Po izolaciji smo spojino prekrystalizirali s segrevanjem v dietiletru. Vrelo raztopino smo nato ohlajali na ledu, da je prišlo do izpadanja kristalov. Oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem. Produkt smo sušili na sobni temperaturi 24 h. Dobili smo 0,174 g produkta.

Preglednica 7: Lastnosti in analitika spojine **6**.

N-(2-(1H-IMIDAZOL-5-IL)ETIL)-2-(TRIFLUOROMETIL)KINAZOLIN-4-AMIN	
Sestava	C ₁₄ H ₁₂ F ₃ N ₅
Molska masa	307,28 g/mol
Opis	Beli sipki kristali
Izkoristek	70,7 %
R _f (DKM/EtOH) = 9 : 1	0,28
Temperatura tališča	204–206 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta(\text{ppm})$	$\delta(\text{ppm})$; 2,92 (t, $J = 7,3$ Hz; 2H; CH_2); 3,79 (dt, $J_1 = 6,7$ Hz, $J_2 = 5,9$, 2H; CH_2); 6,84 (br s, 1H, imidazol-H); 7,55 (s, 1H, imidazol-NH); 7,66 (ddd, $J_1 = 1,4$ Hz, $J_2 = 6,8$ Hz, $J_3 = 8,2$ Hz, H, Ar-H); 7,83 (dd, $J_1 = 1,1$ Hz, $J_2 = 8,3$ Hz, H, Ar-H); 7,88 (ddd, $J_1 = 1,2$ Hz, $J_2 = 6,8$ Hz, $J_3 = 8,2$ Hz, H, Ar-H); 8,31 (d, $J = 7,8$ Hz, H-Ar); 8,92 (t, $J = 5,3$ Hz, H, NH)
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): $\delta(\text{ppm})$	$\delta(\text{ppm})$; 26,0; 41,0; 114,9; 116,5; 120,0 (q, $J_{\text{C-F}} = 276,6$ Hz); 122,9 127,7; 128,1; 129,7; 133,6; 134,7; 151,9 (q, $J_{\text{C-F}} = 34,2$ Hz); 148,1; 160,4
IR (cm^{-1})	3102, 2983, 2860, 1578, 1551, 1503, 1469, 1454, 1416, 1354, 1333, 1280, 1259, 1236, 1207, 1187, 1178, 1136, 1128, 1105, 1053, 999, 965, 928, 873, 856, 816, 806, 771, 731, 683, 656, 601, 560, 518 cm^{-1}
ESI-HRMS	Izračunano za: $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{N}_5$: 308,1123 $[\text{M}+\text{H}]^+$ Izmerjena vrednost (m/z): 308,1121
HPLC (t_r)	5,567 min (100,00 % čistost)

4.1.7 Sinteza spojine 7:

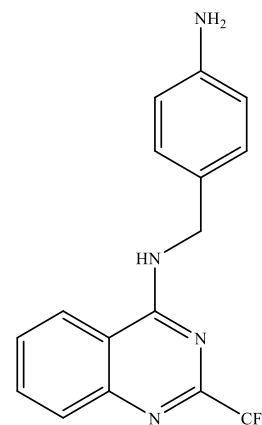


Slika 17: Reakcijska shema sinteze spojine 7.

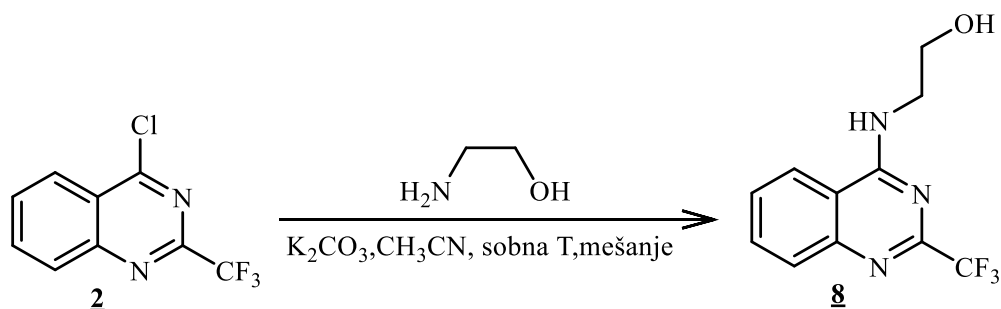
Po izvedbi postopka **A** smo reakcijski zmesi dodali 4-aminobenzilamin (0,80 mmol, 0,10 ml). Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi 24 h. Izolacijo smo izvedli po postopku **B**. Po odparevanju smo dobili oljnat zaostanek, ki je kristaliziral. Dobili smo 0,246 g produkta.

Preglednica 8: Lastnosti in analitika spojine 7.

<i>N</i> -(4-(AMINOMETIL)FENIL)-2-(TRIFLUOROMETIL)KINAZOLIN-4-AMIN	
Sestava	C ₁₆ H ₁₃ F ₃ N ₄
Molska masa	318,30 g/mol
Opis	Svetlo rjava amorfna snov
Izkoristek	96,6 %
R _f (DKM/EtOH) = 9 : 1	0,43
Temperatura tališča	191–193 °C
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃): δ(ppm)	δ(ppm) 3,71 (br s, 2H, NH ₂); 4,75 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 2H, CH ₂); 6,12 (t, <i>J</i> = 4,6 Hz, 1H, NH); 6,65–6,69(m, 2H, 2xAr-H); 7,20–7,24 (m, 2H, 2xAr-H); 7,53 (ddd, <i>J</i> ₁ = 1,2 Hz, <i>J</i> ₂ = 7,0 Hz, <i>J</i> ₃ = 8,3 Hz, 1H, Ar-H); 7,70 (dd, <i>J</i> ₁ = 0,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 8,4 Hz, 1H, Ar-H); 7,79 (ddd, <i>J</i> ₁ = 1,4 Hz, <i>J</i> ₂ = 7,0 Hz, <i>J</i> ₃ = 8,4 Hz, 1H, Ar-H); 7,96 (dd, <i>J</i> ₁ = 0,7 Hz, <i>J</i> ₂ = 8,4 Hz, 1H, Ar-H)
¹³ C-NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ(ppm)	δ(ppm) 43,8; 113,6; 114,9; 120,0 (q, <i>J</i> _{C-F} = 276,3 Hz); 123,0; 125,3; 127,6; 128,0; 128,9; 133,6; 147,8; 148,2; 151,8 (q, <i>J</i> _{C-F} = 34,04 Hz); 160,2
IR (cm ⁻¹)	3418, 3305, 2987, 1614, 1585, 1551, 1518, 1495, 1413, 1370, 1325, 1254, 1220, 1192, 1179, 1158, 1114, 978, 922, 837, 763, 728, 717, 680, 600, 577, 551 cm ⁻¹
ESI-HRMS	Izračunano za: C ₁₆ H ₁₃ F ₃ N ₄ :319,1171 [M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z): 319,1173
HPLC (t _r)	6,423 min (98,35 % čistost)



4.1.8 Sinteza spojine **8**:



Slika 18: Reakcijska shema sinteze spojine **8**.

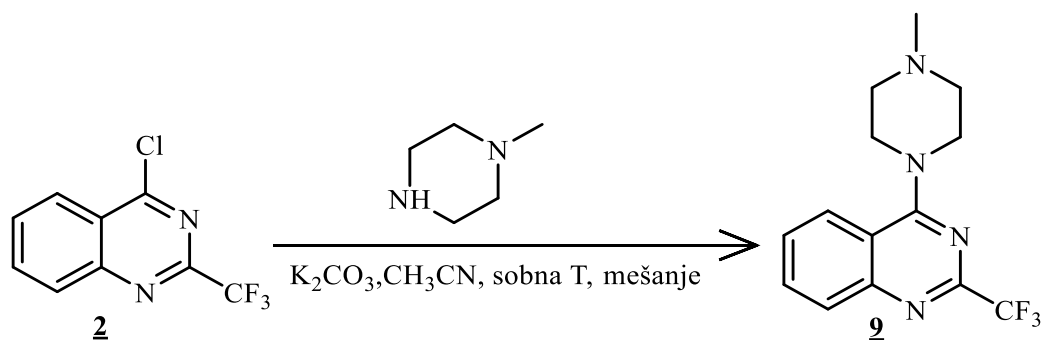
Po izvedbi postopka **A** smo reakcijski zmesi dodali 2-aminoetanol (0,8 mmol, 53,113 μ l). Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi 24 h. Izolacijo smo izvedli po postopku **B**. Po odparevanju smo izvedli kristalizacijo. Dodali smo dietileter (70 ml) in segrevali do vrenja. Vrelo raztopino smo nato ohlajali na ledu, da je prišlo do izpadanja kristalov. Oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem. Dobili smo 0,150 g produkta.

Preglednica 9: Lastnosti in analitika spojine **8**.

2-((2-(TRIFLUOROMETIL)KINAZOLIN-4-IL)AMINO)ETAN-1-OL		
Sestava	$\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}$	
Molska masa	257,22 g/mol	
Opis	Beli kristali	
Izkoristek	72,9 %	
Rf (DKM/EtOH) = 9 : 1	0,26	
Temperatura tališča	188–190 °C	
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm)	δ (ppm) 3,62–3,70 (m, 4H, 2xCH ₂); 4,86 (t, $J = 5,3$ Hz, 1H, OH); 7,65 (ddd, $J_1 = 1,5$ Hz, $J_2 = 6,8$ Hz, $J_3 = 8,2$ Hz, 1H, Ar-H); 7,80–7,87 (m, 2H, Ar-H), 8,36 (d, $J_1 = 8,2$ Hz, 1H, Ar-H); 8,82 (t, $J_1 = 5,0$ Hz, 1H, NH)	
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm)	δ (ppm) 43,6; 58,7; 115,0; 120,0 (q, $J_{\text{C-F}} = 276,0$ Hz); 123,1; 127,6; 128,0; 133,6; 148,1; 151,8 (q, $J_{\text{C-F}} = 34,3$ Hz); 160,6	

IR (cm ⁻¹)	3282, 3143, 2848, 2771, 1597, 1557, 1505, 1468, 1455, 1419, 1363, 1329, 1263, 1222, 1190, 1171, 1119, 1072, 964, 876, 802, 794, 769, 738, 676, 641, 606, 569, 536, 514 cm ⁻¹
ESI-HRMS	Izračunano za: C ₁₁ H ₁₀ F ₃ N ₃ O: 258,0854 [M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z): 258,0858
HPLC (t _r)	6,530 min (100,00 % čistost)

4.1.9 Sinteza spojine **9**:

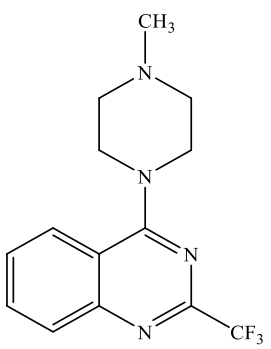


Slika 19: Reakcijska shema sinteze spojine **9**.

Po izvedbi postopka **A** smo reakcijski zmesi dodali 1-metilpiperazin (0,80 mmol, 98,0 µl). Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi 24 h. Izolacijo smo izvedli po postopku **B**. Po odparevanju pri sobni temperaturi nastanejo rumeni kristali. Dobimo 0,216 g produkta.

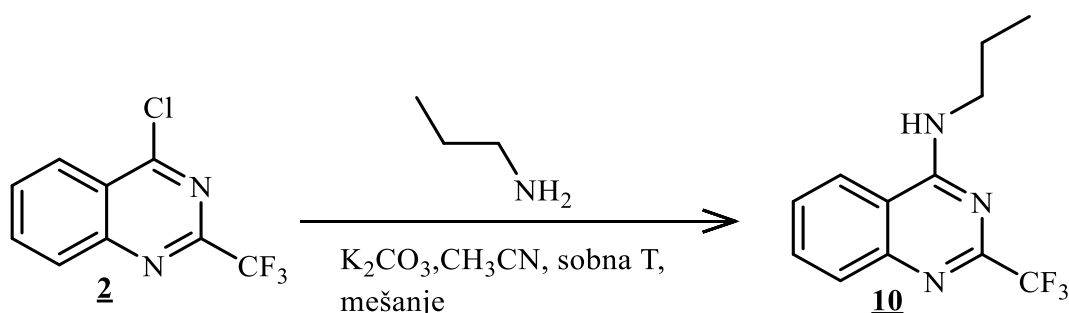
Preglednica 10: Lastnosti in analitika spojine **9**.

4-(4-METILPIPERAZIN-1-IL)-(TRIFLUOROMETIL)KINAZOLIN	
Sestava	C ₁₄ H ₁₅ F ₃ N ₄
Molska masa	296,30 g/mol
Opis	Rumeni kristali
Izkoristek	91,3 %
Rf (DKM/EtOH) = 9 : 1	0,26
Temperatura tališča	77–79 °C



¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃): δ(ppm)	δ(ppm) 2,38 (s, 3H, CH ₃); 2.60–2,63 (m, 4H, 2xCH ₂); 3,94–3,98 (m, 4H, 2xCH ₂); 7,54 (ddd, <i>J</i> ₁ = 1,3 Hz, <i>J</i> ₂ = 7,0 Hz, <i>J</i> ₃ = 8,3 Hz, 1H, Ar-H); 7,80 (ddd, <i>J</i> ₁ = 1,4 Hz, <i>J</i> ₂ = 7,0 Hz, <i>J</i> ₃ = 8,4 Hz, 1H, Ar-H); 7,92 (dd, <i>J</i> ₁ = 0,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 8,4 Hz, 1H, Ar-H); 8,01 (dd, <i>J</i> ₁ = 0,8 Hz, <i>J</i> ₂ = 8,4 Hz H, Ar-H)
¹³ C-NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ(ppm)	δ(ppm) 45,4; 48,8; 54,3; 115,3; 120,0 (q, <i>J</i> _{C-F} = 276,0 Hz); 125,7; 127,2; 128,4; 133,7; 150,3 (q, <i>J</i> _{C-F} = 34,8 Hz); 150,7; 163,7
IR (cm ⁻¹)	2944, 2796, 1572, 1552, 1506, 1466, 1448, 1405, 1356, 1300, 1275, 1256, 1177, 1164, 1136, 1104, 1082, 1053, 1023, 1005, 956, 936, 873, 835, 769, 755, 742, 711, 684, 594, 547 cm ⁻¹
ESI-HRMS	Izračunano za: C ₁₄ H ₁₅ F ₃ N ₄ : 297,1327 [M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z): 297,1328
HPLC (t _r)	5,810 min (100,00 % čistost)

4.1.10 Sinteza spojine 10:



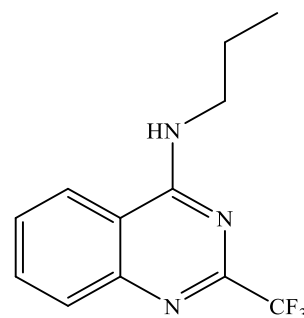
Slika 20: Reakcijska shema sinteze spojine 10.

Po izvedbi postopka A smo reakcijski zmesi dodali propilamin (0,80 mmol, 72,3 μl). Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi 24 h. Izolacijo smo izvedli po postopku B. Po odparevanju pri sobni temperaturi smo izvedli prekrizalzacijo iz dietiletra (70 ml).

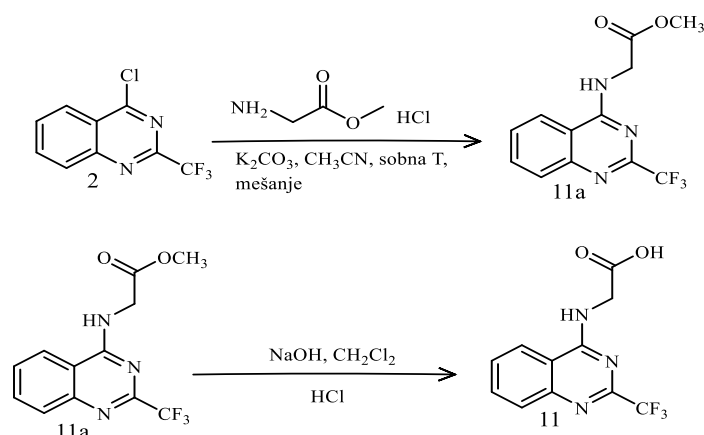
Segrevali smo do vrenja, nato pa ohlajali na ledu, da je prišlo do izpadanja kristalov. Dobili smo 0,026 g produkta.

Preglednica 11: Lastnosti in analitika spojine 10.

<i>N</i> -PROPIL-2-(TRIFLUOROMETIL)KINAZOLIN-4-AMIN	
Sestava	C ₁₂ H ₁₂ F ₃ N ₃
Molska masa	255,24 g/mol
Opis	Rumeno-beli kristali
Izkoristek	12,7 %
R _f (DKM/EtOH) = 9 : 1	0,64
Temperatura tališča	112–114 °C
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃): δ(ppm)	δ(ppm) 1,05(t, <i>J</i> = 7,4 Hz, 3H, CH ₃); 1,72-1,82 (m, 2H, CH ₂); 3,67-3,72 (m, 2H, CH ₂); 5,99 (t, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H, NH); 7,56 (ddd, <i>J</i> ₁ = 1,2 Hz, <i>J</i> ₂ = 7,0 Hz, <i>J</i> ₃ = 8,3 Hz, 1H, Ar-H); 7,75 (dd, <i>J</i> ₁ = 0,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 8,4 Hz, 1H, Ar-H), 7,80 (ddd, <i>J</i> ₁ = 1,4 Hz, <i>J</i> ₂ = 7,0 Hz, <i>J</i> ₃ = 8,4 Hz, 1H, Ar-H); 7,96 (dd, <i>J</i> ₁ = 0,6 Hz, <i>J</i> ₂ = 8,4 Hz, 1H, Ar-H)
¹³ C-NMR (100 MHz, CDCl ₃): δ(ppm)	δ(ppm) 11,4; 22,5; 43,2; 114,7; 120,0 (q, <i>J</i> _{C-F} = 276,0 Hz); 120,4; 127,6; 129,4; 133,3; 148,9; 153,1 (q, <i>J</i> _{C-F} = 35,2 Hz); 160,5
IR (cm ⁻¹)	3268, 2969, 2935, 1677, 1618, 1579, 1549, 1503, 1465, 1415, 1371, 1329, 1258, 1197, 1125, 1112, 1005, 981, 955, 927, 891, 804, 768, 730, 675, 600, 561, 533, 517 cm ⁻¹
ESI-HRMS	Izračunano za: C ₁₂ H ₁₂ F ₃ N ₃ : 256,1062 [M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z): 256,1061
HPLC (t _r)	9,807 min (96,50 % čistost)



4.1.11 Sinteza spojine **11**:

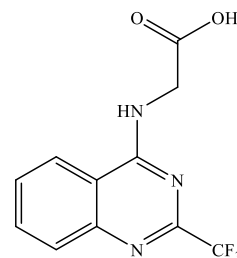


Slika 21: Reakcijska shema sinteze spojine **11.**

Po izvedbi postopka **A** smo reakcijski zmesi dodali metil glicinat v obliki klorida (0,80 mmol, 0,784 g). Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi 24 h. Izolacijo smo izvedli po postopku **B**. Po odparevanju pri sobni temperaturi smo izvedli prekristalizacijo iz dietiletra (70 ml). Segrevali smo do vrenja, nato pa ohlajali na ledu, da je prišlo do izpadanja kristalov. Dobili smo 0,040 g produkta. Produktu smo dodali 2M NaOH (4 ml) in mešali 30 min. Raztopino smo spirali z diklorometanom (10 ml). Vodno fazo smo nakisali s 37 % HCl. Oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem in produkt sušili na sobni temperaturi 24 h. Dobili smo 0,024 g produkta.

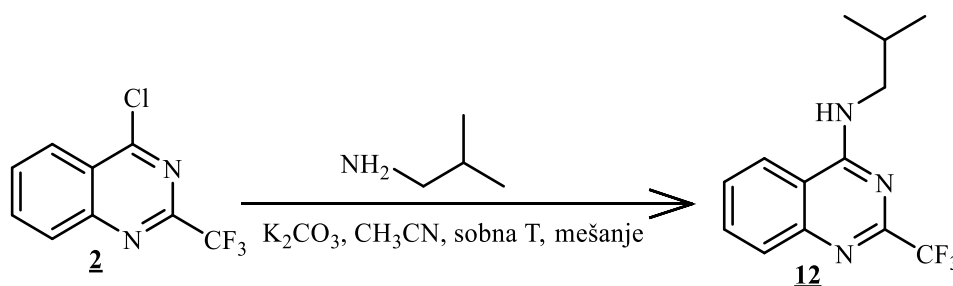
Preglednica 12: Lastnosti in analitika spojine **11.**

2-((2-(TRIFLUOROMETIL)KINAZOLIN-4-IL)AMINO)GLIOKSILNA KISLINA	
Sestava	C ₁₁ H ₈ F ₃ N ₃ O ₃
Molska masa	287,20 g/mol
Opis	Bela amorfna snov
Izkoristek	10,45 %
R _f (DKM/EtOH) = 9 : 1	0,26
Temperatura tališča	241–243 °C
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ(ppm)	δ(ppm) 4,23 (d, <i>J</i> ₁ = 5,9 Hz, 2H, CH ₂); 7,73 (ddd, <i>J</i> ₁ = 1,5 Hz, <i>J</i> ₂ = 6,8 Hz, <i>J</i> ₃ = 8,2 Hz, 1H, Ar-H); 7,87-7,95 (m, 2H, Ar-H), 8,07 (d, <i>J</i> = 4,75 Hz, H, Ar-H); 8,36 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H, Ar-H), 9,25 (d, <i>J</i> = 5,9 Hz, NH), 12,76 (s, 1H, COOH)



^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm)	δ (ppm) 42,4; 114,7; 119,9 (q, $J_{\text{C-F}} = 275,9$ Hz); 122,9; 128,1; 128,2; 134,0; 148,1; 151,5 (q, $J_{\text{C-F}} = 34,5$ Hz); 160,7; 170,8
IR (cm^{-1})	3366, 2467, 1728, 1618, 1583, 1541, 1500, 1468, 1420, 1375, 1341, 1265, 1214, 1185, 1148, 1064, 1036, 972, 918, 865, 800, 769, 738, 682, 671, 637, 603, 587, 549, 512 cm^{-1}
ESI-HRMS	Izračunano za: $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3$: 286,0844 $[\text{M}+\text{H}]^+$ Izmerjena vrednost (m/z): 286,0799
HPLC (t_r)	6,697 min (99,09 % čistost)

4.1.12 Sinteza spojine 12:

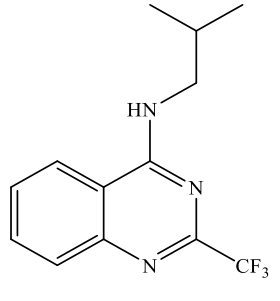


Slika 22: Reakcijska shema sinteze spojine 12.

Po izvedbi postopka A smo reakcijski zmesi dodali izobutilamin (0,80 mmol, 88 μl). Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi 24 h. Izolacijo smo izvedli po postopku B. Dobili smo 0,171 g produkta.

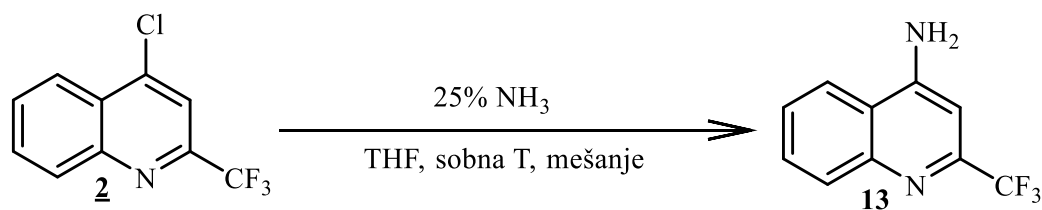
Preglednica 13: Lastnosti in analitika spojine 12.

<i>N</i> -IZOBUTIL-2-(TRIFLUOROMETIL)KINAZOLIN-4-AMIN	
Sestava	$\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_3$
Molska masa	269,27 g/mol
Opis	Beli kristali
Izkoristek	79,4 %
R _f (DKM/EtOH) = 9 : 1	0,21
Temperatura tališča	88–90 °C



¹ H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ(ppm)	δ(ppm) 0,94 (d, <i>J</i> = 6,7 Hz, 6H, 2xCH ₃); 2,02–2,11 (m, 1H, CH); 3,41 (dd, <i>J</i> ₁ = 5,8 Hz, <i>J</i> ₂ = 7,0 Hz, 2H, CH ₂); 7,67 (ddd, <i>J</i> ₁ = 1,5 Hz, <i>J</i> ₂ = 6,9 Hz, <i>J</i> ₃ = 8,3 Hz, 1H, Ar-H); 7,82 (dd, <i>J</i> ₁ = 1,2 Hz, <i>J</i> ₂ = 8,4 Hz, 1H, Ar-H); 7,88 (ddd, <i>J</i> ₁ = 1,3 Hz, <i>J</i> ₂ = 6,8 Hz, <i>J</i> ₃ = 8,2 Hz, 1H, Ar-H); 8,39 (dd, <i>J</i> ₁ = 0,6 Hz, <i>J</i> ₂ = 8,4 Hz, 1H, Ar-H); 8,82 (t, <i>J</i> = 5,5 Hz, 1H, NH)
¹³ C-NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ(ppm)	δ(ppm) 20,1; 27,4; 48,1; 114,8; 120,0 (q, <i>J</i> _{C-F} = 276,1 Hz); 122,9; 127,5; 128,0; 133,5; 148,1; 151,9 (q, <i>J</i> _{C-F} = 34,1 Hz); 160,6
IR (cm ⁻¹)	3273, 2958, 2872, 1618, 1579, 1549, 1504, 1466, 1415, 1386, 1370, 1359, 1329, 1285, 1260, 1246, 1202, 1134, 1018, 966, 957, 944, 903, 889, 871, 823, 805, 766, 731, 675, 644, 601, 566, 537, 517 cm ⁻¹
ESI-HRMS	Izračunano za: C ₁₃ H ₁₄ F ₃ N ₃ : 270,1218 [M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z): 270,1215
HPLC (t _r)	10,540 min (100,00 % čistost)

4.1.13 Sinteza spojine **13**:

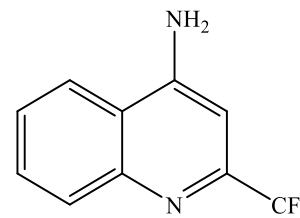


Slika 23: Reakcijska shema sinteze spojine **13**.

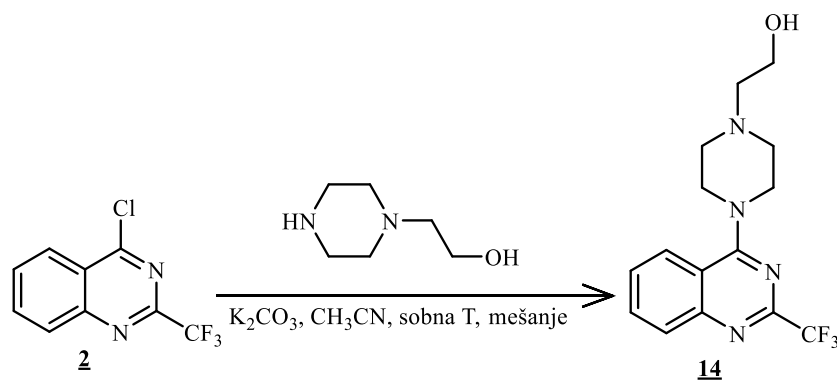
Natehtali smo 4-kloro-2-(trifluorometil)kinolin (0,80 mmol, 0,175 g) in K₂CO₃ (1,20 mmol, 0,166 g) in ju raztopili v THF (8 ml). Po dodatku topila smo dodali 500 µl 25 % vodne raztopine amonijaka. Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi 24 h. Izolacijo smo izvedli po postopku **B**. Dobili smo 0,118 g produkta.

Preglednica 14: Lastnosti in analitika spojine 13.

2-(TRIFLUOROMETIL)KINOLIN-4-AMIN	
Sestava	C ₁₀ H ₇ F ₃ N ₂
Molska masa	212,18 g/mol
Opis	Svetlo rumeni kristali
Izkoristek	69,8 %
Rf (DKM/EtOH) = 9 : 1	0,74
Temperatura tališča	88–90 °C
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ (ppm)	δ(ppm) 7,97 (ddd, <i>J</i> ₁ = 1,3 Hz, <i>J</i> ₂ = 7,0 Hz, <i>J</i> ₃ = 8,3 Hz, 1H, Ar-H); 8,06 (ddd, <i>J</i> ₁ = 1,5 Hz, <i>J</i> ₂ = 6,9 Hz, <i>J</i> ₃ = 8,5 Hz, 1H, Ar-H); 8,28 (dd, <i>J</i> ₁ = 0,5 Hz, <i>J</i> ₂ = 8,5 Hz, 1H, Ar-H); 8,30 (s, 1H, Ar-H); 8,35 (dd, <i>J</i> ₁ = 0,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 8,4 Hz, 1H, Ar-H), 2H od NH ₂ sta izmenjana s topilom
¹³ C-NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ (ppm)	δ(ppm) 117,4; 120,9 (q, <i>J</i> _{C-F} = 275,5 Hz); 123,8; 126,3; 130,0; 130,5; 132,4; 144,0; 146,7 (q, <i>J</i> _{C-F} = 36,6 Hz); 147,0
IR (cm ⁻¹)	3314, 2968, 2873, 1618, 1590, 1548, 1504, 1466, 1416, 1386, 1370, 1359, 1331, 1286, 1260, 1188, 1141, 1019, 966, 957, 947, 889, 804, 768, 730, 676, 601, 567, 539, 514 cm ⁻¹
HPLC (tr)	11,397 min (100,00 % čistost)



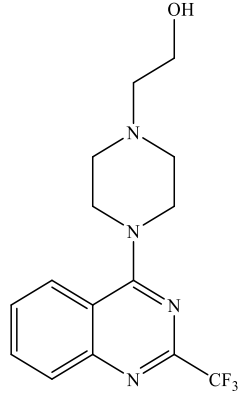
4.1.14 Sinteza spojine 14:



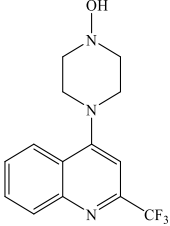
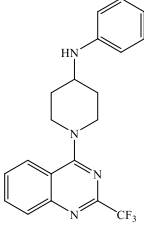
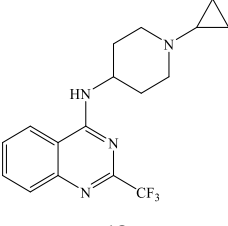
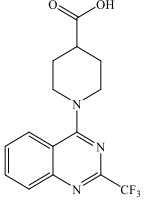
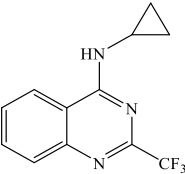
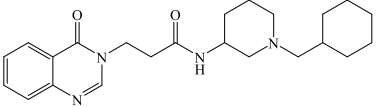
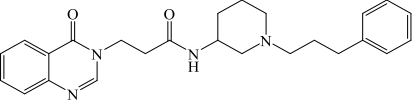
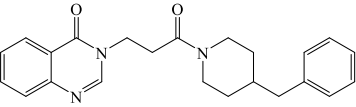
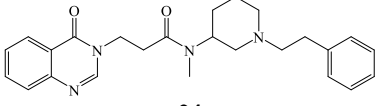
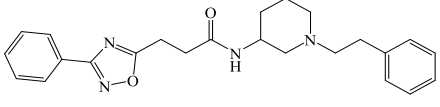
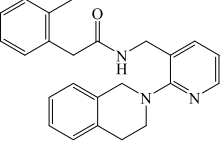
Slika 24: Reakcijska shema sinteze spojine 14.

Po izvedbi postopka **A** smo reakcijski zmesi dodali 2-(piperazin-1-il)etan-1-ol (0,80 mmol, 0,104 g).. Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi 24 h. Izolacijo smo izvedli po postopku **B**. Dobili smo 0,120 g produkta.

Preglednica 15: Lastnosti in analitika spojine 14.

2-(4-(2-(TRIFLUOROMETIL)KINOLIN-4-IL)PIPERAZIN-1-IL)ETAN-1-OL	
Sestava	C ₁₆ H ₁₈ F ₃ N ₄ O
Molska masa	326,34 g/mol
Opis	Rumeni igličasti kristali
Izkoristek	46 %
R _f (DKM/EtOH) = 9 : 1	0,21
Temperatura tališča	96–98 °C
	
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ (ppm)	δ(ppm) 2,44–2,50 (m, 2H, CH ₂); 2,59–2,67 (m, 4H, 2xNCH ₂); 3,41 (dt, <i>J</i> ₁ = 5,8 Hz, <i>J</i> ₂ = 6,0 Hz, 2H, CH ₂); 3,86–3,90 (m, H, 4H, 2xNCH ₂); 4,49 (br s, 1H, OH); 7,63-7,70 (m, 1H, Ar-H); 7,91-7,93 (m, 2H, Ar-H); 8,10 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H, Ar-H)
¹³ C-NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ (ppm)	δ(ppm) 48,8; 52,9; 58,4; 60,0; 115,3; 119,9 (q, <i>J</i> _{C-F} = 275,9 Hz); 125,8; 127,3; 128,4; 133,8; 150,3 (q, <i>J</i> _{C-F} = 34,2 Hz); 150,7; 163,5
IR (cm ⁻¹)	3178, 2824, 1613, 1573, 1552, 1504, 1447, 1227, 1397, 1363, 1342, 1321, 1309, 1277, 1252, 1183, 1133, 1120, 1100, 1068, 1054, 1001, 975, 954, 874, 840, 781, 760, 743, 717, 691, 549 cm ⁻¹
ESI-HRMS	Izračunano za: C ₁₆ H ₁₈ F ₃ N ₄ O: 327,1439 [M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z): 327,1433
HPLC (tr)	5,607 min (100,00 % čistost)

Preglednica 16: Čistost kupljenih spojin smo določili s HPLC metodo.

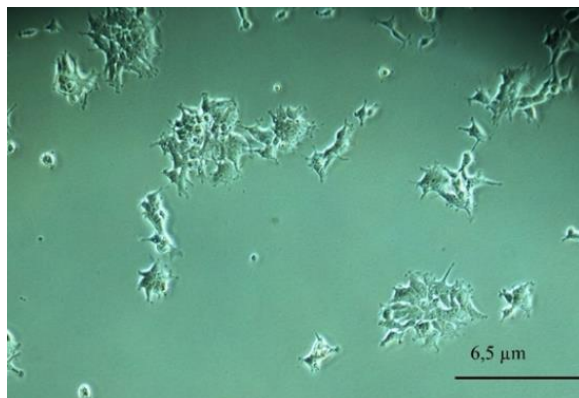
 <p>16 4-(2-(trifluorometil)kinolin-4-il)piprazin-1-ol Rumeni kristali, kupljena spojina $t_r=7,640$ min (96,93 % čistost)</p>	 <p>17 N-fenil-1-(2-(trifluorometil)kinazolin-4-il)piperidin-4-amin Rjavi kristali, kupljena spojina $t_r=8,327$ min (96,00 % čistost)</p>	 <p>18 N-(1-ciklopropilpiperidin-4-il)-2-(trifluorometil)kinazolin-4-amin Oranžno rjavi kristali, kupljena spojina $t_r=6,363$ min (92,63 % čistost)</p>
 <p>19 1-(2-(trifluorometil)kinazolin-4-il)piperidin-4-karboksilna kislina Rumeni kristali, kupljena spojina $t_r=8,350$ min (99,27 % čistost)</p>	 <p>20 N-ciklopropil-2-(trifluorometil)kinazolin-4-amin Rumeni kristali, kupljena spojina $t_r=9,100$ min (99,71 % čistost)</p>	
 <p>21 N-(1-(cikloheksilmetil)piperidin-3-il)-3-(4-oksokinazolin-3(4H)-il)propanamid Rumeno oranžno olje, kupljena spojina $t_r=5,470$ min (43,43 % čistost)</p>	 <p>22 3-(4-oksokinazolin-3(4H)-il)-N-(1-(3-fenilpropil)piperidin-3-il)propanamid Beli kristali, kupljena spojina $t_r=6,290$ min (61,23 % čistost)</p>	
 <p>23 3-(3-(4-benzilpiperidin-1-il)-3-oksopropil)kinazolin-4(3H)-on Rumeni kristali, kupljena spojina $t_r=9,243$ min (98,30 % čistost)</p>	 <p>24 N-metil-3-(4-oksokinazolin-3(4H)-il)-N-(1-fenetilpiperidin-3-il)propanamid Rumeni kristali, kupljena spojina $t_r=6,227$ min (78,14 % čistost)</p>	
 <p>25 N-(1-fenetilpiperidin-3-il)-3-(3-fenil-1,2,4-oksadiazol-5-il)propanamid Rumeno oranžni kristali, kupljena spojina $t_r=7,383$ min (97,79 % čistost)</p>	 <p>26 N-((2-(3,4-dihidroizokinolin-2(1H)-il)piridin-3-il)metil)-2-(o-tolil)acetamid Rumeni kristali, kupljena spojina $t_r=7,497$ min (39,99 % čistost)</p>	

4.2 BIOLOŠKO TESTIRANJE

4.2.1 ROKOVANJE S CELICAMI

Vsi protokoli, kjer je bilo potrebno rokovati s celicami, so potekali v posebnem laboratoriju za gensko spremenjene organizme Zavoda za transfuzijsko medicino. Rokovanje s celicami je potekalo v LAF-komori z razkuženo površino, rokavicami in ustrezno opremo. Prenosi celic in gojišč so potekali z ustreznimi sterilnimi pipetami in sterilnimi tipsi. Celice HEK-Blue™ hTLR7 so bile pred rokovanjem shranjene v tekočem dušiku, zamrznjene v gojišču DMEM (s FBS v koncentraciji 20 % (v/v) in DMSO v koncentraciji 10 % (v/v)). Po odvzemu iz kriobanke smo jih najprej na hitro odtalili na vodni kopeli. Odtaljeno celično suspenzijo smo nato prenesli v večjo centrifugirko in na ledeni kopeli po kapljicah dodajali ohlajeno, popolno celično gojišče (cDMEM) do volumna 10 ml. Po dodatku cDMEM, smo raztopini po kapljicah dodali 10 ml ohlajenega celičnega pufra DPBS. Vsebino centrifugirke smo med dodajanjem posameznih medijev intenzivno mešali. Tako pripravljeno celično suspenzijo smo centrifugirali 7 min pri 600 obratih. Po končanem centrifugiranju smo supernatant odlili. Usedlino celic smo suspendirali v 1 ml celičnega gojišča in prenesli v gojilno posodo s prostornino 75 cm³ s 14 ml celičnega gojišča. Celice smo gojili v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO₂. Uspešnost rasti pritrjenih celic smo preverjali z opazovanjem pod optičnim invertnim mikroskopom pri stokratni povečavi. Po nekaj dneh inkubiranja so celice dosegle zadostno konfluentnost (70–80 % prekrivanje dna), da smo jih lahko presadili (naredili novo pasažo). Presaditev smo izvedli tako, da smo odstranili celično gojišče in površino, na kateri so celice rasle, dvakrat sprali z 10 ml DPBS. Po spiranju smo jih 10 min stresali v 13 ml DPBS ter jih tako odlepili od podlage. Tako pripravljeno celično suspenzijo smo centrifugirali 8 min pri 700 obratih. Supernatant smo po centrifugiranju odlili, usedlino celic pa resuspendirali v 1 ml pufra DPBS. Celice smo prešteli s števcem XR Cell viability analyzer tako, da smo 25 µL celične suspenzije suspendirali v 475 µL pufra DPBS, da je faktor redčitve znašal 20. Štetje celic je temeljilo na dodatku velike negativno nabite diazo spojine-triptanskega modrila. V celico barvilo vstopi le, če je porušena integriteta njene membrane. Mrtve, modro obarvane celice je števec preštel in avtomatsko podal število živih celic v ml DPBS. Glede na število živih celic smo odmerili ustrezen volumen celic v DPBS-ju in jih nasadili v štiri gojilne posode s prostornino 75 cm³ z gostoto nasejanja 8000 celic/cm³. Neizkoriščene celice smo zavrgli. Pred začetkom celičnih testov je bilo potrebno izvesti vsaj tri kroge presejanj, da so bile celice v ustreznem ravnovesju. Celicam smo v obdobju

rasti na podlagi spremembe barve celičnega gojišča, staro gojišče po potrebi zamenjali z novim. Celična linija ostane stabilna do okoli 20 pasaže. Po tem smo celice morali ponovno odmrzniti in ponoviti zgoraj opisan postopek rokovanja.



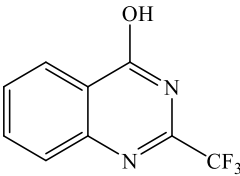
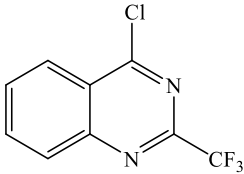
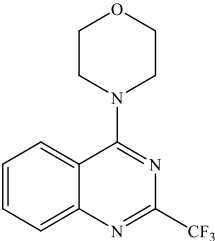
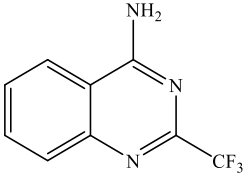
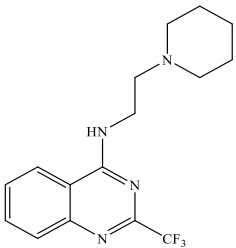
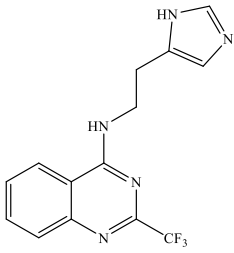
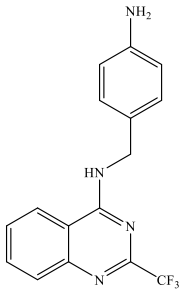
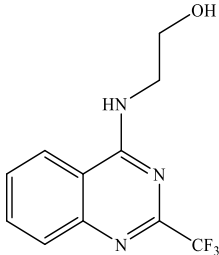
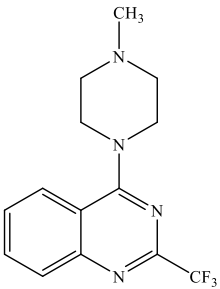
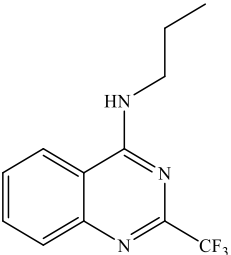
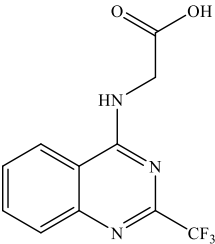
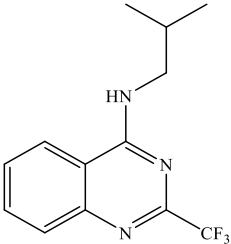
Slika 25: Pregled rasti celic pod mikroskopom pri stokratni povečavi.

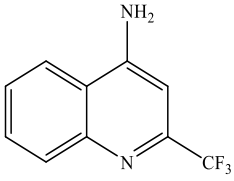
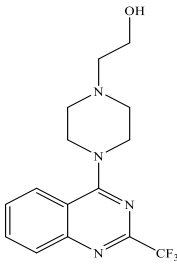
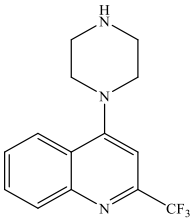
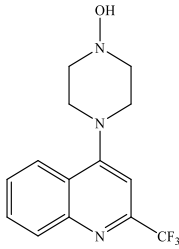
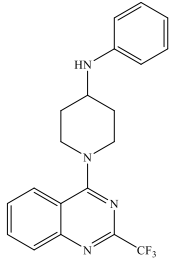
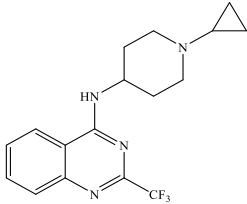
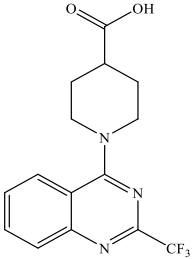
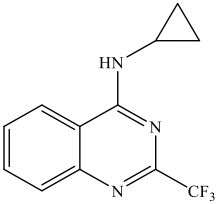
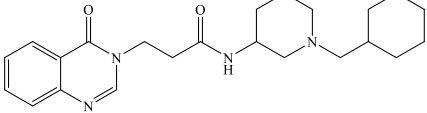
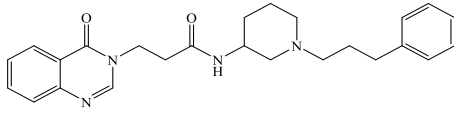
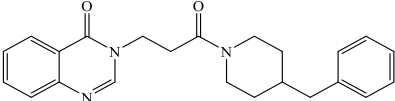
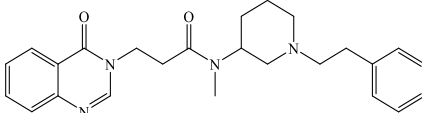
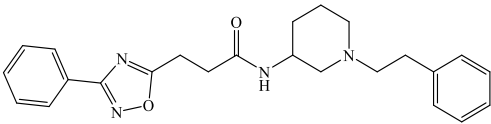
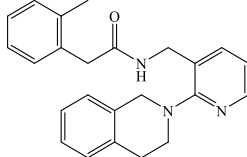
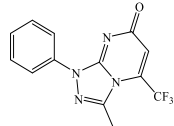
4.2.2 PRIPRAVA RAZTOPIN TESTIRANIH SPOJIN IN PREVERJANJE TOPNOSTI V CELIČNEM MEDIJU

Spojine smo natehtali na analitski tehtnici v ustrezno označene epice. Glede na molekulsko maso in maso posamezne spojine smo dodali ustrezen volumen DMSO, tako da je koncentracija vsake raztopine znašala 50 mM. Raztopine smo premešali na vorteksu, preverili bistrost in nadaljevali testiranje topnosti. Vsako posamezno raztopino smo dodali celičnemu gojišču v takem volumnu, da je končna koncentracija DMSO v celičnem gojišču znašala 1 v/v %, kar je najvišja koncentracija DMSO brez citotoksičnih vplivov (2,5 μ L raztopin spojin v 250 μ L celičnega medija). Raztopine smo prenesli na tkivne plošče z 48 polji in opazovali prisotnost kristalov pod optičnim mikroskopom v stokratni povečavi. Odsotnost kristalov je pomenila potrditev topnosti raztopine pri koncentraciji 50 mM v celičnem gojišču. Ob prisotnosti kristalov smo osnovne raztopine v DMSO redčili do 25 mM oziroma, če je bilo potrebno, do najnižje koncentracije 6,25 mM. Raztopine spojin v DMSO, pri katerih ni bilo več prisotnih kristalov po dodatku k celičnemu gojišču, smo uporabili kot osnovne raztopine za nadaljnja celična testiranja. Pri uporabi prenasajenih raztopin bi lahko prišlo do lažne citotoksičnosti, saj bi prisotnost kristalov lahko povzročila mehansko uničenje celic. Poleg tega prisotnost kristalov pomeni, da so koncentracije raztopin nižje od predvidene, zato lahko pride pri testu agonizma do lažno negativnih ali pozitivnih rezultatov. Priprava raztopin spojin v DMSO in raztopin spojin v celičnem gojišču za preverjanje topnosti je potekala po aseptičnem postopku v LAF-

komori. Ko raztopine niso bile podvržene testiranju, smo jih shranjevali v zmrzovalniku pri – 21 °C.

4.2.3 SEZNAM TESTIRANIH SPOJIN

 <p>1 <i>Beli kristali, sintetizirana spojina</i></p>	 <p>2 <i>Rumeno-zeleni kristali, sintetizirana spojina</i></p>	 <p>3 <i>Beli kristali, sintetizirana spojina</i></p>	 <p>4 <i>Bela amorfna snov, sintetizirana spojina</i></p>
 <p>5 <i>Rumeno-oranžna amorfna snov, sintetizirana spojina</i></p>	 <p>6 <i>Beli sipki kristali, sintetizirana spojina</i></p>	 <p>7 <i>Svetlo rjava amorfna snov, sintetizirana spojina</i></p>	 <p>8 <i>Beli kristali, sintetizirana spojina</i></p>
 <p>9 <i>Rumeni kristali, sintetizirana spojina</i></p>	 <p>10 <i>Beli kristali, sintetizirana spojina</i></p>	 <p>11 <i>Beli kristali, sintetizirana spojina</i></p>	 <p>12 <i>Beli kristali, sintetizirana spojina</i></p>

 <p>13 <i>Svetlo rumeni kristali, sintetizirana spojina</i></p>	 <p>14 <i>Rumeni kristali, sintetizirana spojina</i></p>	 <p>15 <i>Beli kristali, kupljena spojina</i></p>	 <p>16 <i>Rumeni kristali, kupljena spojina</i></p>
 <p>17 <i>Rjavi kristali, kupljena spojina</i></p>	 <p>18 <i>Rjavo rdeči kristali, kupljena spojina</i></p>	 <p>19 <i>Rumeni kristali, kupljena spojina</i></p>	 <p>20 <i>Rumeni kristali, kupljena spojina</i></p>
 <p>21 <i>Rumeno oranžno olje, kupljena spojina</i></p>		 <p>22 <i>Beli kristali, kupljena spojina</i></p>	
 <p>23 <i>Rumeni kristali, kupljena spojina</i></p>		 <p>24 <i>Rumeni kristali, kupljena spojina</i></p>	
 <p>25 <i>Oranžni kristali, kupljena spojina</i></p>		 <p>26 <i>Rumeni kristali, kupljena spojina</i></p>	
 <p>27 <i>Beli kristali, kupljena spojina</i></p>			

4.2.4 TESTI CITOTOKSIČNOSTI

Test citotoksičnosti je potekal tri dni v treh fazah, Sprva smo citotoksičnost preverjali pri maksimalnih koncentracijah, pri katerih so bile spojine še topne, nato tudi pri nižjih koncentracijah.

Prva faza: načrtovanje eksperimenta in nasaditev celic

Teste citotoksičnosti smo izvajali na mikrotitrski ploščici s 96 polji. Eksperiment smo postavili tako, da smo načrtovali prostor za spojine in kontrole.

- ❖ NETRETIRANE CELICE: k celicam dodano čisto celično gojišče.
- ❖ NEGATIVNA KONTROLA: DMSO v celičnem gojišču v enaki koncentraciji kot pri raztopinah spojin.

Za vsako spojino in kontrolo smo načrtovali tri polja za tri tehnične ponovitve, s čimer smo preverjali ponovljivost eksperimenta. V vsako polje smo nasadili približno 28.000 celic v celičnem gojišču. Začetni volumen je v vsakem testnem polju znašal 150 μL . Glede na število celic v 1 ml DPBS in glede na število polj smo preračunali volumen potrebnih celic in volumen celičnega gojišča, v katerem smo jih resuspendirali. Po nasaditvi celic smo pokrito mikrotitrsko ploščico inkubirali v inkubatorju 24 h pri 37 °C in 5 % CO_2 , da so se celice pritrdile na dno polj in pričele množiti. Pred pričetkom izvajanja druge faze smo vsa polja s celicami opazovali pod optičnim mikroskopom pri stokratni povečavi, da smo preverili enakomernost posajenosti celic.

Druga faza: tretiranje celic s spojinami in kontrolami

Po pregledu rasti celic na mikrotitrski ploščici smo v ustrezno označene epice pripravili po 500 μL celičnega gojišča s posameznimi spojinami in kontrolami tako, da je DMSO glede na volumen celičnega gojišča predstavljal 1,0 %. V vsako epico smo dali 495 μL celičnega gojišča in 5 μL osnovne raztopine posamezne spojine oziroma pri negativnih kontrolah 5 μL čistega DMSO. V vsako testno polje na mikrotitrski ploščici smo vnesli ustrezne raztopine v volumnu 150 μL tako, da je DMSO v končnem volumnu predstavljal 0,5 %. V polja načrtovana za netretirane celice smo vnesli 150 μL čistega celičnega gojišča. Končni volumen v testnih poljih je znašal 300 μL . Tretirane celice smo inkubirali 24 h pri 37 °C in 5 % CO_2 .

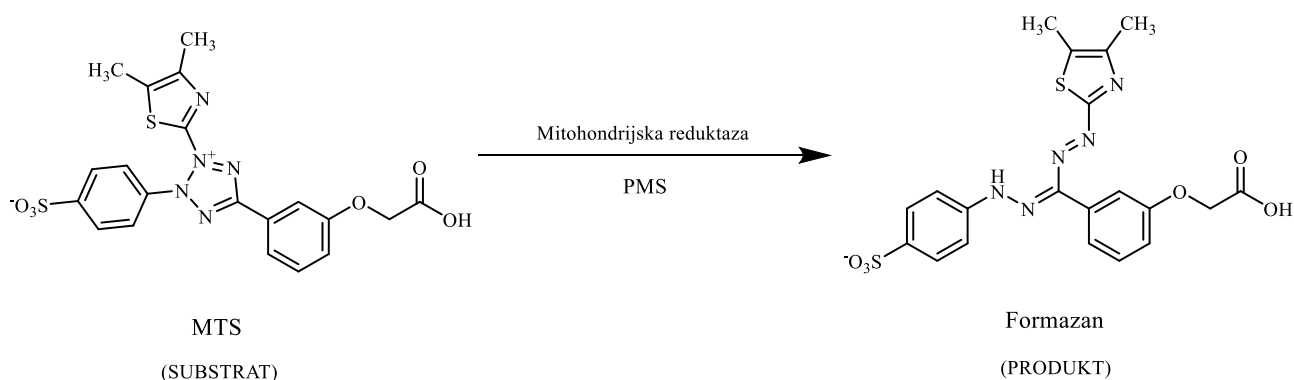
Tretja faza: spektrofotometrično testiranje

Testna polja smo po inkubaciji druge faze najprej pregledali pod optičnim mikroskopom in ocenili vpliv posameznih kontrol in spojin na rast in preživetje celic. V vsako polje smo nato dodali 15 μL barvila MTS in inkubirali 2 h pri 37 °C in 5 % CO_2 . Opazovali smo spremembe barve iz rumene v temnejšo rjavo barvo. Pokrite mikrotitrne ploščice smo pred meritvijo stresali na stresalniku in jih nato odkrite postavili na optični čitalnik. Spektrofotometrično meritev smo izvajali pri 492 nm valovne dolžine. Podatke smo prenesli v Excelove tabele in pripravili grafe z odzivi.

Teste citotoksičnosti smo izvajali na enak način pri nižjih koncentracijah. Zmanjšali smo volumen osnovne raztopine spojine in sočasno na enak način zmanjšali volumen DMSO v celičnem gojišču pri negativni kontroli. Za vsako spojino smo določili, pri kateri koncentraciji ni več prisotne citotoksičnosti.

MTS TEST (test celične proliferacije)

MTS reagent je sestavljen iz tetrazolijeve soli [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol]-MTS in elektron sklopitvenega reagenta fenazin metosulfata-PMS. MTS se v prisotnosti PMS in mitohondrijske reduktaze (NADH, NADPH) reducira v formazan, ki je topen v gojišču in absorbira svetlobo pri 492 nm. Večja, kot je absorbanca pri tej valovni dolžini, manjša je citotoksičnost. Večje količine nastalega formazana pomenijo večjo metabolično aktivnost.



Slika 26: Pretvorba MTS barvila v formazan v prisotnosti PMS in mitohondrijske reduktaze (36).

4.2.5 PRELIMINARNI TEST AGONIZMA

Test agonizma spojin je trajal tri dni (tri faze). Test smo izvajali pri maksimalnih končnih koncentracijah spojin v celičnem gojišču, pri katerih niso bile citotoksične.

Prva faza: načrtovanje eksperimenta in nasaditev celic

Eksperiment smo postavili tako, da smo načrtovali prostor za spojine in kontrole.

- ❖ POZITIVNA KONTROLA 1: imikvimod v končni koncentraciji 1 µg/ml
- ❖ POZITIVNA KONTROLA 2: imikvimod v končni koncentraciji 2,5 µg/ml
- ❖ NETRETIRANE CELICE: k celicam dodano čisto celično gojišče
- ❖ NEGATIVNA KONTROLA: DMSO v končni koncentraciji pri tisti koncentraciji posamezne spojine, kjer je bila njena citotoksičnost najmanjša

Celice smo posadili v ustrezno označena testna polja in jih inkubirali na enak način kot pri prvi fazi testov citotoksičnosti.

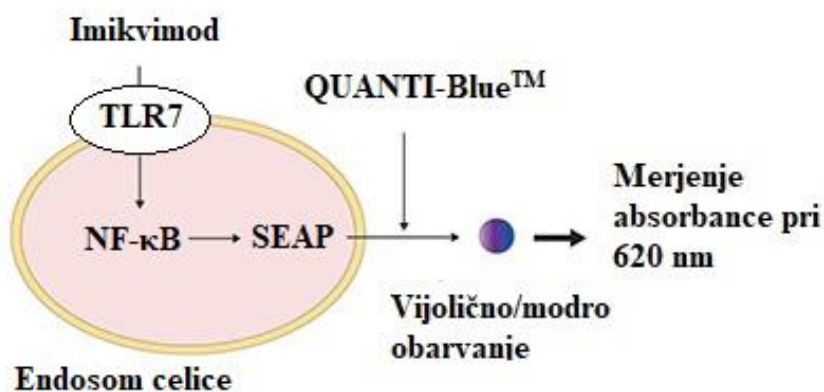
Druga faza: tretiranje celic s spojinami in kontrolami

V ustrezno označenih epicah smo pripravili 500 µL celičnega gojišča s spojinami v takih koncentracijah, da spojine po dodatku niso bile več citotoksične. Negativno kontrolo smo pripravili tako, da smo dodali tak volumen DMSO, ki je bil enak volumnu osnovnih raztopin spojin, pri katerih ni bilo več prisotne citotoksičnosti. Za pripravo pozitivne kontrole smo odmrznili raztopino imikvimoda s koncentracijo 1 mg/ml. V treh poljih pozitivne kontrole 1 na mikrotitrski ploščici je znašala končna koncentracija imikvimoda 1 µg/ml, zato smo v 500 µl celičnega gojišča dodali 1 µl raztopine imikvimoda. V treh poljih pozitivne kontrole 2 smo končno koncentracijo imikvimoda, ki je znašala 2,5 µg/ml, pripravili tako, da smo v 500 µl celičnega gojišča dodali 2,5 µl raztopine imikvimoda. Pripravljene raztopino smo dobro premešali na vorteksu in v vsako polje dodali 150 µl posameznih raztopin spojin tako, da je končen volumen znašal 300 µl. Test smo za vsako posamezno spojino in kontrolo izvajali v treh tehničnih ponovitvah. Tretirane celice smo inkubirali 24 h pri 37 °C in 5 % CO₂.

Tretja faza: spektrofotometrično testiranje

Pripravili smo še eno mikrotitrsko ploščico z identičnimi oznakami in postavitvijo polj, kot so bile na mikrotitrski ploščici s tretiranimi celicami. Polja smo napolnili s 180 µl barvila QUANTI-Blue™ in k barvilu v ustrezna polja dodali 20 µl medija z istoležnih polj mikrotitrsko ploščice, v katerih so rastle celice, ki so bile izpostavljene posameznim spojinam in kontrolam

(medij smo zajemali z vrha). Testno ploščo smo inkubirali 2 h pri 37 °C in 5 % CO₂. Po inkubaciji smo že s prostim očesom opazili spremembo barve barvila pri posameznih poljih iz rožnate v modrovijolično. Pokrite ploščice smo najprej kratek čas stresali na stresalniku, nato pa jih odkrite postavili na optični čitalnik ter pomerili intenziteto absorbance pri 620 nm. Rezultate smo prenesli v Excelove tabele in pripravili grafe z odzivi. Transgene celice HEK-Blue™ hTLR7 izražajo gen za hTLR7 in reporterski gen za sekretorno embrionsko alkalno fosfatazo (SEAP), ki je pod nadzorom promotorja IFN-β. Po aktivaciji TLR7 NF-κB aktivira reporter SEAP, kar povzroči večje izločanje alkalne fosfataze v celično gojišče. Aktivnost alkalne fosfataze določamo s testom QUANTI-Blue™, ne da bi pri tem poškodovali celice. QUANTI-Blue™ barvilo je substrat, ki se v prisotnosti alkalne fosfataze spremeni iz rožnate v modrovijolično barvo, kar povzroči višje signale pri spektrofotometričnem merjenju pri 620 nm. Vrednosti alkalne fosfataze so višje pri agonističnem delovanju spojin. Spojinam, ki so se v preliminarnih testih izkazale kot agonisti, smo v nadaljnjih testih pri različnih redčitvah določili pripadajoče EC₅₀.



Slika 27: Dokazna reakcija preliminarnega testa agonizma, na osnovi katere smo izbranim spojinam določili agonizem (37).

4.2.6 DOLOČANJE EC₅₀ AGONISTOV

Prva faza: načrtovanje eksperimenta in nasaditev celic

Spojini z izraženim agonističnim delovanjem smo določili vrednost EC₅₀ z naslednjim načrtovanjem eksperimenta:

- ❖ AGONISTIČNA SPOJINA: načrtujemo polja za osem raztopin spojine v padajočih koncentracijah
- ❖ POZITIVNA KONTROLA: načrtujemo polja za raztopine imikvimoda v končnih koncentracijah (5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/ml, 0,625 µg/ml, 0,3125 µg/ml, 0,156 µg/ml, 0,0781 µg/ml in 0,0391 µg/ml)
- ❖ NEGATIVNA KONTROLA: DMSO v končni koncentraciji spojine, kjer je bila njena citotoksičnost najmanjša
- ❖ NETRETIRANE CELICE: k celicam dodano čisto celično gojišče

Celice smo posadili v ustrezno označena testna polja in jih inkubirali na enak način kot v prvi fazi testov citotoksičnosti in preliminarne testa agonizma.

Druga faza: tretiranje celic s spojinami in kontrolami

Celice smo tretirali z raztopinami spojine, ki smo jo šestkrat ustrezno redčili. V osmih epicah smo pripravili raztopine spojine s koncentracijami: $c_{max}/2$, $c_{max}/4$, $c_{max}/8$, $c_{max}/16$, $c_{max}/32$, $c_{max}/64$, $c_{max}/128$. Za negativno kontrolo smo uporabili DMSO, v končni koncentraciji kot pri $c_{max}/2$ spojine. Pozitivne kontrole smo pripravili tako, da smo ustrezno redčili raztopino imikvimoda v končni koncentraciji 5 µg/ml in dobili osem končnih raztopin imikvimoda, ki so nam služile za pozitivno kontrolo. Za spojine in kontrole smo tudi pri določanju EC₅₀ načrtovali polja za tri tehnične ponovitve. Testno ploščo smo inkubirali 24 h 37 °C in 5 % CO₂.

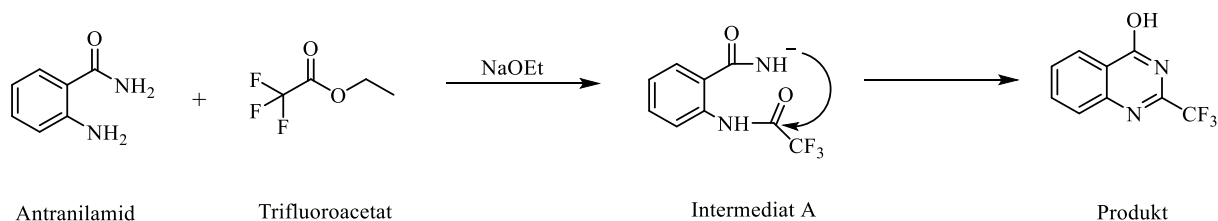
Tretja faza: spektrofotometrično testiranje

Tretja faza je potekala na osnovi QUANTI-BlueTM reporterskega testa na enak način kot v tretji fazi preliminarne testiranja agonizma. Pri različnih koncentracijah spojine dobimo različne odzive, ki jih predstavimo v Excelu. EC₅₀ izračunamo s programom GraphPad z nelinearno regresijo. Program izriše krivuljo signala v odvisnosti od logaritma koncentracije posamezne spojine in poda vrednost R².

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

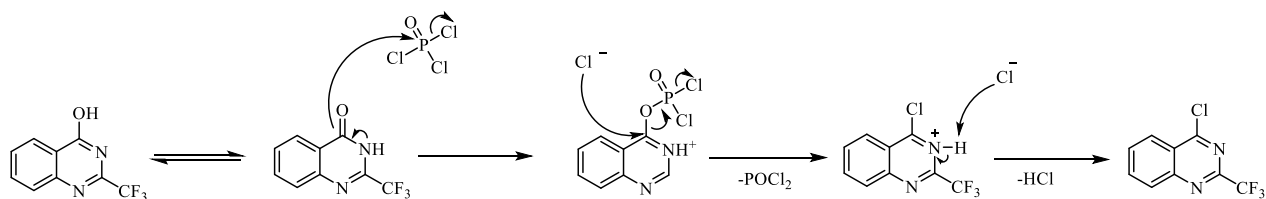
5.1 KEMIJSKA SINTEZA

Sintetizirali smo set 2-trifluorometilkinazolinov s substitucijo aminov na mestu 4. Pred uvedbo amina smo izvedli dvostopenjsko reakcijo, s katero smo v prvi stopnji z dodatkom trifluoroacetata k antranilamidu ob prisotnosti močne baze (NaOEt) dosegli tvorbo kinazolinskega skeleta. Predvidevamo, da reakcija poteka po mehanizmu preko nastanka intermediata A, iz katerega pride do tvorbe spojine **1**. Podoben mehanizem smo namreč zasledili v literaturi (38), kjer je nazorno prikazan nastanek produkta preko podobnega intermediata. Ker pa intermedat A ni dokazan, mehanizem nastanka produkta lahko zgolj predvidevamo. Prisotna močna baza (NaOEt) odtegne proton amidni skupini antranilamida, ki potem kot nukleofil napade karbonylno skupino trifluoroacetamidne skupine, sledi izstop vode in posledična ciklizacija intermediata A v končni produkt.



Slika 28: Na sliki je predstavljen najverjetnejši mehanizem nastanka kinazolinskega skeleta glede na literaturne podatke (38).

V drugi stopnji reakcije smo OH-skupino na mestu 4 zamenjali s klorom z uporabo POCl₃. Mehanizem reakcije je klasična nukleofilna substitucija prikazana na sliki 30 (39).

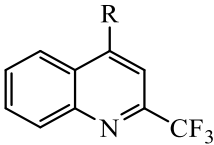

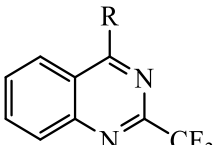
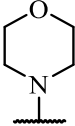

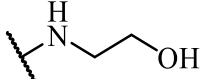
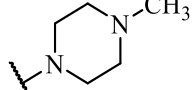
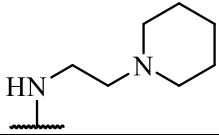
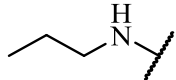
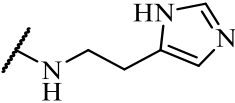
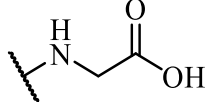
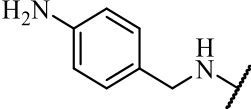
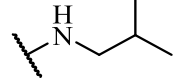
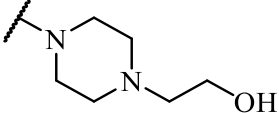


Slika 29: Nukleofilna substitucija alkoholne skupine na mestu 4 s klorom.

Izvedba dvostopenjske sinteze je potekala po postopku iz izbrane literature s klasičnim segrevanjem reakcijske zmesi. V literaturi je omenjeno, da je bila tvorba kinazolinskega skeleta uspešna šele po uvedbi segrevanja z mikrovalovi. V našem primeru smo s 24-urnim segrevanjem pri 90 °C dosegli zadovoljiv končni izkoristek za vstop v drugo stopnjo reakcije.

V drugi stopnji smo z uporabo fosforil klorida na mesto 4 uvedli klor. Uporabljeni reagent je izredno reaktiven, koroziven in toksičen. Reakcijsko zmes smo segrevali v izoliranem sistemu »sealed tube«, s čimer smo pospešili in optimizirali potek reakcije. Prva izvedba izolacije produkta ni bila uspešna zaradi CO₂, ki je v postopku ekstrakcije povzročil nastanek visokega tlaka. Po prvem spiranju organske faze, njegovega sproščanja nismo predvidevali, zato smo med stresanjem lija ločnika vso vsebino izgubili. Pri drugi izvedbi smo CO₂ izgnali z intenzivnim, 15-minutnim mešanjem organske faze in NaHCO₃ na ledu. Po končani izolaciji smo produkt očistili s kolonsko kromatografijo. Z uvedbo klora na mesto 4 smo omogočili uvedbo aminov z nukleofilno aromatsko substitucijo. Uvajali smo primarne, sekundarne in terciarne amine, ki so predstavljeni v tabeli 2. Pri spojini **13** predstavlja osnovno strukturo kinolinski skelet, kjer smo kupljenemu izhodnemu reagentu na enak način uvedli izbrani amin na mesto 4.

Preglednica 17: Pregled aminov, ki smo jih uvedli na mesto 4 osnovnega 2-trifluorometil kinazolinskega in kinolinskega ogrodja.

OSNOVNA STRUKTURA	UVEDEN AMIN (R)	
		
		
		
		
		
		
		

Tvorba aminov je pri večini potekala tako, da smo izhodno spojino skupaj s kalijevim karbonatom (K_2CO_3) raztopili v acetonitrilu. Reakcijsko zmes smo mešali na sobni temperaturi 24 h. Bazo smo dodali, da je nevtralizirala klorovodikovo kislino, ki se je sprostila pri reakciji. Produkt smo izolirali in čistili z metodo ekstrakcije ter z odparevanjem topila pod znižanim tlakom. V nekaterih primerih spojin je bila izolacija uspešna zgolj z uporabo omenjenih metod, nekatere spojine pa smo dodatno čistili s prekristalizacijo iz topil. Sinteza spojin **5** in **13** je za razliko od zgoraj opisane sinteze potekala v topilu THF, brez dodanega K_2CO_3 . Sušenje sintetiziranih spojin je potekalo pri sobni temperaturi. Reakcijo in nastanek produkta smo spremljali s TLC. Identiteto in čistost spojin smo dodatno potrdili z uporabo NMR, MS, IR, HPLC in T_{tal} .

5.2 BIOLOŠKO VREDNOTENJE

5.2.1 ROKOVANJE S CELICAMI

Agonistično delovanje spojin smo vrednotili na komercialno dostopnih transgenih celicah HEKBlueTM hTLR7. Vsa rokovanja s celicami, vključno z gojenjem in biološkimi testiranj, so potekala pri aseptičnih pogojih. Celice so po naravi občutljive na zunanje okužbe, temperaturne spremembe in grobe mehanske dražljaje, zato smo z njimi ravnali izredno previdno. Potencialnim okužbam smo se izognili z uporabo aseptičnih tehnik in dodatkom gentamicina v celično gojišče DMEM v koncentraciji 50 $\mu\text{g/ml}$. Na osnovi preraščanja dna gojilnih posod smo dnevno spremljali rast adherentnih celic. Presejali smo jih, ko so dosegle 70–80 % konfluentnost. V obdobju celične rasti smo star medij redno nadomeščali z novim in s tem zagotavljali ustrezen pH in količino hranil za rast. Pred stikom s celicami smo novejši medij vedno segreli na temperaturo gojenja celic (37 °C). Ohlajen medij bi lahko povzročil temperaturni šok s posledično smrtjo celic. Zaradi splošne temperaturne občutljivosti smo se izogibali vsakemu daljšemu zadrževanju celic na sobni temperaturi (25 °C). S skrbnim načrtovanjem dela smo zmanjšali vpliv temperature na gojenje in biološka testiranja. Pri rutinskem mikroskopskem pregledovanju celic smo opazili, da vsak bolj grob mehanski dražljaj prispeva k večjemu deležu mrtvih celic. V ta namen smo se izogibali vsem nepotrebnim dražljajem in prenosov gojilnih posod. Glavni vir mehanskih dražljajev je za naše delo predstavljalo centrifugiranje. Opazili smo, da uporaba večjih centrifugalnih sil vpliva na preživetje in biokemijsko aktivnost celic. S svojimi učinki so prispevale k večjemu deležu mrtvih celic in hkrati povečale encimsko aktivnost živih celic. Mehansko povečana encimska

aktivnost je povzročila intenzivno obarvanje testnih polj testov citotoksičnosti in preliminarnih testov agonizma. Za potrebe presejanj in bioloških testiranj smo na podlagi teh opažanj celice vedno centrifugirali pri največ 600–700 obratih. Uporaba teh centrifugalnih sil je zagotavljala zadostno sedimentacijo celic brez dodatnih vplivov na preživetje in encimsko delovanje celic. Celice so bile stabilne in ustrezne za rokovanje do okoli dvajsete pasaže. Večje število presejanj povzroči pomanjkljivo izražanje celičnih genov, potrebnih za biološko vrednotenje. Uporabljene celice smo po dvajseti pasaži ustrezno inaktivirali in zavrgli. Temu je sledil postopek odmrznitve celic, s čimer smo zagotovili ustrezno gensko izražanje in stabilnost celic.

5.2.2 PRIPRAVA RAZTOPIN SPOJIN V DMSO IN TOPNOST RAZTOPIN V CELIČNEM GOJIŠČU

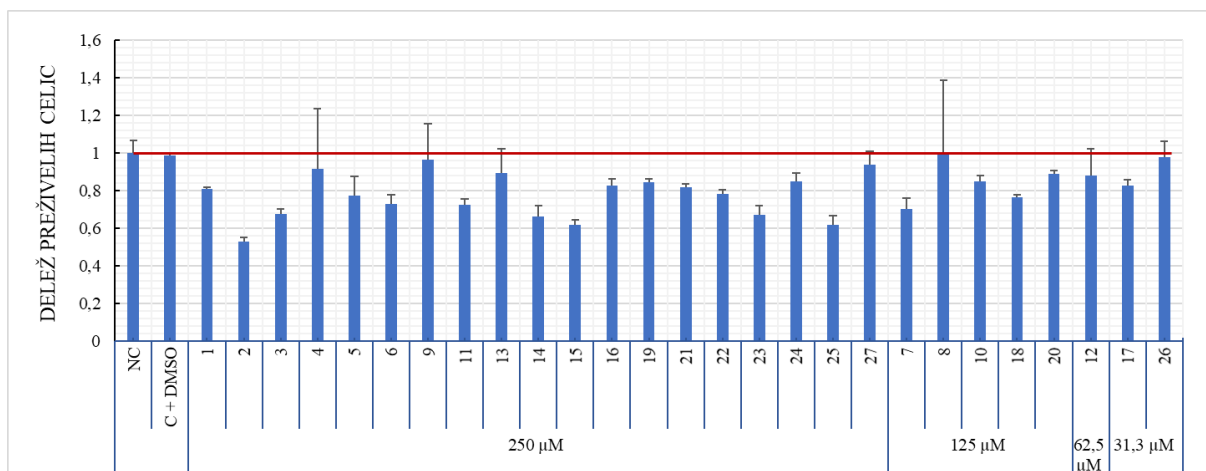
Osnovne raztopine vrednotenih spojin smo pripravili z raztapljanjem v ustreznem volumnu DMSO. Začetna koncentracija pripravljenih raztopin je za vse spojine znašala 500 μM . Pri pripravi raztopin nismo imeli težav. Večina spojin je bila v DMSO dobro topna. Tako pripravljenim začetnim raztopinam smo določili topnost v celičnem gojišču. Pri testiranju topnosti smo raztopine spojin dodajali celičnemu gojišču tako, da je DMSO predstavljal 1 v/v %, saj je v višjih koncentracijah DMSO dokazano citotoksičen. Ob ponavljajoči slabi topnosti spojin v celičnem gojišču smo raztopine spojin redčili največ do koncentracije 62,5 μM .

Topnost raztopin spojin v celičnem gojišču je pogoj za izvajanje bioloških testiranj. Prisotni kristali bi lahko mehansko poškodovali celice in potencialno vplivali na povišane rezultate testov citotoksičnosti. V preliminarnih testih agonizma bi bila koncentracija raztopine netopne spojine lažno nižja, kar bi lahko povzročilo lažno negativne ali pozitivne rezultate testiranj. Zaradi morebitnega izpadanja kristalov smo topnost ponovno preverili po 24 h in šele potem dokončno določili koncentracije osnovnih raztopin. Pri vrednoteni raztopini spojine **17** smo opazili dodatno izpadanje kristalov pri koncentraciji 62,5 μM . Nadaljnega redčenja nismo izvedli, kljub temu pa smo se odločili, da spojino vključimo v nadaljnja biološka testiranja. Neustrezno topnost bomo ob agonističnem delovanju spojine vključili v interpretacijo rezultatov.

Preglednica 18: Koncentracije osnovnih raztopin, pri katerih so spojine topne v celičnem gojišču pri 25 °C.

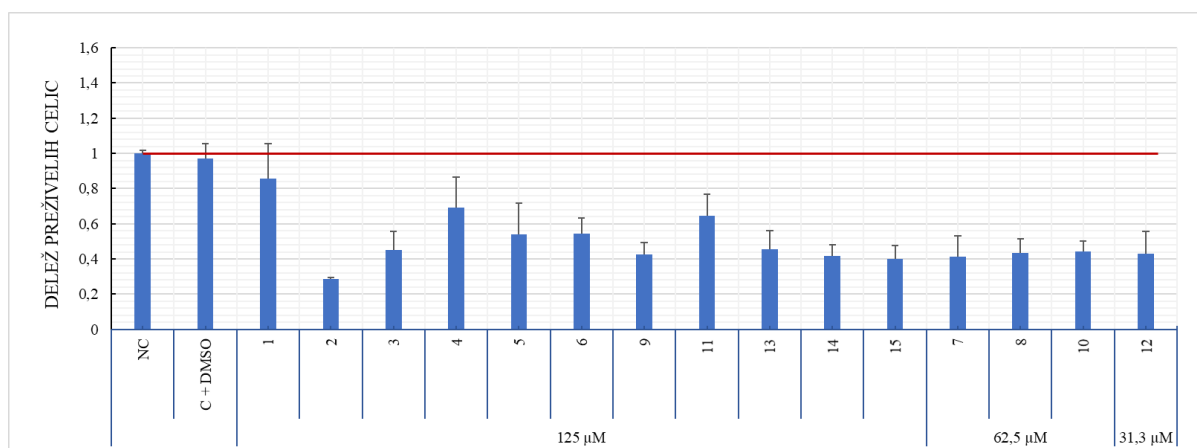
<u>50 mM</u>	<u>25 mM</u>	<u>12,5 mM</u>	<u>6,25 mM</u>
<u>1</u>	<u>7</u>	<u>12</u>	<u>17</u>
<u>2</u>	<u>8</u>	/	<u>26</u>
<u>3</u>	<u>10</u>	/	/
<u>4</u>	<u>18</u>	/	/
<u>5</u>	<u>20</u>	/	/
<u>6</u>	/	/	/
<u>9</u>	/	/	/
<u>11</u>	/	/	/
<u>13</u>	/	/	/
<u>14</u>	/	/	/
<u>15</u>	/	/	/
<u>16</u>	/	/	/
<u>19</u>	/	/	/
<u>21</u>	/	/	/
<u>22</u>	/	/	/
<u>23</u>	/	/	/
<u>24</u>	/	/	/
<u>25</u>	/	/	/
<u>27</u>	/	/	/

5.2.3 CITOTOKSIČNOST SPOJIN



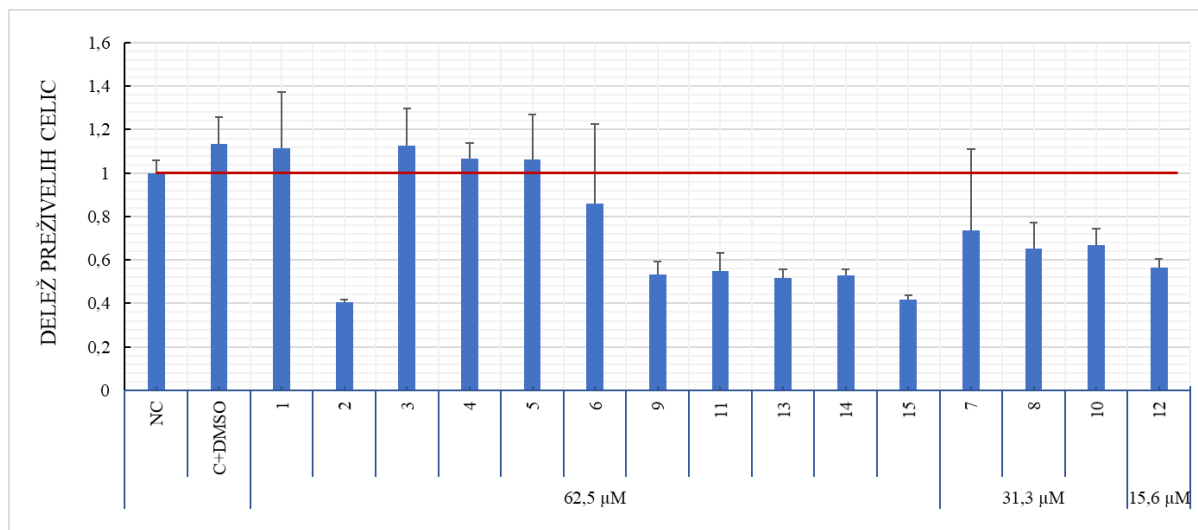
Slika 30: Citotoksičnost pri $C_{max}/2$ glede na topnost: Na osi x so razporejene raztopine spojin glede na koncentracijo v končnem celičnem gojišču, kjer DMSO predstavlja 0,5 v/v %. V končnem celičnem gojišču znaša koncentracija spojin 1 do 27 250 µM, 7 do 20 125 µM, spojine 12 62,5 µM in za spojini 17 ter 26 31,3 µM. Os y prikazuje delež preživelih celic, ki je premosorazmeren z intenziteto izmerjene absorbance pri 492 nm.

(NC = netretirane celice, C+DMSO = celice z dodanim DMSO v končni koncentraciji 0,5 v/v %).



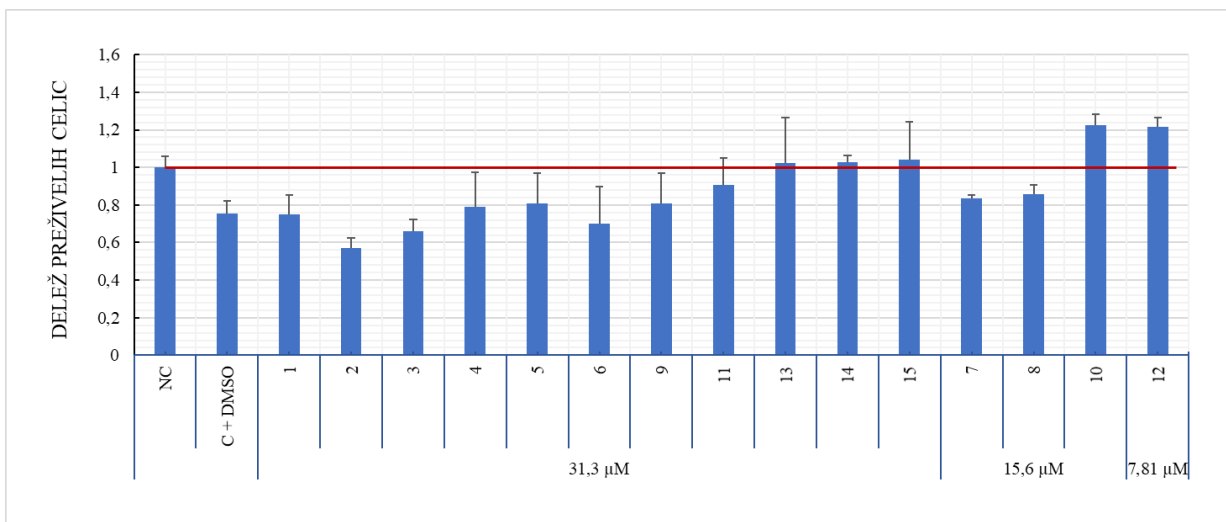
Slika 31: Citotoksičnost pri $C_{max}/4$ glede na topnost: Na osi x so razporejene raztopine spojin glede na koncentracijo spojine v končnem celičnem gojišču, kjer DMSO predstavlja 0,25 v/v %. V končnem celičnem gojišču znaša koncentracija spojin 1 do 15 125 µM, 7 do 10 62,5 µM in spojine 12 31,3 µM. Os y prikazuje delež preživelih celic, ki je premosorazmeren z intenziteto izmerjene absorbance pri 492 nm.

(NC = netretirane celice, C+DMSO = celice z dodanim DMSO v končni koncentraciji 0,25 v/v %).



Slika 32: Citotoksičnost pri $C_{max}/8$ glede na topnost: Na osi x so razporejene raztopine spojin glede na koncentracijo spojine v končnem celičnem gojišču, kjer DMSO predstavlja 0,125 v/v %. V končnem celičnem gojišču znaša koncentracija spojin 1 do 15 62,5 μM , 7 do 10 31,3 μM in spojine 12 15,6 μM . Os y prikazuje delež preživelih celic, ki je premosorazmeren z intenziteto izmerjene absorbance pri 492 nm.

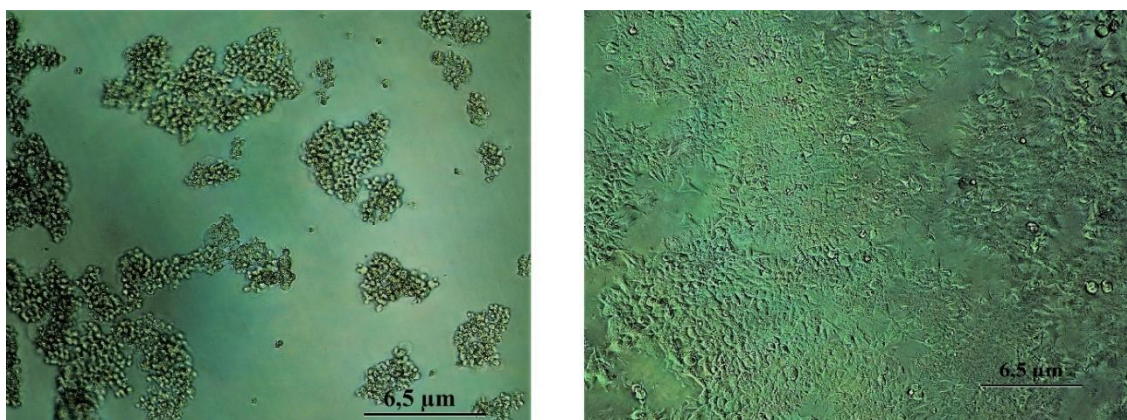
(NC = netretirane celice, C+DMSO = celice z dodanim DMSO v končni koncentraciji 0,125 v/v %).



Slika 33: Citotoksičnost pri $C_{max}/16$ glede na topnost: Na osi x so razporejene raztopine spojin glede na koncentracijo spojine v končnem celičnem gojišču, kjer DMSO predstavlja 0,0625 v/v %. V končnem celičnem gojišču znaša koncentracija spojin 1 do 15 31,3 μM , 7 do 10 15,6 μM in spojine 12 7,81 μM . Os y prikazuje delež preživelih celic, ki je premosorazmeren z intenziteto izmerjene absorbance pri 492 nm.

(NC = netretirane celice, C+DMSO = celice z dodanim DMSO v končni koncentraciji 0,0625 v/v %).

Citotoksičnost spojin smo določali z uporabo MTS-testa. Delež preživelih celic, tretiranih s posamezno spojino, smo določili glede na intenziteto absorbance netretiranih celic, ki predstavlja 100 % preživetje. Citotoksičen vpliv DMSO smo določili s slepo meritvijo DMSO v enaki koncentraciji kot pri raztopinah spojin. Glede na poročanje o citotoksičnem vplivu DMSO pri koncentraciji 1 v/v % smo se odločili, da bomo raztopine spojin v celično gojišče dodajali tako, da bo največja končna koncentracija DMSO v celičnem gojišču 0,5 v/v %. Na podlagi meritev smo pripravili grafe z odzivi, s katerimi smo določali citotoksične vplive posameznih spojin. S pomočjo grafičnega prikaza in mikroskopskega pregleda posameznih polj smo določili koncentracije spojin v celičnem gojišču, pri katerih ni citotoksičnosti. **Slika 30** prikazuje odzive vseh spojin in kontrol pri $C_{max}/2$. Omeniti je potrebno, da ima na meritve velik vpliv biološka variabilnost, ki smo jo upoštevali pri interpretaciji rezultatov. Skupina spojin z oznako **16–27** ne izkazuje večjih citotoksičnih učinkov. Manjši odzivi niso posledica citotoksičnosti, ampak biološke variabilnosti. Pri mikroskopskem pregledu je bilo pri nekaterih spojinah opazna zgolj manjša zaustavitev rasti celic. Spojine **1–15** smo označili kot citotoksične. Mikroskopski pregled celic, tretiranih z omenjenimi spojinami, je pokazal morfološko spremenjene in mrtve celice (slika 34). Velik odziv pri spojinah **4**, **9** in **13** ni posledica sproščenega formazana, temveč posledica encimov celične smrti. Z meritvijo pri $C_{max}/2$ smo izključili citotoksičnost kupljenih spojin **16–27**. Nadaljnje meritve se navezujejo samo na spojine **1–15**. Omenjena skupina izkazuje močno citotoksično delovanje. Določitev končnih koncentracij, pri katerih spojine ne izkazujejo več citotoksičnosti, je prikazana v **Preglednici 19**.

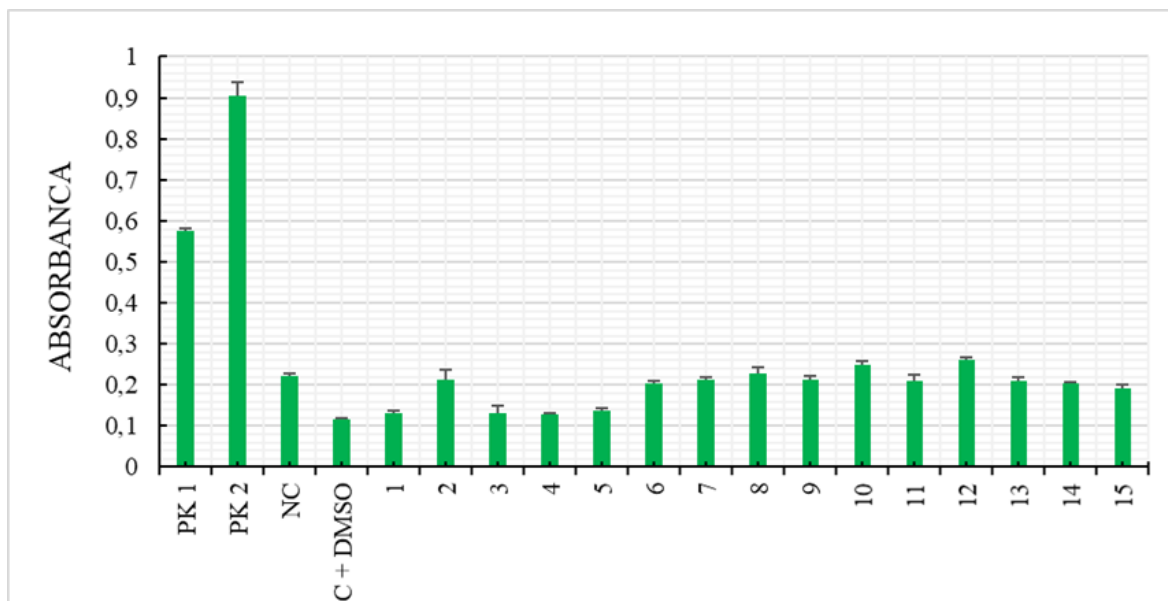


Slika 34: Primerjava morfologije mrtvih celic, tretiranih s spojino **9** (levo), z netretiranimi celicami (desno). Spojina **9** ima pri $C_{max}/2$ odziv, ki nakazuje na velik delež preživetja celic. Morfologija mrtvih celic se vidno razlikuje od morfologije živih celic na desni strani. Mrtve celice se združujejo v skupke in zavzemajo manjšo površino testnega polja.

Preglednica 19: Koncentracije spojin v celičnem gojišču, pri katerih ni citotoksičnosti, in delež DMSO v celičnem gojišču zaradi različnih volumnov raztopin spojin.

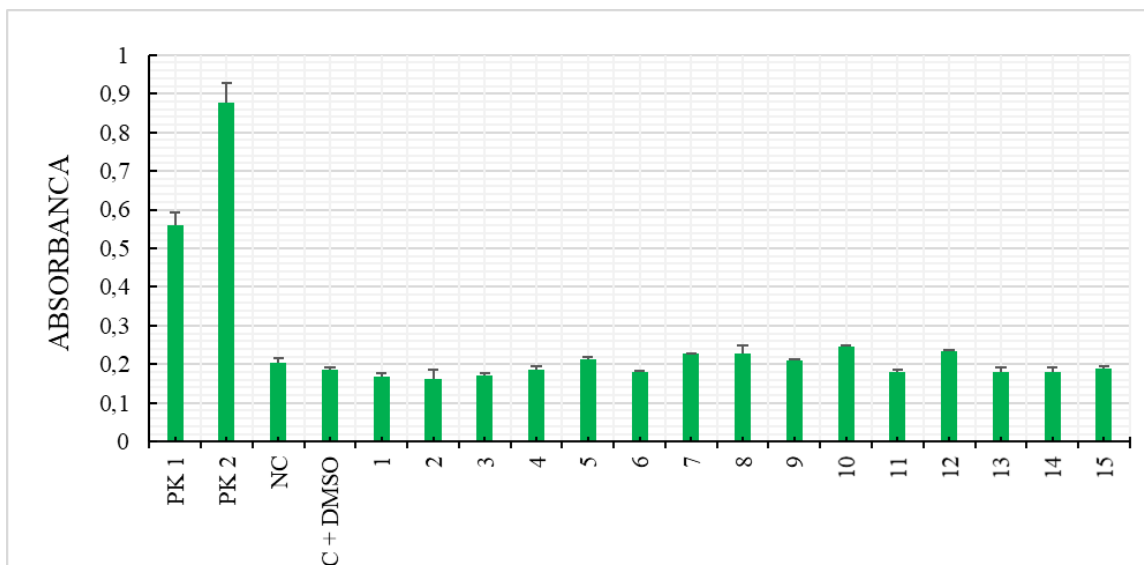
0,5 % raztopina DMSO v končnem gojišču s celicami	0,125 % raztopina DMSO v končnem gojišču s celicami	0,0625 % raztopina DMSO v končnem gojišču s celicami
<u>16</u> (250 µM)	<u>1</u> (62,5 µM)	<u>2</u> (31,3 µM)
<u>17</u> (31,3 µM)	<u>3</u> (62,5 µM)	<u>6</u> (31,3 µM)
<u>18</u> (125 µM)	<u>4</u> (62,5 µM)	<u>7</u> (15,6 µM)
<u>19</u> (250 µM)	<u>5</u> (62,5 µM)	<u>8</u> (15,6 µM)
<u>20</u> (125 µM)		<u>9</u> (31,3 µM)
<u>21</u> (250 µM)		<u>10</u> (15,6 µM)
<u>22</u> (250 µM)		<u>11</u> (31,3 µM)
<u>23</u> (250 µM)		<u>12</u> (7,81 µM)
<u>24</u> (250 µM)		<u>13</u> (31,3 µM)
<u>25</u> (250 µM)		<u>14</u> (31,3 µM)
<u>26</u> (31,3 µM)		<u>15</u> (31,3 µM)
<u>27</u> (250 µM)		

5.2.4 PRELIMINARNI TESTI AGONIZMA



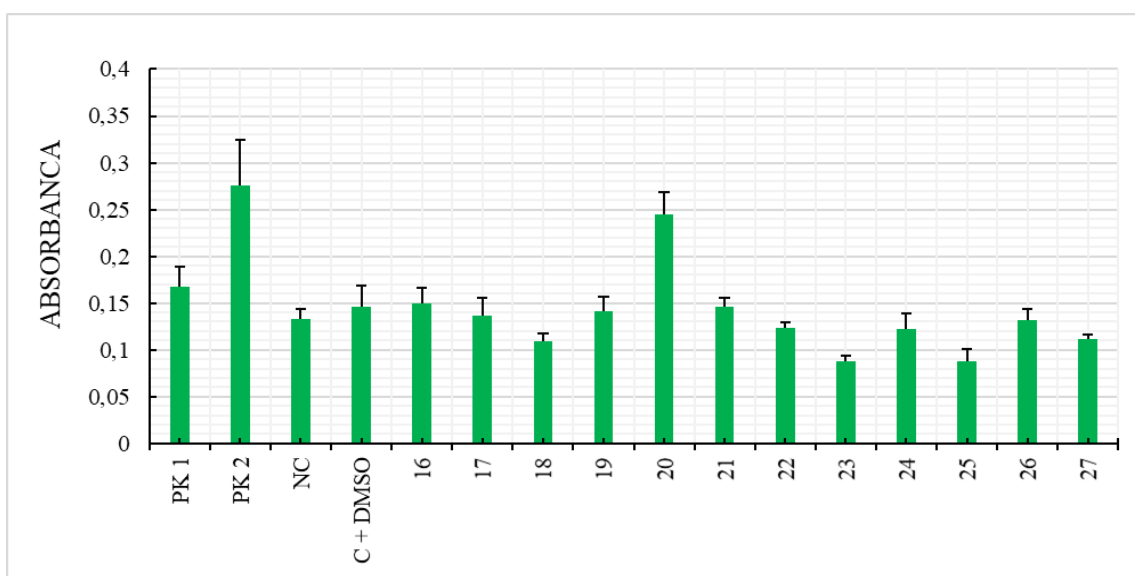
Slika 35: Preliminarni test agonizma, 1. ponovitev za spojine 1–15. Na osi x so razporejene raztopine spojin glede na končno koncentracijo in delež DMSO, kot je navedeno v *Preglednici 19*, pri katerih ni več citotoksičnih učinkov. Os y predstavlja intenziteto absorbance posamezne raztopine spojin pri 620 nm.

(PK 1 = imikvimod v končni koncentraciji 1 µg/ml, PK 2 = imikvimod v končni koncentraciji 2,5 µg/ml, NC = netretirane celice, C+DMSO = celice z dodanim DMSO v končni koncentraciji 0,125 v/v %).



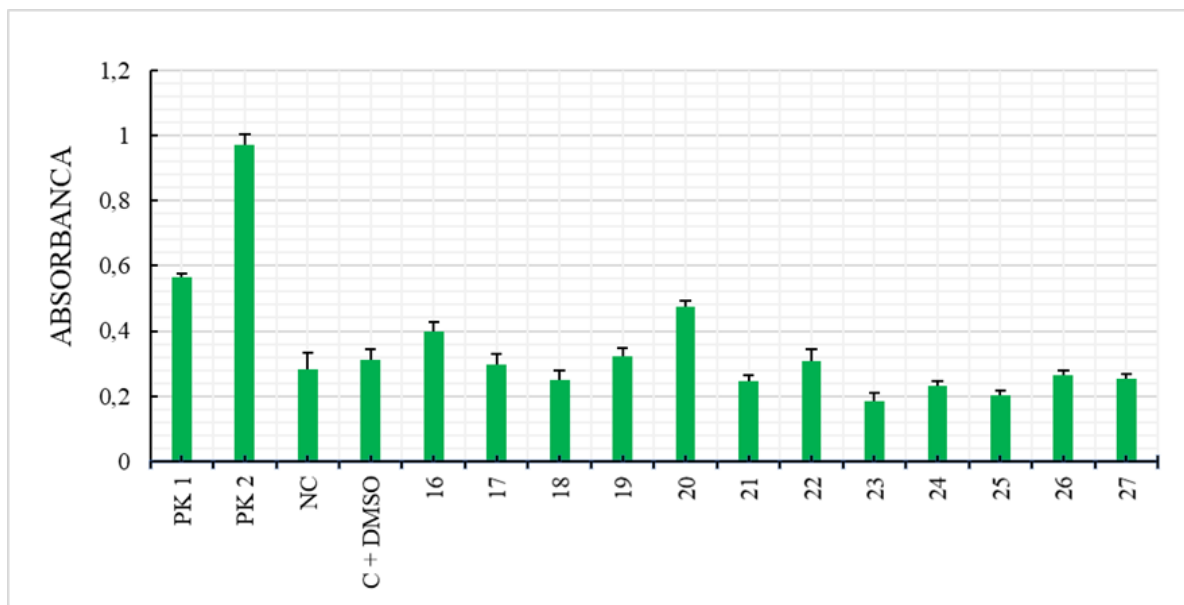
Slika 36: Preliminarni test agonizma, 2. ponovitev za spojine 1–15. Na osi x so razporejene raztopine spojin glede na končno koncentracijo in delež DMSO, kot je navedeno v *Preglednici 19*, pri katerih ni več citotoksičnih učinkov. Os y predstavlja intenziteto absorbance posamezne raztopine spojine pri 620 nm.

(PK 1 = imikvimod v končni koncentraciji 1 µg/ml, PK 2 = imikvimod v končni koncentraciji 2,5 µg/ml, NC = netretirane celice, C+DMSO = celice z dodanim DMSO v končni koncentraciji 0,125 v/v %).



Slika 37: Preliminarni test agonizma, 1. ponovitev za spojine 16–27. Na osi x so razporejene raztopine spojin glede na končno koncentracijo in delež DMSO, kot je navedeno v *Preglednici 19*, pri katerih ni več citotoksičnih učinkov. Os y predstavlja intenziteto absorbance posamezne raztopine spojine pri 620 nm.

(PK 1 = imikvimod v končni koncentraciji 1 µg/ml, PK 2 = imikvimod v končni koncentraciji 2,5 µg/ml, NC = netretirane celice, C+DMSO = celice z dodanim DMSO v končni koncentraciji 0,5 v/v %).



Slika 38: Preliminarni test agonizma, 2. ponovitev za spojine 16–27. Na osi x so razporejene raztopine spojin glede na končno koncentracijo in delež DMSO, kot je navedeno v *Preglednici 19*, pri katerih ni več citotoksičnih učinkov. Os y predstavlja intenziteto absorbance posamezne raztopine spojine pri 620 nm.

(PK 1 = imikvimod v končni koncentraciji 1 µg/ml, PK 2 = imikvimod v končni koncentraciji 2,5 µg/ml, NC = netretirane celice, C+DMSO = celice z dodanim DMSO v končni koncentraciji 0,5 v/v %).

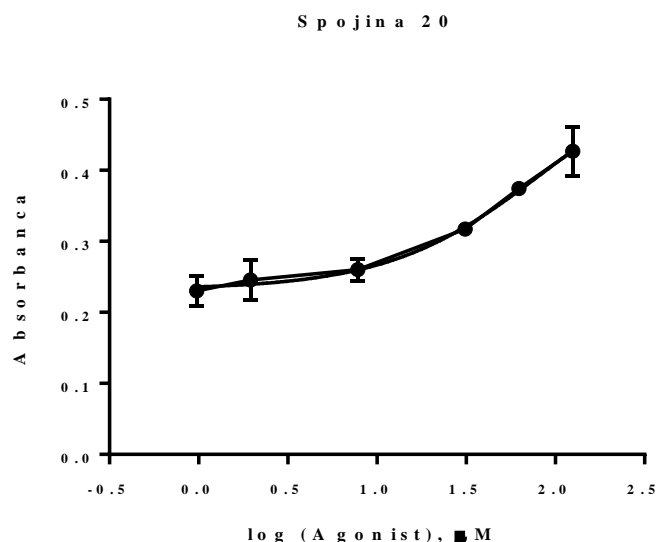
Agonistično delovanje spojin smo določili z merjenjem absorbance spojin in kontrol po inkubaciji s QUANTI-Blue™ barvilom pri 620 nm. Koncentracije končnih raztopin spojin in delež prisotnega DMSO glede na posamezno raztopino so navedene v *Preglednici 19*. Koncentracije se nanašajo na predhodno določeno topnost in citotoksičnost posamezne spojine. Potencialno agonistično delovanje smo določili s primerjavo odziva posamezne spojine z odzivom pozitivne kontrole, imikvimoda v dveh končnih koncentracijah (1 µg/ml in 2,5 µg/ml). Na *Slikah 35* in *36* sta prikazani meritvi agonističnega delovanja spojin 1–15, od katerih nobena ne izkazuje vidnejšega agonističnega delovanja. Končne koncentracije vrednotenih spojin so zaradi izvedenih redčitev spojin v okviru testov topnosti in citotoksičnosti nižje v primerjavi s koncentracijo pozitivne kontrole v končnem celičnem gojišču. Aktivnost spojin 16–27 smo ovrednotili z meritvama, prikazanima na *Sliki 37* in *38*. Potencialno agonistično delovanje je izkazala spojina 20. Iz grafov je razvidno, da je odziv spojine nižji v primerjavi s pozitivno kontrolo. Nižji odziv nakazuje na šibkejše agonistično delovanje spojine, kar je lahko posledica kemijske strukture spojine ali njene koncentracije v končnem celičnem gojišču. Pri interpretaciji odziva je potrebno poudariti, da koncentracija spojine v celičnem gojišču ni enaka imikvimodu v končni koncentraciji 2,5 µg/ml. Odziva spojine 20 se glede na izvedeni meritvi

rahlo razlikujeta v intenziteti odziva. Nižji odziv na **Sliki 38** lahko z največjo verjetnostjo pripišemo biološki raznolikosti celic. Omeniti je potrebno, da je k nižjemu odzivu zagotovo v manjši meri prispevala razlika v gostoti posaditve celic med obema meritvama. Pri drugi meritvi smo pred izvedbo druge faze opazili, da so testna polja spojine **20** za približno 1 % redkeje posajena s celicami kot v isti fazi prve meritve. Temu opažanju sprva nismo pripisali večjega pomena, zato smo meritev kljub temu izvedli. Vpliv gostote posajenosti se je pokazal šele s primerjavo obeh meritev. Na osnovi preliminarnega testa agonizma lahko trdimo, da spojina **20** izraža agonistično delovanje. Predvidevamo lahko tudi, da je spojina glede na koncentracijo v končnem celičnem gojišču šibkejši agonist kot imikvimod, zato smo spojini **20** izračunali vrednost EC₅₀.

5.2.5 DOLOČITEV EC₅₀

Preglednica 20: Vrednosti absorbanc za spojino 20.

Koncentracija[μM]	125,0	62,5	31,3	7,81	1,95	0,977
Absorbanca	0,4267	0,3743	0,3173	0,2603	0,2457	0,2303

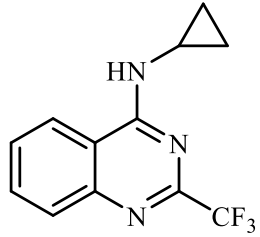


Slika 39: Graf odvisnosti odziva od logaritma koncentracije.

Izračunana vrednost srednje efektivne koncentracije za spojino **20** znaša 84,5 μ M ($R^2=0,94$). Poleg determinacijskega koeficienta (R^2) vrednost srednje efektivne koncentracije potrjuje ustrezna oblika krivulje na grafu absorbance v odvisnosti od logaritma koncentracije liganda.

Na podlagi literaturne vrednosti EC₅₀ Imikvimoda (EC₅₀=2,1 μM) in Resikvimoda (EC₅₀=1,0 μM) testirana spojina izraža šibkejšo agonistično delovanje (40, 41).

Preglednica 21: Analitika in lastnosti spojine 20.

N-CIKLOPROPIL-2-(TRIFLUOROMETIL)KINAZOLIN-4-AMIN		
Sestava	C ₁₂ H ₁₀ F ₃ N ₃	
Molska masa	253,23	
Opis	Rumeni kristali	
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ(ppm)	δ(ppm) 0,69–0,73 (m, 2H, CH ₂); 0,82–0,87 (m, 2H, CH ₂); 3,10–3,16 (m, 1H, CH); 7,66 (ddd, <i>J</i> ₁ = 1,5 Hz, <i>J</i> ₂ = 6,8 Hz, <i>J</i> ₃ = 8,3 Hz, 1H, Ar-H); 7,84 (dd, <i>J</i> ₁ = 1,2 Hz, <i>J</i> ₂ = 8,3 Hz, 1H, Ar-H); 7,87 (ddd, <i>J</i> ₁ = 1,3 Hz, <i>J</i> ₂ = 6,8 Hz, <i>J</i> ₃ = 8,1 Hz, 1H, Ar-H); 8,34 (d, <i>J</i> = 8,1 Hz, 1H, Ar-H); 8,74 (d, <i>J</i> = 3,8 Hz, 1H, NH)	
¹³ C-NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ(ppm)	δ(ppm) 6,0; 24,4; 114,7; 120,0 (q, <i>J</i> _{C-F} = 276,9 Hz); 123,0; 127,7; 128,1; 133,7; 147,9; 151,9 (q, <i>J</i> _{C-F} = 34,9 Hz); 161,7	
MS	Izračunana vrednost za C ₁₂ H ₁₀ F ₃ N ₃ : 253,23 [M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z): 252,23	
HLPC ((<i>t</i> _r))	9,100 min (99,7 % čistost)	

5.2.6 VPLIV CITOTOKSIČNOSTI NA IZRAŽANJE AGONIZMA

Sintetizirane spojine so se izkazale kot izredno citotoksične, kljub temu da so strukturno podobne kupljenim spojinam, ki citotoksičnosti niso izražale v takšnem obsegu. Razlike v citotoksičnem izražanju so nas napeljale k razmišljanju, da struktura spojin ni nujno vzrok citotoksičnosti. Možen vzrok bi lahko predstavljala neznan anorganska snov, ki je nastala v procesu sinteznega postopka in je z analiznimi metodami nismo uspeli identificirati. Na podlagi teh predvidevanj bi bilo potrebno vse sintetizirane spojine dodatno očistiti s kolonsko kromatografijo. Smiselno bi bilo dodatno preučiti citotoksičen vpliv vpeljanih substituentov na mestu 4 in vpliv drugih dejavnikov biološkega vrednotenja (možen vpliv drugih mikroorganizmov). Končne koncentracije sintetiziranih spojin v celičnem gojišču so bile pri

preliminarnih testih agonizma nizke, kar je lahko razlog za odsotnost agonističnega delovanja. V sklopu magistrske naloge smo bili prvi, ki smo ovrednotili agonizem obravnavanih spojin. Na osnovi aktivnosti ene spojine nismo uspeli pridobiti dovolj informacij za opredelitev odnosa med strukturo in delovanjem spojine (SAR), kar je bil eden izmed namenov naše magistrske naloge.

6 SKLEP

V okviru magistrske naloge smo uspešno sintetizirali derivate 2-trifluorometilkinazolina in 2-trifluorometilkinolina z vpeljavo različnih aminov na mesto 4. V drugem delu smo biološko ovrednotili sintetizirane in pridružene kupljene spojine. Na osnovi aktivnosti ene spojine nismo uspeli pridobiti dovolj informacij za opredelitev odnosa med strukturo in delovanjem spojine (SAR).

Ključni pogoj za izvedbo preliminarnih testov agonizma je bila ustrezna topnost spojine z odsotnostjo citotoksičnosti. Oba dejavnika sta vplivala na končne koncentracije spojin v preliminarnih testih agonizma. V splošnem s topnostjo spojin nismo imeli večjih težav, obsežnejše redčitve smo izvajali v primeru citotoksičnosti, ki se je razlikovala glede na izvor posamezne spojine.

Kupljene spojine (15–27) niso izražale citotoksičnosti, kar pomeni, da smo agonizem testirali pri največji dovoljeni koncentraciji. Tu citotoksičnost spojin ni imela vpliva na rezultate testov agonizma. Edina spojina z agonističnim delovanjem je bila spojina **20** z vrednostjo $EC_{50} = 84,5 \mu\text{M}$ in $R^2 = 0,94$. **Sintetizirane spojine (1–14)** so za razliko od kupljenih izražale občutno povečano citotoksičnost, kar je imelo za posledico obsežne redčitve. Nizke koncentracije spojin v končnem celičnem gojišču predstavljajo možen vzrok za odsotnost agonizma.

Spojina **20** (*N*-ciklopropil-2-(trifluorometil)kinazolin-4-amin) predstavlja pomembno izhodišče za razvoj novih nizkomolekularnih agonistov TLR7 na osnovi kinazolinskega in kinolinskega skeleta. Delno smo z odsotnostjo citotoksičnosti kupljenih derivatov uspeli dokazati, da citotoksičnost ni nujno posledica strukture spojin. Opredelitev vzroka citotoksičnosti, ustrezna modifikacija sinteznega postopka in sinteza novih aktivnih spojin predstavljajo glavne izzive za nadaljnje raziskave.

7 LITERATURA

1. Chaplin DD. Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010; 125 (2): 3–23.
2. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ and Henderson G. Rang and Dale's Pharmacology. 7th Ed. Churchill Livingstone Elsevier. London. 2011; 70–90, 316–40.
3. Landis-Piwowar KR. Overview of the Immune Response and Regulation. *Clinical Laboratory Science Winter*. 2015; 28 (1): 35–7.
4. Abbas AK, Lichtman AH. *Cellular and Molecular Immunology*. Saunders Elsevier. Philadelphia. 2005; 6–36.
5. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet*. 2001; 357 (9270): 1778–89.
6. Corthay A.: How do Regulatory T Cells Work? *Scandinavian Journal Of Immunology*. 2009; 70 (4): 326–36.
7. Jang JH, Shin HW, Lee JM, Lee H-W, Kim E-C, Park SH. An Overview of Pathogen Recognition Receptors for Innate Immunity in Dental Pulp. *Mediators of Inflammation*; 2015.
8. Roers A, Hiller B, Hornung V. Recognition of Endogenous Nucleic Acids by the Innate Immune System. *Immunity*. 2016; 44 (4): 739–54.
9. Jeannin P, Jaillon S, Delneste Y. Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells. *Current Opinion in Immunology*. 2008; 20 (5): 530–7.
10. Clark R, Kupper T. Old Meets New: The Interaction Between Innate and Adaptive Immunity. *Journal of Investigative Dermatology*. 2005; 125: 629–37.
11. Palucka K, Banchereau J. Dendritic cells: A link between innate and adaptive immunity. *Journal of Clinical Immunology*. 1999; 19 (1): 12–25.
12. Van der Meide PH, Schellekens H. Cytokines and the immune response. *Biotherapy Dordrecht, Netherlands*. 1996;8(3–4): 243–9.
13. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*. 2005; 17(1): 1-14.
14. Kaisho T., Akira S.: Toll-like receptor function and signaling. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006; 117(5): 979–87.
15. Barton GM. Viral recognition by Toll-like receptor. *Seminars in Immunology*. 2007; 19(1): 33–40.

16. Yamamoto M, Takeda K. Current Views of Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Gastroenterology Research and Practice*; 2010.
17. Jiménez-Dalmaroni MJ, Gerswhin ME, Adamopoulos IE. The critical role of toll-like receptors - From microbial recognition to autoimmunity. A comprehensive review. *Autoimmunity Reviews*. 2016; 15(1):1–8.
18. Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009; 388(4): 621–5.
19. Gentile F, Tuszynski JA, Deriu MA, Licandro G, Prunotto A, Danani A. Structure based modeling of small molecules binding to the TLR7 by atomistic level simulations. *Molecules*. 2015; 20(5): 8316–40.
20. Zhang Z, Ohto U, Shibata T, Krayukhina E, Taoka M, Yamauchi Y. Structural Analysis Reveals that Toll-like Receptor 7 Is a Dual Receptor for Guanosine and Single-Stranded RNA. *Immunity*. 2016; 45(4): 737–48.
21. Kobold S, Wiedemann G, Rothenfußer S, Endres S. Modes of action of TLR7 agonists in cancer therapy. *Immunotherapy*. 2014; 6(10): 1085–95.
22. Hennessy EJ, Parker AE, O'Neill LAJ. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nat Rev Drug Discov*. 2010; 9(4): 293–307.
23. Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nature Medicine*. 2007; 13(5): 552–9.
24. Smits ELJM, Ponsaerts P, Berneman ZN, Van Tendeloo VFI. The use of TLR7 and TLR8 ligands for the enhancement of cancer immunotherapy. *The Oncologist*. 2008; 13(8): 859–75.
25. Kaczanowska S, Joseph AM, Davila E. TLR agonists: our best frenemy in cancer immunotherapy. *Journal of Leukocyte Biology*. 2013; 93(6): 847–63.
26. O'Neill LAJ, Bryant CE, Doyle SL. Therapeutic targeting of Toll-like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer. *Pharmacological Reviews*. 2009; 61(2): 177–97.
27. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nature Immunology*. 2002; 3(2): 196–200.

28. Averett DR, Fletcher SP, Li W, Webber SE, Appleman JR: The pharmacology of endosomal TLR agonists in viral disease. *Biochemical Society Transactions*. 2007; 35(6): 1468–72.
29. Delaney S, Biffen M, Maltby J, Bell J, Asimus S, Aggarwal A, Kraan M, Keeling D. Tolerability in man following inhalation dosing of the selective TLR7 agonist, AZD8848. *BMJ Open Respiratory Research*. 2016; 3(1):1–13.
30. Arens R, van Hall T, van der Burg SH, Ossendorp F, Melief CJM. Prospects of combinatorial synthetic peptide vaccine-based immunotherapy against cancer. *Seminars in Immunology*. 2013; 25(2): 182–90.
31. Bhardwaj N, Gnjatic S, Sawhney NB. TLR AGONISTS: Are They Good Adjuvants? *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*. 2010;16(4): 382–91.
32. Schön MP, Schön M. TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy. *Oncogene*. 2008; 27(2): 190–9.
33. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annual Review of Immunology*. 2003; 21: 335–76.
34. Heil F, Ahmad-Nejad P, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Gellert T, et al. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *European Journal of Immunology*. 2003; 33(11): 2987–97.
35. Jones P, Pryde DC, Tran T-D, Adam FM, Bish G, Calo F, et al. Discovery of a highly potent series of TLR7 agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2011; 21(19): 5939–43.
36. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/> [Navedeno 17. 5. 2017]. [Internet].
37. <http://www.invivogen.com/hek-blue-lps-detection-kit> [Navedeno 17. 5. 2017]. [Internet].
38. Khodarahmi G, Jafari E, Hakimelahi G, Abedi D, Rahmani Khajouei M, Hassanzadeh F. Synthesis of Some New Quinazolinone Derivatives and Evaluation of Their Antimicrobial Activities. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*. 2012; 11(3): 789–97.
39. Arnott EA, Chan, LC, Cox BG, Meyrick B, Phillips A. POCl₃ chlorination of 4-quinazolones. *The Journal of Organic Chemistry*. 2011; 76(6): 1653–61

40. Zagon IS, Donahue RN, Rogosnitzky M, McLaughlin PJ. Imiquimod upregulates the opioid growth factor receptor to inhibit cell proliferation independent of immune function. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*. 2008; 233(8): 968–79.
41. Ganapathi L, Van Haren S, Dowling DJ, Bergelson I, Shukla NM, Malladi SS, et al. The Imidazoquinoline Toll-Like Receptor-7/8 Agonist Hybrid-2 Potently Induces Cytokine Production by Human Newborn and Adult Leukocytes. *PloS One*. 2015; 10(8): 1–12.