

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



MATEVŽ SLIVNIK

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA NOVIH ANTAGONISTOV RECEPTORJA NOD2
NA OSNOVI *N*-ALKILBENZAMIDNEGA OSREDNJEGA OGRODJA**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF NOVEL NOD2 RECEPTOR ANTAGONISTS
BASED ON *N*-ALKYL BENZAMIDE CENTRAL SCAFFOLD**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

LJUBLJANA, 2018

Magistrsko delo sem opravljal na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom izr. prof. dr. Žige Jakopina, mag. farm. Analize spojin so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani in na Inštitutu Jožefa Štefana v Ljubljani.

ZAHVALA

V prvi vrsti bi se zahvalil svojem mentorju izr. prof. dr. Žigi Jakopinu, mag. farm., za odzivnost, iznajdljivost in vso pomoč ter nasvete tako pri delu v laboratoriju kot tudi med pisanjem magistrske naloge.

Prav tako pa bi se zahvalil svoji družini in puncu ter prijateljem za podporo in vzpodbudo tekom študija in opravljanja magistrske naloge. Brez vas bi bil študij zame brez dvoma težji.

ISKRENA HVALA!

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelal samostojno pod mentorstvom izr. prof. dr. Žige Jakopina, mag. farm.

Ljubljana, 2018

Matevž Slivnik

Predsednik komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm.

Član komisije: asist. dr. Janja Zupan, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
KLJUČNE BESEDE	VII
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1 UVOD.....	1
1.1 IMUNSKI SISTEM.....	1
1.1.1 Prirojena imunost.....	1
1.1.2 Pridobljena imunost.....	2
1.1.3 Topni mediatorji imunskega odziva	3
1.2 RECEPTORJI ZA PREPOZNAVO VZORCEV	4
1.2.1 Organizacija domen PRR-jev	5
1.2.2 NOD-u podobni receptorji (NLR)	5
1.3 RECEPTORJI NOD	6
1.3.1 Receptor NOD2 – zgradba, funkcije, signalizacijske poti in regulacija.....	7
1.3.2 Receptor NOD2 – povezava z boleznimi	9
1.3.3 Receptor NOD2 – terapevtski potencial antagonistov NOD2.....	10
1.3.4 Receptor NOD2 – znani antagonisti	11
2 NAMEN DELA	15
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 MATERIALI	16
3.2 METODE	16
3.2.1 Kromatografija.....	16
3.2.2 Spektroskopija	17
3.2.3 Določanje tališča.....	17
3.2.4 Biološko testiranje	17

4	EKSPERIMENTALNI DEL	19
4.1	REAKCIJSKA SHEMA 1	19
4.1.1	Sinteza <i>terc</i> -butil (3-((2-aminofenil)amino)-3-oksopropil)karbamata (1)	19
4.1.2	Sinteza <i>terc</i> -butil (2-(1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-il)etil)karbamata (2)	20
4.1.3	Sinteza etil 2-(2-(2-((<i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)etil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)acetata (3).....	21
4.2	REAKCIJSKA SHEMA 2.....	22
4.2.1	Sinteza etil 2-(2-(2-(fenilsulfonamido)etil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)acetata (4)	22
4.2.2	Sinteza <i>N</i> -(2,3-dihidro-1 <i>H</i> -inden-5-il)-2-(2-(2-(fenilsulfonamido)etil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)acetamida (5)	24
4.3	REAKCIJSKA SHEMA 3.....	25
4.3.1	Sinteza etil 2-(2-(2-(izonikotinamido)etil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)acetata (6)	26
4.3.2	Sinteza <i>N</i> -(2-(1-(2-((2,3-dihidro-1 <i>H</i> -inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-il)etil)izonikotinamida (7).....	27
4.4	REAKCIJSKA SHEMA 4.....	28
4.4.1	Sinteza etil 2-(2-(2-((5-(dimetilamino)naftalen)-1-sulfonamido)etil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)acetata (8).....	29
4.4.2	Sinteza <i>N</i> -(2,3-dihidro-1 <i>H</i> -inden-5-il)-2-(2-(2-(5-(dimetilamino)naftalen)-1-sulfonamido)etil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)acetamida (9)	30
4.5	REAKCIJSKA SHEMA 5.....	31
4.5.1	Sinteza etil 2-(2-(2-(piridin-3-sulfonamido)etil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)acetata (10)	32
4.5.2	Sinteza <i>N</i> -(2,3-dihidro-1 <i>H</i> -inden-5-il)-2-(2-(2-(piridin-3-sulfonamido)etil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)acetamida (11).....	33
4.6	REAKCIJSKA SHEMA 6.....	34
4.6.1	Sinteza <i>terc</i> -butil 4-((2-(1-(2-etoksi-2-oksoetil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-il)etil)karbamoil)piperidin-1-karboksilata (12)	35

4.6.2	Sinteza <i>terc</i> -butil 4-((2-(1-(2-((2,3-dihidro-1 <i>H</i> -inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-il)etil)karbamoi)piperidin-1-karboksilata (13)	36
4.6.3	Sinteza 4-(2-(1-(2-((2,3-dihidro-1 <i>H</i> -inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1- <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-il)etil)karbamoi piperidin-1-il klorida.....	37
4.7	REAKCIJSKA SHEMA 7.....	39
4.7.1	Sinteza etil 2-(2-(2-(2-(piridin-4-il)acetamido)etil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)acetata (15).....	39
4.7.2	Sinteza <i>N</i> -(2,3-dihidro-1 <i>H</i> -inden-5-il)-2-(2-(2-(2-(piridin-4-il)acetamido)etil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)acetamida (16).....	40
4.8	REAKCIJSKA SHEMA 8.....	42
4.8.1	Sinteza etil 2-(2-(2-(nikotinamido)etil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)acetata (17) 42	
4.8.2	Sinteza <i>N</i> -(2-(1-(2-((2,3-dihidro-1 <i>H</i> -inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-il)etil)nikotinamida (18).....	43
4.9	REAKCIJSKA SHEMA 9.....	45
4.9.1	Sinteza <i>terc</i> -butil (2-(1-(2-((2,3-dihidro-1 <i>H</i> -inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-il)etil)karbamata (19)	45
4.9.2	Sinteza 2-(2-(2-(benzilamino)etil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)- <i>N</i> -(2,3-dihidro-1 <i>H</i> -inden-5-il)acetamida (20)	47
4.9.3	Sinteza <i>N</i> -(2,3-dihidro-1 <i>H</i> -inden-5-il)-2-(2-(2-((piridin-4-ilmetil)amino)etil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)acetamida (21)	48
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	50
5.1	ODSTRANITEV BOC ZAŠČITE	50
5.2	ALKALNA HIDROLIZA ESTRA	51
5.3	TVORBA AMIDNE VEZI.....	51
5.4	CIKLIZACIJA MONO <i>N</i> -ACILIRANEGA 1,2-DIAMINO BENZENA	57
5.5	ALKILIRANJE OBROČNEGA DUŠIKA NA BENZIMIDAZOLNEM SKELETU	58
5.6	TVORBA SULFONAMIDNE VEZI	59

Matevž Slivnik:

Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorja NOD2 na osnovi N-alkilbenzamidnega osnovnega ogrodja

5.7	REDUKTIVNO AMINIRANJE ALDEHIDA.....	60
5.8	BIOLOŠKO TESTIRANJE.....	62
6	SKLEPI.....	67
7	VIRI IN LITERATURA.....	68

POVZETEK

Imunski sistem ščiti naše telo pred različnimi patogeni. Na grobo ga delimo na prirojeni in pridobljeni imunski sistem. Kljub temu da prirojeni imunski sistem ni zmožen antigen-specifičnega razlikovanja med patogeni, pa lahko prepozna tuje molekule s pomočjo receptorjev za prepoznavo vzorcev (PRR), ki prepoznajo molekulske vzorce značilne za patogene (PAMP) in molekulske vzorce značilne za nevarnost (DAMP). Ena izmed družin PRR-jev so NOD-u podobni receptorji (angl. Nod-like receptor — NLR), v katero sodita tudi receptorja NOD1 in NOD2. Gre za citosolna receptorja, ki prepoznavata citoplazemske PAMP. V primeru receptorja NOD1 je to iE-DAP, medtem ko je najmanjši fragment, ki ga prepozna receptor NOD2 MDP. Po prepoznavi liganda receptorja aktivirata signalne poti NF- κ B, IRF in MAPK, kar sproži vnetni odziv.

Receptor NOD2 kodira gen *CARD15*, različni polimorfizmi in mutacije na tem genu pa lahko spremenijo funkcijo NOD2, kar privede do kroničnih vnetnih, avtoimunskih in rakavih obolenj. Antagonisti NOD2 imajo zato terapevtski potencial pri zdravljenju bolezni, ki so posledica povečane signalizacije NOD2.

V sklopu magistrskega dela smo sintetizirali 10 novih antagonistov NOD2. Kot spojino vodnico smo uporabili *N*-(2-(1-(2,3-dihidro-1*H*-inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)metil)benzamid, pri kateri smo na mesto benzoilnega dela spojine uvedli različne substituentne s katerimi smo vplivali na vezavo na receptor in/ali fizikalno-kemijske lastnosti.

Za vse novo sintetizirane antagoniste so na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani izvedli teste citotoksičnosti in ovrednotili antagonistično delovanje na receptorja NOD1 in NOD2. Rezultati testov so pokazali, da 3 spojine (spojine **5**, **9** in **20**) izkazujejo boljšo NOD2 antagonistično aktivnost v primerjavi s spojino vodnico, kot najboljši antagonist NOD2 naše serije spojin pa se je izkazala spojina **20**. Večina novo sintetiziranih antagonistov NOD2 je imela primerljivo antagonistično delovanje tudi na receptor NOD1. Na osnovi rezultatov smo uspeli pridobiti nekaj informacij o odnosu med strukturo in delovanjem naših končnih spojin. Zamenjava benzoilnega dela spojine vodnice z arilsulfonilnim (spojini **5** in **9**) ali benzilnim delom (spojina **20**) je izboljšala NOD2 antagonistično aktivnost, medtem ko je prisotnost bazičnega centra pri spojinah **7**, **11**, **14**, **16**, **18** in **21** neugodno vplivala na NOD2 antagonistično aktivnost.

ABSTRACT

Immune system protects our body from various pathogens. We can roughly divide it in two groups: innate and adaptive immune system. Although the innate immune system is not capable of antigen-specific differentiation of pathogens, it can still recognize foreign molecules using the pattern recognition receptors (PRR), which recognize pathogen associated molecular patterns (PAMPs) and danger associated molecular patterns (DAMPs). NOD1 and NOD2 receptors belong to NLRs, which are one of the PRR families. NOD1 and NOD2 receptors are cytosolic receptors that recognize cytoplasmic PAMPs. In the case of NOD1 receptor that PAMP is iE-DAP, whereas MDP is the smallest fragment recognized by NOD2 receptor. After ligand recognition, the receptors activate NF- κ B, IRF and MAPK signaling pathways, which triggers inflammatory response.

NOD2 receptor is encoded by *CARD15* gene. Different polymorphisms and mutations on that particular gene can change the NOD2 function, which can lead to chronic inflammatory and autoimmune diseases or cancer. Therefore, NOD2 antagonists have a therapeutic potential in treating diseases that occur as a result of an increased NOD2 signaling.

In this master's thesis, we synthesized 10 novel NOD2 antagonists. We used *N*-(2-(1-(2,3-dihydro-1*H*-inden-5-yl)amino)-2-oxoethyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)methyl)benzamide as our lead compound. We replaced the benzoyl moiety of the lead compound with various substituents, affecting the receptor binding and/or physicochemical properties.

The Chair of Clinical Biochemistry, University Ljubljana, Faculty of pharmacy performed the cytotoxicity assay, NOD1 antagonistic activity evaluation and NOD2 antagonistic activity evaluation on newly synthesized antagonists. The results showed that three compounds (compounds **5**, **9** and **20**) expressed increased antagonistic activity compared to that of the lead compound with compound **20** being the best NOD2 antagonist of our compound series. Most of the newly synthesized NOD2 antagonists possessed similar NOD1 antagonistic activity.

Based on the results, we were able to gather some information regarding the structure-activity relationship of our final compounds. The replacement of our lead compound's benzoyl moiety with arylsulfonyl (compounds **5** in **9**) or benzyl moiety (compound **20**) improved the NOD2 antagonistic activity, while the presence of basic center in compounds **7**, **11**, **14**, **16**, **18** and **21** showed negative effect on the NOD2 antagonistic activity.

KLJUČNE BESEDE

Imunski sistem, receptor NOD2, antagonist NOD2, N-alkilbenzamid

SEZNAM OKRAJŠAV

ADP	angl. adenosine dipohosphate adenozin difosfat
ATP	angl. adenosine triphosphate adenozin trifosfat
BOC	terc-butiloksikarbonil
CARD	angl. caspase activation and recruitment domain domena kaspazne aktivacije in rekrutacije
CLR	angl. C-type lectin receptor receptorji za lektine tipa C
CRP	C-reaktivni protein
DAMP	angl. damage associated molecular pattern molekulski vzorec značilen za nevarnost
DHK	dokozaheksaenojska kislina
DMAP	4-dimetilaminopiridin
DMF	dimetilformamid
EDC×HCl	1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilkarbodiimid hidroklorid
EPK	eikozapentaenojska kislina
ESI	angl. electrospray ionization ionizacija z elektrorazprševanjem
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronijev heksafluorofosfat
HOBt	1-hidroksibenzotriazol
HPLC	angl. high-performance liquid chromatography tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HRMS	angl. high resolution mass spectrometry masna spektrometrija visoke ločljivosti
IC₅₀	angl. half maximal inhibitory concentration koncentracija učinkovine potrebna za 50% inhibicijo <i>in vitro</i>

iE-DAP	γ -D-glutamyl-mezo-diaminopimelinska kislina
IFN	interferon
IL	interlevkin
IRF	angl. Interferon regulatory factor z interferonom regulirani faktor
LLC	angl. Lewis lung carcinoma mišji model pljučnega raka
LRR	angl. leucine rich repeat domena bogata z levcinom
MAPK	angl. mitogen-activated protein kinases z mitogenom aktivirane proteinske kinaze
MAVS	angl. mitochondrial antiviral-signaling protein mitohondrijski protivirusni signalni protein
MDP	muramil dipeptid
MurNAc	N-acetilmuraminska kislina
NACHT	angl. NAIP-neuro nal apoptosis inhibitory protein centralna domena za vezavo nukleotidov
NF-κB	angl. nuclear factor κ B jedrni faktor κ B
NK	angl. natural killer cell naravna celica ubijalka
NLR	angl. NOD-like receptor NOD-u podobni receptor
NMR	angl. nuclear magnetic resonanc jedrska magnetna resonanca
NOD	angl. nucleotide-binding oligomerization domain nukleotid-vezoča oligomerizacijska domena
NSCLC	angl. non-small cell lung cancer nedrobnocelični pljučni rak
PAMP	angl. pathogen associated molecular pattern molekulski vzorec značilen za patogene
PGN	peptidoglikan

PRR	angl. pattern recognition receptor receptor za prepoznavo vzorcev
PTX	angl. paclitaxel paklitaksel
Rf	retencijski faktor
RIP2/RIPK2	angl. receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2 serin-treonin/tirozin proteinska kinaza 2
RLR	angl. RIG-I-like receptor RIG-I-u podobni receptor
SDS	angl. sodium dodecyl sulfate natrijev dodecilsulfat
TGF	angl. transforming growth factor transformirajoči rastni faktor
THF	tetrahidrofuran
TLC	angl. thin layer chromatography tenkoplastna kromatografija
TLR	angl. Toll-like receptor Toll-u podobni receptor
TME	angl. tumor microenvironment mikrookolje tumorja
TNF	angl. tumor necrosis factor dejavnik tumorske nekroze
tr	retencijski čas

1 UVOD

1.1 IMUNSKI SISTEM

Naše telo je vseskozi izpostavljeno različnim organizmom, ki naselijo našo kožo ali sluznico, lahko pa jih tudi vdihnemo ali pogoltnemo. Ali ti organizmi prodrejo v naše telo in povzročijo bolezen, pa je posledica njihove patogenosti (virulentnih dejavnikov, ki jih imajo na razpolago) in celovitosti naših obrambnih mehanizmov.

Imunski sistem je interaktivni sistem limfatičnih organov, celic, humoralnih faktorjev in citokinov. Njegova glavna naloga je zaščita gostitelja pred patogeni, mikrobi, alergeni, toksini, štiti pa ga tudi pred tumorskimi celicami. Pomanjkljivo delovanje imunskega sistema privede do hudih infekcij ali nastanka tumorjev, medtem ko njegova prekomerna aktivnost povzroča alergije in avtoimunske bolezni. Imunost na grobo lahko delimo na prirojeno (nespecifično) in pridobljeno (specifično) imunost, ki se razlikujeta tako glede na hitrost in specifičnost odziva, kakor tudi na komponente, ki pri posameznem odzivu sodelujejo (1).

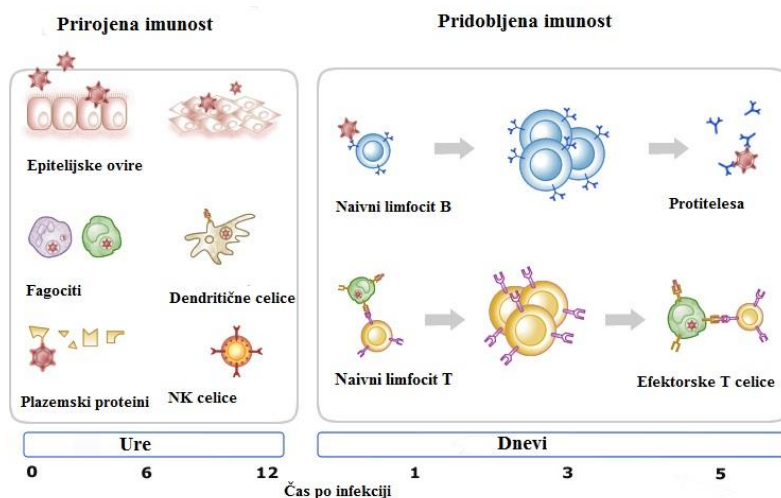
1.1.1 Prirojena imunost

Prirojen (naravni, nespecifičen) imunski sistem je prva linija obrambe pred patogeni. Gre za podedovan sistem, ki ga sestavljajo celice in molekule, ki so vedno prisotne v telesu ter pripravljene na mobilizacijo in boj z mikrobi na mestu okužbe. Glavne komponente prirojenega imunskega sistema so fizične epitelijske ovire, fagocitni levkociti, dendritične celice, naravne celice ubijalke (angl. natural killer cells – NK) in določeni plazemski proteini, kot sta C-reaktivni protein (CRP) in sistem komplementa (Slika 1). Sistem deluje takoj in je zmožen prepoznati tuje molekule s pomočjo receptorjev za prepoznavo vzorcev (angl. pattern recognition receptors – PRRs), ki lahko prepoznajo molekulske vzorce, značilne za patogene (angl. pathogen-associated molecular patterns). Kljub temu pa ni zmožen antigen-specifičnega razlikovanja med patogeni. Glede na to, da interakcije, ki omogočajo prirojenemu imunskemu odzivu, da uniči patogene (fagocitoza, opsonizacija, liza,...), potrebujejo izpostavljenost površini mikrobov, je sistem v glavnem omejen na odstranjevanje bakterij. Poleg tega pride zaradi nespecifičnosti in slabo ciljanega odziva pogosto tudi do poškodb zdravih tkiv, ki jih sistem ni uspel ločiti od tujih (1–3).

1.1.2 Pridobljena imunost

Pridobljen oziroma specifičen imunski odziv se sproži, ko v telo gostitelja vdre tujek (antigen), in če mehanizmi prirojenega (nespecifičnega) imunskega odziva niso zadostni ali pa odpovedo. Ena izmed poglavitnih lastnosti pridobljenega imunskega sistema je "imunski spomin", saj si pridobljeni imunski sistem zapomni vsak vdor tuje snovi v telo gostitelja. Posledično so obrambni mehanizmi ob naslednjem vdoru istega tujka v telo učinkovitejši. Poleg tega izboljša obrambne mehanizme prirojenega imunskega odziva, jih vodi ali osredotoči na mesto vdora antigena in jim omogoči lažjo odstranitev tujka. V primerjavi z naravnim imunskim odzivom je pridobljeni imunski odziv bolj specifičen, vendar pa njegov razvoj do polnega odziva traja več dni ali tednov. Če sistem deluje normalno, potem bo sprožil odziv samo na človeku tuje antigene. Normalno razlikovanje sistema med lastnimi in tujimi molekulami je ključnega pomena, saj nezmožnost razlikovanja vodi do avtoimunskih bolezni (1,2).

Pridobljeni imunski odziv lahko glede na komponente, ki posredujejo odziv, razdelimo na humoralno in celično posredovano imunost (Slika 1). Pri humoralni imunosti odziv posredujejo protitelesa (imunoglobulini) v krvi, ki jih izloča posebna vrsta limfocitov B (plazmatke), in ki specifičen antigen prepoznajo ter ga odstranijo. Humoralno imunost lahko prenesemo na neimuniziranega posameznika s plazmo ali serumom imuniziranega posameznika. Celično posredovano imunost (celična imunost) pa posredujejo limfociti T in se na neimuniziranega posameznika ne more prenesti s plazmo ali serumom, temveč s celicami (2).



Slika 1: Glavne komponente prirojenega in pridobljenega imunskega sistema (prirejeno po (4))

1.1.3 Topni mediatorji imunskega odziva

V proces imunskega odziva je vpletenih veliko molekul, in sicer protitelesa, citokini in številne druge molekule, ki so normalno prisotne v serumu. Ker pride pri okužbi do hitrega porasta koncentracij teh proteinov, jih imenujemo tudi proteini akutne faze. Med najpomembnejše topne mediatorje uvrščamo sistem komplementa in citokine.

Sistem komplementa predstavlja 30 serumskih proteinov, ki uravnavajo vnetje in odstranjujejo mikrobo. Aktivacija tega sistema je kaskadna reakcija, aktivirajo pa ga lahko tako mikrobi sami kot tudi protitelesa, ki so pritrjena na njihovi površini. Če mikrobi neposredno aktivirajo komplement, gre za alternativno pot aktivacije, ki je prirojena in nespecifična reakcija. V primeru, ko so za aktivacijo komplementa odgovorna protitelesa pritrjena na njihovo površino, pa govorimo o klasični poti aktivacije in je posledica specifičnega (pridobljenega) imunskega odziva. Pri aktivaciji komplementa kot razgradni produkti nastanejo različni peptidi, ki imajo različne funkcije:

- 1) Oponizacija mikroorganizmov za fagocitozo in znotrajcelično uničenje
- 2) Pritegnitev fagocitov na mesto okužbe (kemotaksa)
- 3) Liza določenih bakterij in virusov
- 4) Sproščanje vnetnih mediatorjev iz mastocitov

Citokini pa so velika skupina proteinov in glikoproteinov, ki omogočajo komunikacijo med celicami pri imunskem odzivu. Gre za imunomodulatorje, ki so sposobni avtokrinega, parakrinega in endokrinega signaliziranja.

Interferoni (IFN) so podskupina citokinov, ki omejuje širjenje okužbe z nekaterimi virusi. IFN- α in IFN- β nastajajo v z virusom okuženih celicah, IFN- γ pa izdelujejo aktivirane celice – NK, celice pomagalke (celice T CD4) in celice ubijalke (celice T CD8). IFN, ki sicer ustvarijo stanje odpornosti proti virusom v neokuženih celicah, nastanejo zelo zgodaj po okužbi in so prva obramba pred številnimi virusi.

Interlevkini (IL) so druga podskupina citokinov in imajo številne raznolike funkcije. Večina spodbuja druge celice k delitvi in razmnoževanju. Izdelujejo in izločajo jih limfociti T, makrofagi in nekatere druge tkivne celice, vsak posamezen IL pa vpliva na določeno skupino celic, ki izražajo receptor za ta IL.

Pomembni predstavniki citokinov, ki so posebno učinkoviti pri posredovanju vnetja in citotoksičnih reakcij pa so še dejavnika tumorske nekroze α in β (TNF- α in TNF- β) ter transformirajoči rastni faktor β (TGF- β) (2).

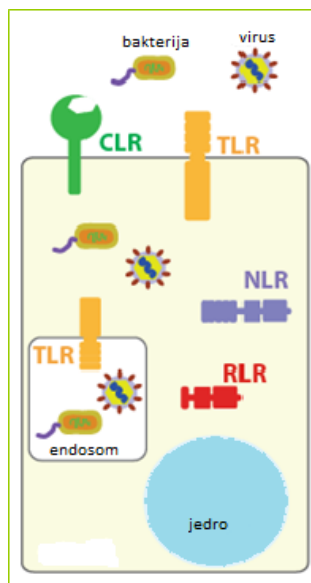
1.2 RECEPTORJI ZA PREPOZNAVAVO VZORCEV

Celice prirojenega imunskega odziva torej prepoznavajo tuje molekule s pomočjo receptorjev za prepoznavo vzorcev (PRR), ki prepoznajo molekulske vzorce značilne za patogene (PAMP). To so npr. bakterijski lipopolisaharidi (endotoksini, značilni za Gram-negativne bakterije), peptidoglikan (značilen za Gram-pozitivne in Gram-negativne bakterije) ali pa variacije nukleinskih kislin, ki niso značilne za ljudi (nemetilirana DNA CpG-oligonukleotidi ali dvovijačna RNA) (5,6). To pa ni edina sposobnost PRR-jev, saj prepoznajo tudi endogene komponente celic, ki nastanejo pri poškodbah celic ali tkiv in lahko delujejo kot signali za nevarnost (angl. danger associated molecular pattern – DAMP). Primeri takšnih signalov so visoke koncentracije zunajcelične ATP, celični efluks kalija, poškodovani mitohondriji, itd.

PRR-je v splošnem lahko delimo na 4 družine:

- 1) Toll-u podobni receptorji (TLR)
- 2) NOD-u podobni receptorji (NLR)
- 3) Receptorji za lektine tipa C (CLR)
- 4) RIG-I-u podobni receptorji (RLR)

Glede na njihovo lokacijo pa jih lahko delimo na PRR-je, ki so vezani na membrano (bodisi zunanjo celično – TLR in CLR ali notranjo endosomsko – TLR) in citoplazemske PRR-je (NLR in RLR) (Slika 2). Signalne poti, ki jih aktivirajo različni PRR-ji, so si na efektorski ravni pogosto precej podobne in ponavadi povzročijo aktivacijo stresnih kinaz, vnetnih kaspaz, genov reguliranih s strani jedrnega faktorja κ B (NF- κ B) in genov, ki jih stimulirajo interferoni. Med signalnimi potmi različnih PRR-jev prihaja do obsežne komunikacije, kar omogoča izvrstno stopnjo odziva na različne nevarnosti telesu gostitelja. Poleg indukcije obrambnih mehanizmov prirojenega imunskega odziva pa aktivacija PRR-jev na oziroma v dendritičnih celicah, ki so glavne antigen predstavljajoče celice, sproži tudi aktivacijo pridobljenega imunskega odziva (6–8).



Slika 2: Lokacije PRR-jev v oziroma izven celice (prirejeno po (7))

1.2.1 Organizacija domen PRR-jev

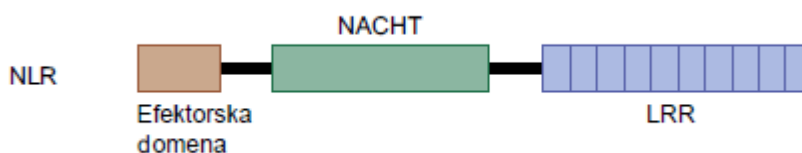
Če na enostaven način razložimo splošno zgradbo PRR-jev, slednja vsebuje domeno za zaznavo primerne aktivacijskega dražljaja ali molekulskega vzorca in efektorsko domeno, s katero uravnava protein-protein interakcije, ki so potrebne za prenos (transdukcijo) signala. Takšno organizacijsko strukturo opazimo predvsem pri družinah TLR in CLR. Ostale družine PRR-jev, zlasti citoplazemski PRR-ji, vsebujejo dodatne domene, ki imajo pogosto pomembne dodatne vloge. Domena za vezavo nukleotidov pri NOD-u podobnih receptorjih (NLR) je na primer ključna pri regulaciji receptorske aktivnosti, prispeva pa tudi k formaciji velikih makromolekulskih signalizacijskih kompleksov.

1.2.2 NOD-u podobni receptorji (NLR)

Družino NLR sestavljajo tridelni proteini, ki vsebujejo N-terminalno efektorsko domeno, centralno NACHT domeno (domena za vezavo nukleotidov) in C-terminalno domeno, bogato z levcinom (LRR) (Slika 3). NACHT je domena, ki ima ATP-azno aktivnost in sodeluje pri samo-oligomerizaciji in s tem pri aktivaciji receptorja, C-terminalna LRR domena je vpletena v zaznavo in vezavo ligandov, medtem ko N-terminalna domena opravlja efektorske funkcije preko interakcij z drugimi proteini in je zato ključna pri transdukciji signala (6,9,10).

Glede na N-terminalno domeno lahko družino NLR-jev razdelimo v 5 poddružin: NLRA (angl. acidic transactivation domain), NLRC (angl. CARD - caspase activation and recruitment domain), NLRP (angl. Pyrin domain), NLRB (angl. BIR – baculoviral inhibitory repeat-like domain) in NLRX (NLR družina, ki nima nobene homologije glede N-terminalne domene s predstavniki ostalih poddružin NLR) (11).

NLR-ji prepoznavajo znotrajcelične PAMP in DAMP. Večina NLR-jev sicer deluje kot PRR, ki prepozna prej omenjene ligande in posledično aktivira vnetne odzive, nekateri NLR-ji pa ne delujejo na ta način, ampak se odzivajo na citokine, kot so npr. interferoni. Aktivirani NLR-ji opravljajo različne funkcije, ki jih na grobo lahko razdelimo v 4 kategorije: formacija inflamatomov, prenos signalov, aktivacija transkripcije in avtofagija. Določeni NLR-ji lahko imajo več funkcij hkrati, prav tako pa lahko imajo nekateri NLR-ji aktivacijsko funkcijo, medtem ko drugi delujejo kot negativni regulatorji (9).

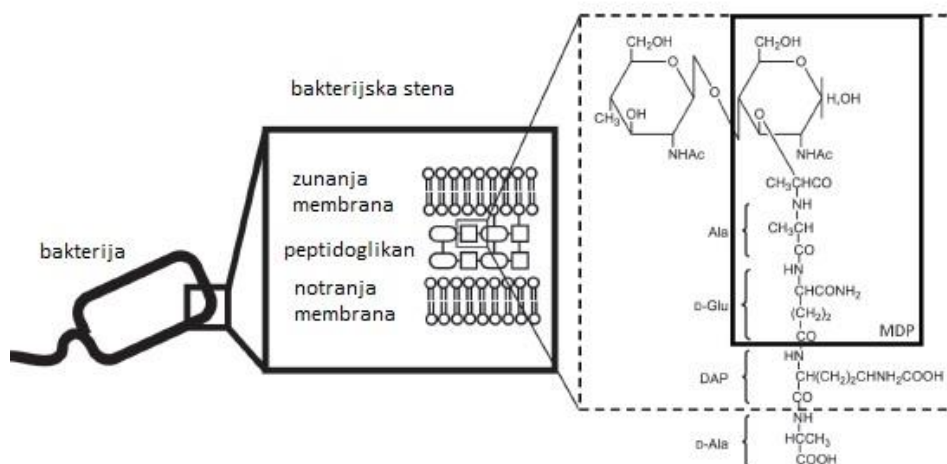


Slika 3: Organizacija domen družine NLR (prirejeno po (6))

1.3 RECEPTORJI NOD

Receptorja NOD1 in NOD2 sta citosolna receptorja in spadata v NLRC podskupino NOD-u podobnih receptorjev. Med seboj se razlikujeta v številu domen CARD, saj NOD1 vsebuje eno, NOD2 pa dve domeni CARD. Medtem ko je receptor NOD1 prisoten v mnogih tipih celic, pa je NOD2 omejen na imunske celice, Paneth-ove celice, keratinocite in epitelijske celice ustne votline, prebavil in pljuč (12). Oba receptorja prepoznavata in vežeta fragmente peptidoglikana (PGN), ki je prisoten v celični steni bakterij. Najmanjši fragment, ki ga NOD1 prepozna in veže je γ -D-glutamil-mezo-diaminopimelinska kislina (iE-DAP), ki ga najdemo v peptidoglikanu Gram-negativnih ter nekaterih Gram-pozitivnih bakterij. Fragment L-Ala- γ -D-Glu-mezo-DAP (TriDAP), ki ima na N-terminalni del iE-DAP vezan še L-Ala, ta odziv še poveča. Najmanjši aktivacijski fragment za NOD2 pa je muramil dipeptid (MDP), ki je značilen za PGN tako Gram-pozitivnih kot tudi Gram-negativnih bakterij. Sestavlja ga N-acetilmuraminska kislina (MurNAc), ki je preko distančnika, in sicer

ene molekule mlečne kisline, povezana z N-terminalnim delom dipeptida L-Ala-D-izoGln (Slika 4) (13). Ko receptorja NOD1 oziroma NOD2 prepoznata ligand, aktivirata signalne poti NF- κ B, z mitogenom aktiviranih protein kinaz (MAPK) in z interferonom reguliranega faktorja (angl. Interferon regulatory factor – IRF), kar sproži vnetni odziv.



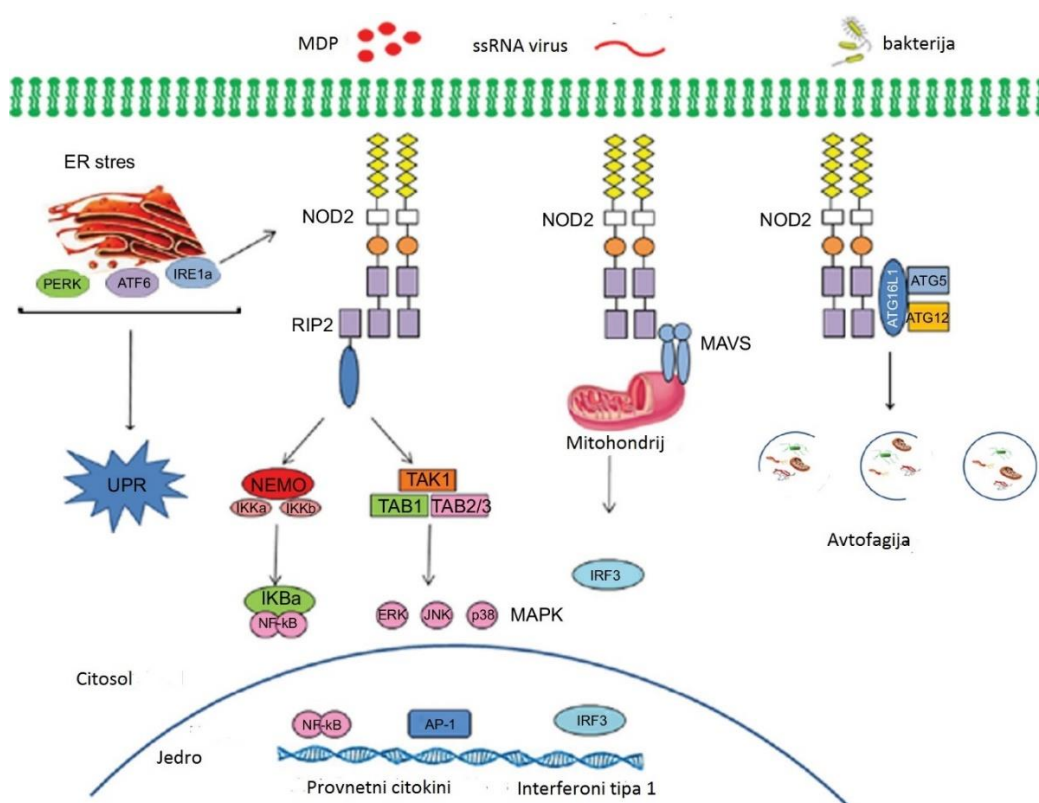
Slika 4: Muramil dipeptid kot komponenta peptidoglikana v bakterijski steni (prirejeno po (14))

1.3.1 Receptor NOD2 – zgradba, funkcije, signalizacijske poti in regulacija

Receptor NOD2 torej sestavljata 2 domeni CARD (N-terminalna domena), centralna domena NACHT in LRR (C-terminalna domena). Navadno se receptor NOD2 nahaja kot monomer, povezan ali nepovezan z ADP, prav tako pa je LRR zvit prek NACHT domene (sterično oviranje), zato je receptor v neaktivni obliki. Ker gre za znotrajcelični receptor, mora ligand za aktivacijo receptorja najprej preiti v citosol. Natančen mehanizem privzema MDP v citosol še ni povsem jasen, kljub temu pa je bilo opisanih nekaj možnih načinov. To so transmembranski vstop prek peptidnega transporterja PepT1 (SLC15A1), klatrska endocitoza in nadaljnji transport iz endosoma v citosol s pomočjo transporterjev SLC15A3 in SLC15A4 ter vstop v obliki bakterijskih zunanje-membranskih veziklov (10,15,16). Ko receptor NOD2 prepozna in veže MDP, pride do izmenjave ADP-ATP, kar povzroči preureditev v odprto konformacijo, ki omogoči dostop do domene NACHT, kar je ključno za naslednji korak aktivacije. Prek te domene namreč pride do samo-oligomerizacije receptorja in nastanka aktivne dimerne oblike – nodosoma (10).

Po trenutnem modelu kanonične signalizacijske poti (Slika 5), naj bi se aktivna oblika nato prek interakcij CARD-CARD povezala s serin-treonin/tirozin proteinsko kinazo 2 (RIPK2 ali RIP2). Ta kompleks nato sproži nadaljnje procese v signalizacijski poti, ki zajemajo predvsem ubikvitinacijo in rekrutiranje ostalih potrebnih komponent. Končni učinek te kaskade je aktivacija NF- κ B in MAPK, kar sproži tvorbo vnetnih citokinov, protibakterijskih peptidov in reaktivnih kisikovih ter dušikovih zvrsti (10,15,17,18). Poleg kanonične poti pa obstaja tudi nekanonična pot signalizacije (Slika 5). Tako npr. tudi enoverižna virusna RNA lahko aktivira receptor NOD2. Ob tem se nodosom translocira do mitohondrijev, kjer se preko domen NACHT in LRR veže na mitohondrijski protivirusni signalni protein (MAVS). To povzroči aktivacijo IRF3 in IRF7 ter posledično nastanek interferonov tipa 1, IFN- α in IFN- β . Prav tako ob okužbah nodosom promovira rekrutiranje z avtofagijo povezanega proteina 16-1 (ATG16L1) na mesto vdora bakterij. Interakcija med njima inducira avtofagijo. NOD2 pa ima vlogo tudi pri obvladovanju stresa endoplazemskega retikuluma (ER), saj bi naj stresni signal prevedel v vnetni odziv preko aktivacije NF- κ B (10,15,17,19).

O kompleksnosti signalizacijskih poti NOD2 priča dejstvo, da na NOD2 direktno deluje ogromno celičnih proteinov, ki njegovo aktivnost regulirajo bodisi preko pozitivne ali negativne povratne zanke. To je seveda potrebno, saj bi prešibka aktivacija privedla do resnih okužb, po drugi strani pa bi premočna aktivacija povzročala hude kronične vnetne in avtoimunske bolezni. Regulatorji na signalizacijsko pot vplivajo na različnih stopnjah, sama regulacija pa je odvisna tudi od tipa celice. V začetnih fazah odziva NOD2 na regulacijo v glavnem vplivajo elementi citoskeleta (npr. vimentin, erbin). Regulatorji lahko vplivajo tudi na domeno NACHT, ki je odgovorna za oligomerizacijo (npr. CARD8, Hsp90). Nadalje regulacija poteka predvsem z vplivom na RIPK2, na katerega se vežejo številne E3 ubikvitin ligaze, ki ga lahko bodisi ubikvitinirajo (npr. E3 ubikvitin ligaza Pellino3) bodisi deubikvitinirajo (npr. E3 ubikvitin ligaza A20). Poleg tega lahko regulatorji vplivajo tudi na rekrutiranje RIPK2 (npr. MEKK4). Odkrili so tudi nove regulatorje, vendar pa natančen mehanizem njihove regulacije še ni poznan (10,15,17).



Slika 5: Signalizacijske poti NOD2 (prirejeno po (17))

1.3.2 Receptor NOD2 – povezava z boleznimi

Receptor NOD2 ima pomembno vlogo v imunskem sistemu. Kodira ga gen *CARD15*, ki se nahaja na kromosomu 16 (20). Polimorfizmi in mutacije na *CARD15* vplivajo na funkcijo NOD2. Glede na aktivacijsko stanje NF-κB lahko te spremembe opredelimo kot "pridobitev funkcije" (angl. "gain-of-function") ali "izguba funkcije" (angl. "loss-of-function"). Ne smemo pa pozabiti, da na spremenjeno aktivnost NOD2 ne vplivajo zgolj napake na samem receptorju, temveč tudi napake na ostalih komponentah signalne poti (10).

Najbolj znana bolezen, povezana z nepravilnim delovanjem NOD2, je Crohnova bolezen, s katero so direktno povezani tri polimorfizmi NOD2. Pri mutacijah R702W (Arg702Trp) in G908R (Gly908Arg) gre za spremembo ene aminokislina znotraj domene LRR, pri L1007fsinsC mutaciji pa pride do spremembe bralnega okvirja, kar vodi v izgubo 33 aminokislina na domeni LRR. Pri vseh naštetih mutacijah gre za "izgubo funkcije" NOD2, posledica pa je zmanjšana odzivnost NOD2 na MDP, ki omogoči invazijo bakterij in nenormalen imunski odziv celic sluznice, kar privede do kroničnega vnetja črevesja (10,17,20). Tri mutacije na domeni NACHT (R334Q, R334W, L469F) in pa bolj redek

polimorfizem NOD2 R314Q povezujejo s sindromom Blau. Za razliko od Crohnove bolezni gre v tem primeru za "pridobitev funkcije", kar pomeni prekomerno aktivacijo signalnih poti NF- κ B in MAPK. Ostale bolezni, ki jih povezujejo z nepravilno aktivacijo NOD2, so: sarkoidoza, revmatoidni artritis, GVH (angl. graft-versus host disorder), atopični dermatitis, z NOD2 povezana kronična bolezen (angl. NOD2-associated inflammatory disease – NAID) in sindrom Yao. Nepravilnosti v delovanju NOD2 pa naj bi sicer povečale tudi tveganje za razvoj več vrst raka (10,17).

1.3.3 Receptor NOD2 – terapevtski potencial antagonistov NOD2

Prekomerna aktivacija signalnih poti NOD2 privede do premočnega vnetnega odziva in posledično do hudih kroničnih vnetnih in avtoimunskih bolezni. Uporaba antagonistov NOD2 bi torej bila smiselna pri zdravljenju bolezni, ki so posledica "pridobitev funkcije" mutacij, oziroma pri stanjih, ko pride do povečane aktivacije signalnih poti NF- κ B in MAPK. Primera takšnih bolezni sta sindrom Blau in sarkoidoza. Trenutno obstoječa terapija poleg tarčnih bioloških zdravil (antagonisti IL-1 in inhibitorji TNF- α) zajema predvsem močne sistemske kortikosteroide, ki pa imajo hude stranske učinke. Uporaba specifičnih antagonistov NOD2, ki bi direktno zavirali aktivacijo NF- κ B in MAPK, bi v tem primeru načeloma lahko zmanjšala stranske učinke (10,21).

Ker bi zaviranje aktivnosti NOD2 v splošnem pomenilo oslabitev imunskega sistema, je potrebno pri načrtovanju antagonistov NOD2 še posebej paziti. Ciljana inhibicija v začetnem delu signalnih poti (vezava liganda, samo-oligomerizacija, vezava ATP) se zato zdi najbolj logična, saj ne bi vplivala na preostale komponente prirojenega imunskega odziva (10).

Novejše študije kažejo tudi na terapevtski potencial antagonistov NOD2 in dvojnih antagonistov NOD1/NOD2 kot adjuvansov pri kemoterapiji (22,23). Ugotovili so, da sočasna terapija z antagonistom NOD2 in dualnimi antagonistom NOD1/NOD2 izboljša učinek kemoterapije s paklitakselom (PTX) na mišjem modelu pljučnega raka (angl. Lewis lung carcinoma – LLC), ki je najbolj primerljiv s pljučnim rakom vrste NSCLS (non-small cell lung cancer) pri ljudeh. Ključno naj bi bilo zaviranje vnetnega odziva na DAMP, ki nastanejo kot posledica kemoterapije. Ti vzorci za nevarnost naj bi predvsem prek aktivacije receptorjev TLR (še posebej aktivacije signalizacijskih poti TLR4 v tumorskih celicah) privedli do napredovanja tumorja v njegovem mikrookolju (angl. tumor microenvironment – TME). Sočasna terapija z antagonistom NOD2 in NOD1/NOD2 naj bi zato z blokado

vnetnega odziva na DAMP ustavila remodeliranje TME in na ta način blokirala nastanek rezistence na kemoterapijo ter metastaziranja rakavih celic.

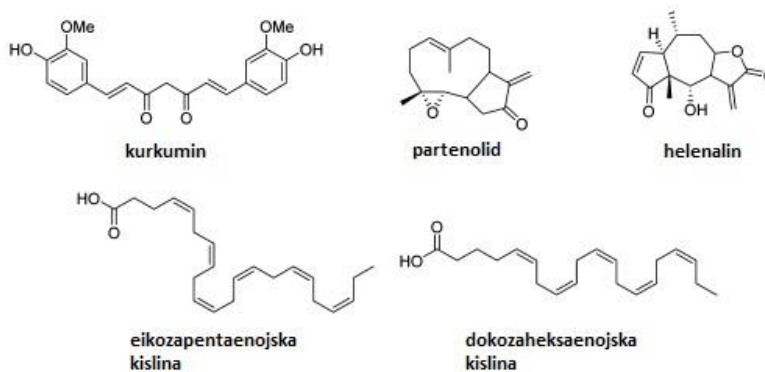
1.3.4 Receptor NOD2 – znani antagonisti

Naravni inhibitorji signalizacije NOD2

Kurkuma (*Curcuma longa*) vsebuje polifenol kurkumin, za katerega je že dolgo znano, da zavira različne signalizacijske poti, kar privede do splošnega zaviranja aktivacije NF- κ B. Ugotovili so, da poleg z MDP inducirane signalizacije NOD2 zavira tudi signalizacijo, povzročeno z endogenim ligandom – lavrinsko kislino (dodekanojsko kislino) in posledično zmanjša aktivacijo NF- κ B ter ekspresijo IL-8, moč učinka pa je bila odvisna od odmerka. Čeprav ni dokončnih dokazov o specifičnem učinku kurkumina na NOD2, se predvideva, da le-ta vpliva na oligomerizacijo. Na podoben način deluje tudi seskviterpenski lakton – partenolid. Signalizacijo NOD2 pa zavira še en predstavnik seskviterpenskih laktonov – helenalin, ki alkilira in na ta način inhibira p63 podenoto NF- κ B. Zgoraj omenjeni naravni inhibitorji signalizacije NOD2 so prikazani na Sliki 6 (10).

Endogeni inhibitorji signalizacije NOD2

Nekatere nasičene maščobne kisline, kot je lavrinska kislina, lahko celo inducirajo signalizacijo NOD2. Nasproten učinek pa izzovejo nekatere nenasičene maščobne kisline, zlasti omega-3 maščobne kisline. Za eikozapentaenojsko kislino (EPK) in dokozaheksaenojsko kislino (DHK), ki sta prikazani na Sliki 6, so namreč ugotovili, da zavirata aktivacijo NF- κ B in ekspresijo IL-8 z zaviranjem samo-oligomerizacije NOD2.

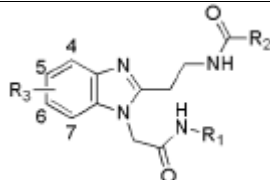
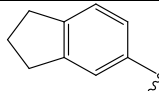
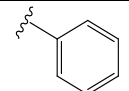
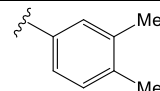
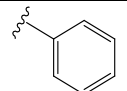
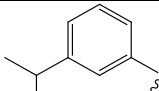
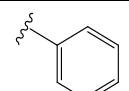
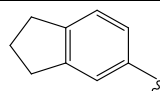
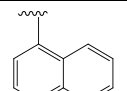
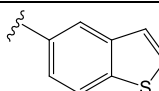
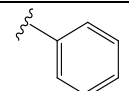
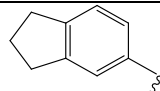
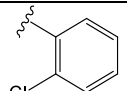
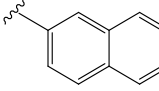
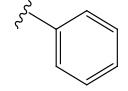
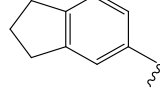
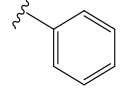


Slika 6: Naravni in endogeni zaviralci signalizacije NOD2 (prirejeno po (10))

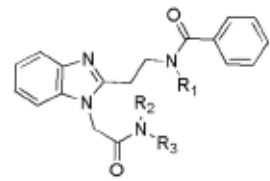
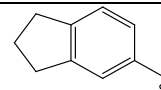
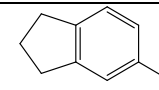
Benzimidazol-diamidi

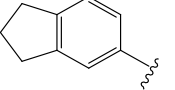
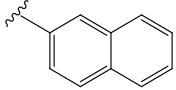
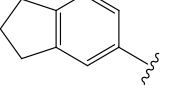
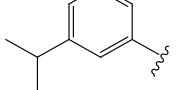
Rickard in sodelavci so z rešanjem visoke zmogljivosti (HTS – high throughput screening) odkrili spojino z benzimidazol-diamidno strukturo, ki so jo poimenovali GSK669 (24). Spojina je selektivno zavirala z MDP inducirano in prek NOD2 spodbujeno izločanje IL-8. Nadalje so ugotavljali zvezo med strukturo in aktivnostjo (angl. structure-activity relationship – SAR) ter optimizirali izhodno spojino. Preglednici I in II prikazujeta nekatere analoge GSK669, na Sliki 7 pa je predstavljena struktura GSK699 in nekateri najobetavnejši analogi.

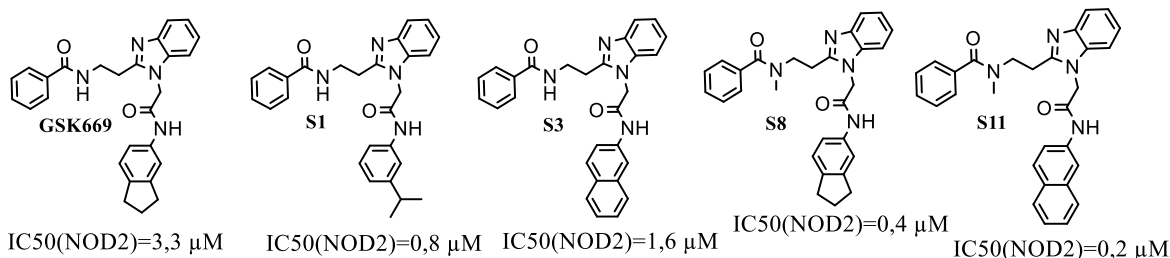
Preglednica I: SAR nekaterih analogov GSK669 (prirejeno po (24))

									
Spojina	R1	R2	R3	NOD2 IC ₅₀ (μM)	Spojina	R1	R2	R3	NOD2 IC ₅₀ (μM)
GSK669			H	3,3	S4			H	2,8
S1			H	0,8	S5			H	3,4
S2			H	1,3	S6			H	3,8
S3			H	1,6	S7			5-Cl	1,3

Preglednica II: SAR nekaterih N-metiliranih analogov GSK669 (prirejeno po (24))

									
Spojina	R1	R2	R3	NOD2 IC ₅₀ (μM)	Spojina	R1	R2	R3	NOD2 IC ₅₀ (μM)
GSK669	H	H		3,2	S10	H	Me		20,0

S8	Me	H		0,4	S11	Me	H		0,2
S9	Me	Me		17,0	S12	Me	H		0,3



Slika 7: GSK669 in nekateri njeni najobetavnejši analogi (prirejeno po (24))

Ugotovili so, da je največ variacij ob ohranjeni bioaktivnosti možnih na R1 (Preglednica I). Zamenjava dihidroindana s 3-izopropilfenilnim, 5-benzotiofenilnim, naftilnim in 3,4-dimetilfenilnim fragmentom (**spojine S1-S4**, Preglednica I) je celo privedla do močnejše inhibicije NOD2. Po drugi strani pa je bil R2 (Preglednica I) manj dovzeten za modifikacije. Možne so bile le *orto*-substitucije na fenilnem obroču, npr. 2-klorofenil (**spojina S6**, Preglednica I) in zamenjava z naftilom (**spojina S5**, Preglednica I). Mogoča je bila tudi uvedba klora na mesto **5** ali **6** (R3, Preglednica I) osnovnega benzimidazolnega skeleta, uvedba na mesto **5** je tudi izboljšala inhibicijo (**spojina S7**, Preglednica I), ostale spremembe na R3 (Preglednica I) pa so vodile v izgubo aktivnosti. Največje izboljšanje aktivnosti so dosegli z metiliranjem R1 (**spojina S8**, Preglednica II), medtem ko sta metiliranje R2 (**spojina S10**, Preglednica II) oziroma dimetiliranje R1 ter R2 (**spojina S9**, Preglednica II) privedla do izgube aktivnosti. Zadnja serija spojin, ki je združevala najbolj obetavne fragmente, ni pokazala bistvenega izboljšanja (npr. **spojina S11**, Preglednica II), za najbolj učinkovito se je sicer izkazala **spojina S11** (Preglednica II, Slika 7) (10,24).

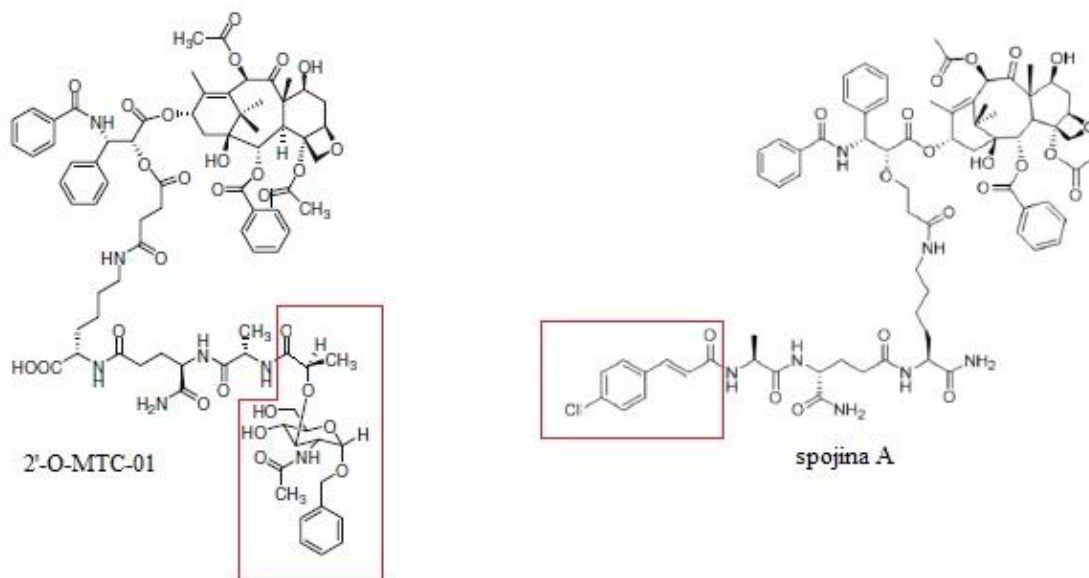
Drugi antagonisti NOD2

V nedavno objavljeni študiji Dong-a in sodelavcev so prvič predstavili konjugat med derivatom MDP in PTX kot funkcionalni antagonist NOD2 (Slika 7) (23). Gre za analog spojine 2'-O-MTC-01, ki je prav tako konjugat derivata MDP in PTX, a ima agonistično delovanje. Del te spojine predstavlja N-acetilmuraminska kislina (MurNAc), ki je tudi sestavni del MDP (Slika 8). Ugotovili so, da zamenjava tega dela spojine z derivatom

Matevž Slivnik:

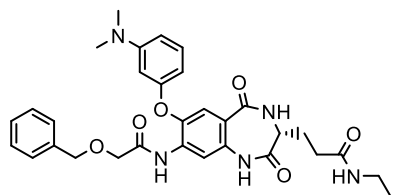
Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorja NOD2 na osnovi N-alkilbenzamidnega osnovnega ogrodja

cimetne kisline spremeni biološko aktivnost spojine, saj pride do spremembe iz agonističnega v antagonistično delovanje. Tako so z optimizacijo spojine MTC-220, ki v svoji strukturi že vsebuje derivat cimetne kisline, dobili **spojino A** in ji dokazali antagonistično delovanje (50% inhibicija pri koncentraciji 10 μM).



Slika 8: 2'-O-MTC-01 z označenim MurNAc delom (agonist NOD2) in spojina A z označenim delom 4-kloro cimetne kisline (antagonist NOD2) (prirejeno po (23,25))

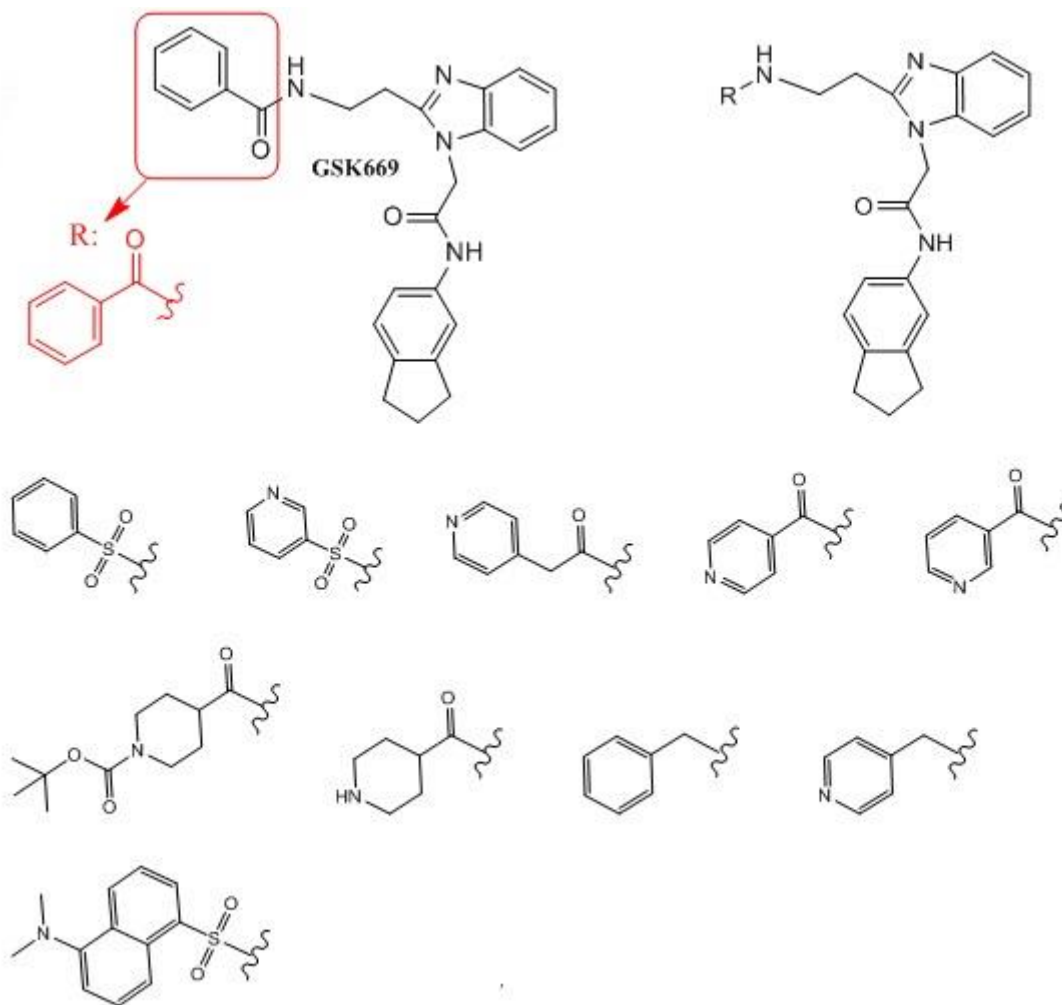
Wang in sodelavci pa so v študiji kot dvojne antagoniste NOD1/NOD2 identificirali tudi derivate 1,4-benzodiazepin-2,5-dionov (22). Po primarnem presejanju so uspešno pripravili in nadalje ovrednotili 93 spojin. Na osnovi SAR-a, citotoksičnosti in moči inhibicije so za najbolj učinkovito spojino izbrali **spojino B** ($\text{IC}_{50}(\text{NOD1}) = 2,36 \mu\text{M}$; $\text{IC}_{50}(\text{NOD2}) = 4,16 \mu\text{M}$), ki je dvojni antagonist NOD1/NOD2 in posledično zavira signalni poti NF- κB in MAPK (Slika 9).



Slika 9: Spojina B, ki deluje kot dvojni antagonist NOD1/NOD2

2 NAMEN DELA

V okviru magistrske naloge bomo raziskali kemijski prostor že znanega antagonistista NOD2 in sintetizirali nove potencialne antagoniste. Naša spojina vodnica bo spojina *N*-(2-(1-(2,3-dihidro-1*H*-inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)metil)benzamid (GSK669), pri novih spojinah pa bomo uvedli različne substituentne na mesto **R** (Slika 10), s katerimi bomo vplivali na vezavo na receptor in/ali fizikalno-kemijske lastnosti.



Slika 10: Spojina vodnica (GSK669) in substituenti, ki jih bomo uvedli na mesto R spojine vodnice

Vse novo sintetizirane antagoniste bomo fizikalno-kemijsko in spektroskopsko ovrednotili. Na koncu bomo dali določiti tudi njihovo antagonistično aktivnost na receptor NOD2, selektivnost glede na receptor NOD1 in citotoksičnost.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Topila in reagenti:

Pri delu v laboratoriju smo uporabljali topila in reagente proizvajalcev Acros Organics, Fluka, Janssen, Sigma-Aldrich in Merck.

Laboratorijska oprema:

- rotavapor BÜCHI® R-114
- magnetno mešalo IKA® RCT basic IKAMAG Magnetic stirrer
- žarilna pištola SKILL 1800 Watt
- tehtnica METTLER TOLEDO® PB403-S/FACT Precision Balance
- sušilnik Instrumentaria sterimatic ST-11
- UV svetilka CAMAG UV-cabinet II valovnih dolžin 254 nm in 366 nm

Programska oprema:

Za poimenovanje in risanje spojin smo uporabljali program ChemDraw Professional 16.0 (Perkin Elmer).

3.2 METODE

3.2.1 Kromatografija

Tenkoplastna kromatografija (TLC):

Za TLC smo uporabljali Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ kromatografske ploščice, ki smo jih razrezali po potrebi. Gre za ploščice, ki imajo na aluminijastem nosilcu nanešen silikagel (debelina nanosa 175-225 µm) z dodanim fluorescenčnim indikatorjem. Pri metodi smo uporabljali različne mobilne faze, za orositveni reagent pa ninhidrin. Spojine smo detektirali pod UV svetlobo valovne dolžine 254 ali 366 nm.

Kolonska kromatografija:

Pri kolonski kromatografiji smo za stacionarno fazo uporabili Kieselgel 60 z velikostjo delcev 0,042-0,063 mm, za mobilno fazo pa smo uporabili različna razmerja zmesi diklorometan/metanol. Velikost kolone smo izbrali glede na količino spojine.

Matevž Slivnik:

Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorja NOD2 na osnovi N-alkilbenzamidnega osnovnega ogrodja

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti:

Za HPLC smo uporabili napravo Agilent Technologies HP 1100 z UV-VIS detektorjem G1365B, kolono Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm delci) ob uporabi predkolone in pri pretoku 1 mL/min. Za mobilno fazo smo uporabili zmes acetonitril/0,1 % vodna raztopina TFA. Tekom analize smo spreminjali gradient: iz 30 % na 80 % acetonitrila (0-30 min) in iz 80 % na 90 % acetonitrila (30-35 min).

3.2.2 Spektroskopija

Jedrska magnetna resonanca:

¹H in ¹³C NMR spektri so bili posneti z Bruker Avance DPX₄₀₀ na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani. Vzorce so bili raztopljeni v CDCl₃ ali DMSO-d₆ in posneti pri 400 MHz (¹H) oziroma 100 MHz (¹³C).

IR spektroskopija:

Za snemanje IR spektrov je bil uporabljen Perkin Elmer 1600 Series FT-IR na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Masna spektroskopija:

Masni spektri so bili posneti s spektrometrom Q-TOF Premier (Micromass, Manchester, Velika Britanija) v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan, Ljubljana. Vrste meritev so bile ESI in HR-MS.

3.2.3 Določanje tališča

Tališča so bila določena z uporabo talilnega mikroskopa z ogrevalno mizico Wagner & Munz Polytherm A in termometrom 52 II Thermometer (Fluka). Tališča niso bila korigirana.

3.2.4 Biološko testiranje

Končnim spojinam so določili antagonistično delovanje na receptor NOD2, selektivnost glede na receptor NOD1 in citotoksičnost. Testiranja so bila izvedena na Katedri za klinično biokemijo, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani.

Matevž Slivnik:

Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorja NOD2 na osnovi N-alkilbenzamidnega osnovnega ogrodja

Citotoksičnost:

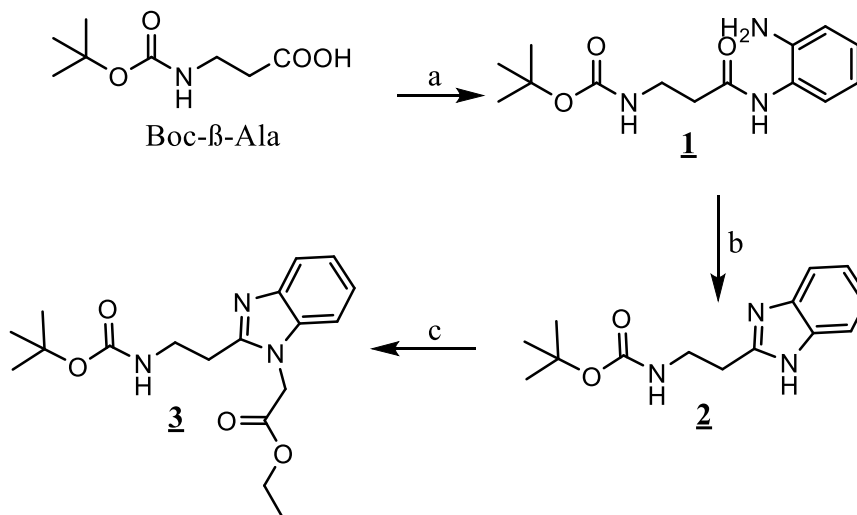
Citotoksičnost so preverili z metodo CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison/WI, USA). Gre za kolometrično metodo pri kateri se za določitev števila aktivnih celic uporablja 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol (MTS). Žive celice so namreč zmožne pretvorbe tetrazola do obarvanega formazana, količina slednjega pa je proporcionalna aktivnosti celic in jo je možno določiti z merjenjem absorbance. HEK-Blue™ NOD1 in NOD2 celice (3×10^5 celic/mL) so tretirali s spojinami pri maksimalni koncentraciji 20 μM in inkubirali 24 ur pri 37 °C. Po prvotni inkubaciji so jim dodali 10 μL reagenta CellTiter 96® AQueous-MTS. Sledila je ponovna inkubacija za 2 uri pri 37 °C. Metabolno aktivnost so določili z merjenjem absorbance pri 490 nm.

Antagonizem in selektivnost:

Za teste antagonizma in selektivnosti so uporabili celični liniji HEK-Blue™ NOD1 in NOD2. Po začetnem rešetanju spojin pri 20 μM so jim določili še vrednosti IC_{50} . Celice HEK-Blue™ NOD1 in NOD2 so pred-tretirali z različnimi koncentracijami končnih spojin. Te koncentracije so bile [μM]: 40, 30, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 za spojine **5**, **9**, **11**, **13**, **16** in **21**. Za spojino **20** so izbrali nižje koncentracije [μM]: 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 zaradi rezultatov citotoksičnosti. Po 30 minutah inkubacije pri 37 °C so celicam dodali selektivne agoniste. Pozitivna kontrola za linijo celic NOD2 je bil agonist NOD2 MDP (2 μM), za NOD1 pa agonist NOD1 iE-DAP (200 nM), negativna kontrola so bile netretirane celice (dodali so le gojitveni medij). Po 24 urah so celicam določili količino "izločene zarodne alkalne fosfataze" (Secreted embryonic alkaline phosphatase – SEAP) z merjenjem absorbance pri 640 nm. To količino so nato primerjali z negativno kontrolo.

4 EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 REAKCIJSKA SHEMA 1

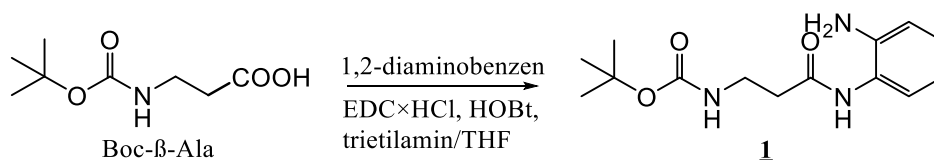


a: 1,2-diaminobenzen, EDC×HCl, HOBt, trietilamin/THF

b: AcOH, 80 °C

c: etil 2-bromoacetat, K₂CO₃, TBAI, acetonitril, 70 °C

4.1.1 Sinteza *tert*-butil (3-((2-aminofenil)amino)-3-oksopropil)karbamata (**1**)



V 250 mL bučko smo zatehtali Boc-β-Ala (3,89 g; 20,6 mmol), EDC×HCl (4,39 g; 22,8 mmol; 1,1 ekv.), HOBt (3,11 g; 22,8 mmol; 1,1 ekv.) in 1,2-diaminobenzen (2,47 g; 22,8 mmol; 1,1 ekv.) ter zmes raztopili v 80 mL THF. Nato smo v reakcijsko zmes počasi dokapavali trietilamin (4,4 mL; 31,8 mmol; 1,5 ekv.) in pustili mešati preko noči na 20 °C. Po končani reakciji smo reakcijski zmesi dodali 20 mL vode in večino topila odpareli pod znižanim tlakom. Preostanku zmesi smo dodali 200 mL diklorometana in spirali z vodo (2×70 mL) ter nasičeno raztopino NaCl (50 mL). Organsko fazo smo posušili z Na₂SO₄, jo prefiltrirali in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Po odparevanju je v bučki ostala spojina **1** (4,74 g; 17,0 mmol).

Matevž Slivnik:

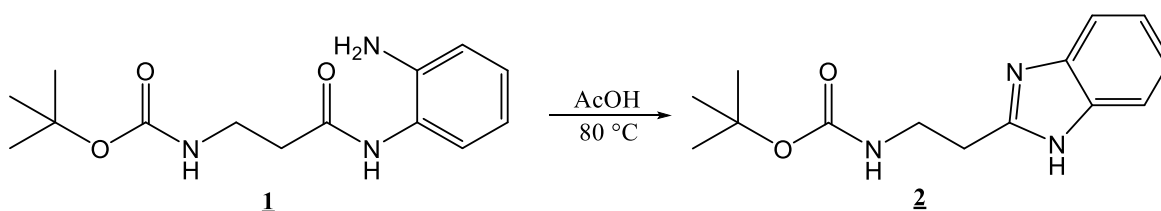
Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorja NOD2 na osnovi N-alkilbenzamidnega osnovnega ogrodja

Produkt	Masa	Množina
Teoretično	5,75 g	20,6 mmol
Praktično	4,74 g	17,0 mmol
Izkoristek: 82,48%		

<i>tert</i> -butil (3-((2-aminofenil)amino)-3-oksopropil)karbammat (1)	$M_r=279,16$
Elementna sestava	$C_{14}H_{21}N_3O_3$
Izgled	oranžno-bel amorfen prah
Rf ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1 + AcOH)	0,43 (ninhidrin)

Referenca za spojino **1**: (24)

4.1.2 Sinteza *tert*-butil (2-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)etil)karbamata (**2**)



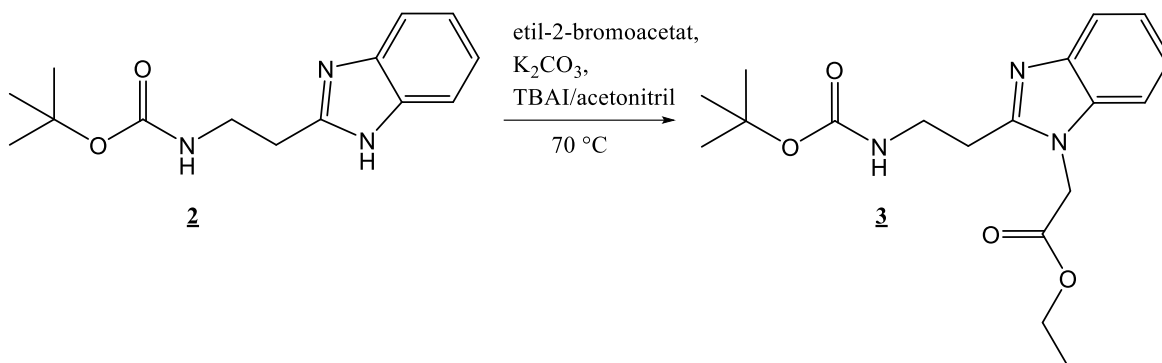
Spojino **1** (4,74 g; 17,0 mmol) smo raztopili v 70 mL AcOH in raztopino segrevali na 80 °C 2 h. Po končani reakciji smo topilo odpareli pod znižanim tlakom. Preostanek smo raztopili v diklorometanu (200 mL) in spirali z nasičeno raztopino $NaHCO_3$ (3×50 mL), vodo (1×50 mL) ter nasičeno raztopino NaCl (1x 50 mL). Nato smo organsko fazo posušili z Na_2SO_4 , jo prefiltrirali in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Po odparevanju je v bučki ostala spojina **2** (3,82 g; 14,6 mmol).

Produkt	Masa	Množina
Teoretično	4,43 g	17,0 mmol
Praktično	3,82 g	14,6 mmol
Izkoristek: 86,18%		

<i>tert</i> -butil (2-(1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-il)etil)karbammat (2)	$M_r=261,33$
Elementna sestava	$C_{14}H_{19}N_3O_2$
Izgled	Rumen prah
Rf ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1 + AcOH)	0,32 (ninhidrin)
1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz)	δ [ppm] = 1.41 (s, 9H, 3× CH_3 -C), 3.22 (t, 2H, J = 6.0 Hz, Ar- CH_2 - CH_2), 3.67 (k, 2H, J = 6.0 Hz CH_2 - CH_2 -NH), 5.32 (s, 1H, CH_2 -NH <i>Boc</i>), 7.24-7.29 (m, 2H, Ar- H), 7.55-7.76 (m, 2H, Ar- H), 8.84 (s, 1H, NH-benzimidazol)

Referenca za spojino **2**: (24)

4.1.3 Sinteza etil 2-(2-(2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)etil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)acetata (**3**)

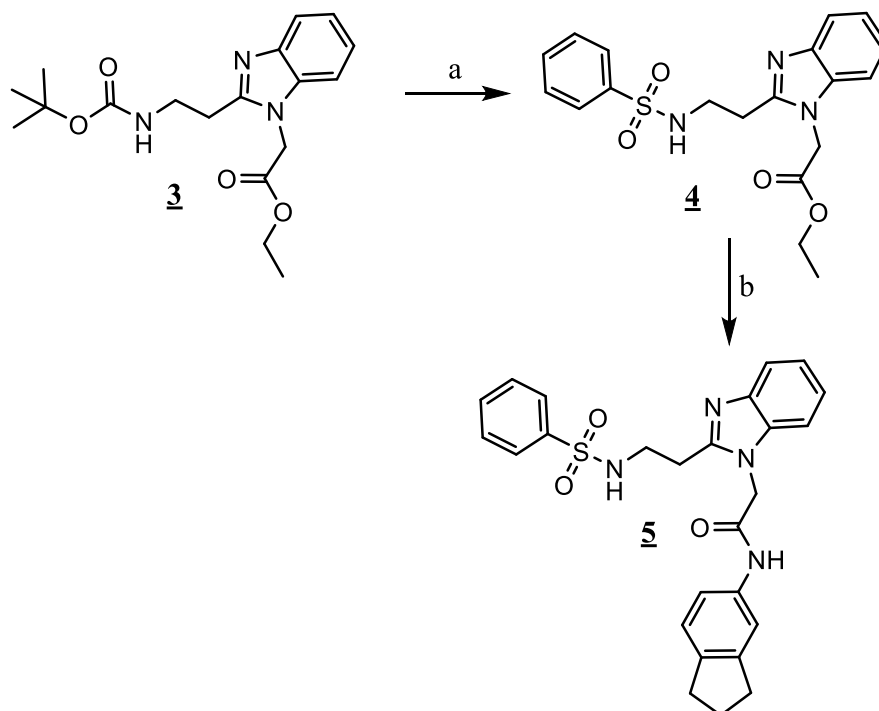


V 250 mL bučko smo natehtali spojino **2** (1,16 g; 4,44 mmol) in K_2CO_3 (0,921 g; 6,67 mmol; 1,5 ekv.) ter ju suspendirali v 55 mL acetonitrila. Suspenzijo smo 15 min mešali pri sobni temperaturi, nato pa dodali etil 2-bromoacetat (0,816 g; 4,88 mmol; 1.1 ekv.) in katalitično količino tetrabutilamonijevega jodida (TBAI). Reakcijsko zmes smo nato segrevali preko noči na 70 °C. Po končani reakciji smo acetonitril odpareli pod znižanim tlakom in preostanku v bučki dodali 150 mL diklorometana. Organsko fazo smo spirali z vodo (2×50 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1×50 mL) ter jo posušili z Na_2SO_4 , nato prefiltrirali in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Po odparevanju je v bučki ostal amorfen produkt rjav-oranžne barve, ki smo ga očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza - CH_2Cl_2 : MeOH = 30 : 1 in CH_2Cl_2 : MeOH = 9 : 1) ter dobili spojino **3** (0,834 g; 2,40 mmol)

Produkt	Masa	Množina
Teoretično	1,54 g	4,44 mmol
Praktično	0,834 g	2,40 mmol
Izkoristek: 54,09%		
Etil 2-(2-(2-((<i>tert</i> -butoksikarbonil)amino)etil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)acetat (3)		$M_r=347,42$
Izgled	rumeno-bel prašek	
R _f (CH_2Cl_2 /MeOH 9:1 + AcOH)	0,68 (ninhidrin)	
¹ H-NMR (CDCl ₃ , 400 MHz)	δ [ppm] = 1.26 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH_2CH_3), 1.42 (s, 9H, $3 \times CH_3-C$), 3.01 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz, Ar- CH_2-CH_2), 3.72 (k, 2H, $J = 6.0$ Hz, CH_2-CH_2-NH), 4.23 (k, 2H, $J = 7.2$ Hz, CH_2-CH_3), 4.83 (s, 1H, $-CH_2-CO$), 5.49 (s, 1H, $CH_2-NHBoc$), 7.21-7.29 (m, 3H $3 \times Ar-H$), 7.72-7.74 (m, 1H, Ar- H)	

Referenca za spojino **3**: (24)

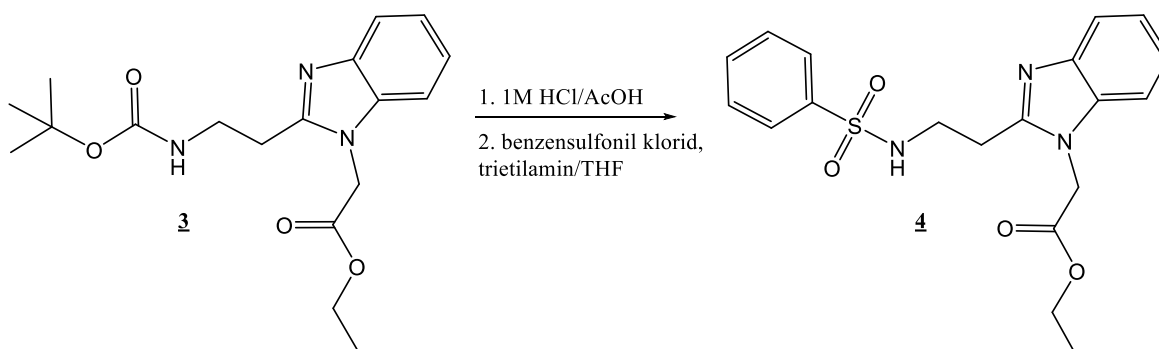
4.2 REAKCIJSKA SHEMA 2



a: 1. 1M HCl/AcOH; 2. benzensulfonil klorid, trietilamin/THF

b: 1. 1M NaOH/THF; 2. 5-aminoindan, EDC×HCl, HOBT, DMAP, trietilamin/THF

4.2.1 Sinteza etil 2-(2-(2-(fenilsulfonamido)etil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetata (4)



V 25 ml bučko smo zatehtali spojino **3** (101 mg; 0,291 mmol), jo raztopili v 4 mL AcOH in raztopino ohladili na 0 °C. Na ledeni kopeli smo dodali 1M HCl/AcOH (1,0 mL; 1,00 mmol; 3,4 ekv.) in mešali pri sobni T 2,5 h. Nato smo pod znižanim tlakom odpareli topilo in preostanek raztopili v 3 mL THF. Raztopini smo na ledeni kopeli po kapljicah dodali trietilamin (123 µL, 0,873 mmol, 3 ekv.) in benzensulfonil klorid (41 µL; 0,320 mmol; 1,1 ekv.) ter reakcijsko zmes preko noči mešali pri sobni T. Po končani reakciji smo THF

Matevž Slivnik:

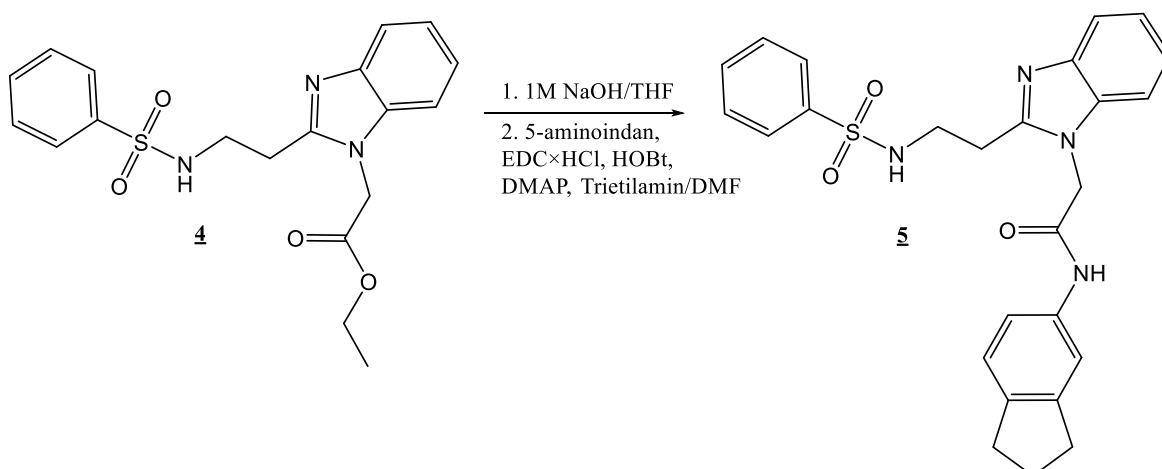
Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorja NOD2 na osnovi N-alkilbenzamidnega osnovnega ogrodja

odpareli pod znižanim tlakom in preostanek raztopili v 20 mL diklorometana. Tega smo nato spirali z vodo (1×10 mL), vodno raztopino HCl s pH=5 (1×10 mL) in nasičeno NaCl (1×10 mL). Organsko fazo smo nato posušili z Na₂SO₄ in topilo odpareli po znižanim tlakom. V bučki je ostala spojina **4** (56,0 mg; 0,145 mmol).

Produkt	Masa	Množina
Teoretično	113 mg	0,291 mmol
Praktično	56,0 mg	0,145 mmol
Izkoristek: 49,67%		

Etil 2-(2-(2-(fenilsulfonamido)etil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)acetat (4)	M _r =387,45
Elementna sestava	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O ₄ S
Izgled	Umazano bel prašek
R _f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH 9:1 + AcOH)	0,7 (ninhidrin)
T _t	190-195 °C
¹ H-NMR (CDCl ₃ , 400 MHz)	δ [ppm] = 1.27 (t, 3H, <i>J</i> = 7.2 Hz, CH ₂ CH ₃), 3.00 (t, 2H, <i>J</i> = 6 Hz, Ar-CH ₂ -CH ₂), 3.55 (k, 2H, <i>J</i> = 6.0 Hz, CH ₂ -CH ₂ -NH), 4.22 (k, 2H, <i>J</i> = 7.2 Hz, CH ₂ -CH ₃), 4.77 (s, 1H, -CH ₂ -CO), 6.32 (t, 1H, <i>J</i> = 6.4 Hz, CH ₂ -NH-SO ₂), 7.21-7.30 (m, 3H, 3×Ar-H), 7.47-7.50 (m, 2H, 2×Ar-H), 7.53-7.57 (m, 1H, Ar-H), 7.66-7.71 (m, 1H, Ar-H), 7.87-7.90 (m, 2H, 2×Ar-H)
MS (ESI)	m/z: 386,1(M-H) ⁻
HRMS za C ₁₉ H ₂₀ N ₃ O ₄ S	izračunano: 386,1175 izmerjeno: 386,1173
IR	ν [cm ⁻¹] = 3053, 2957, 2843, 1730, 1444, 1426, 1332, 1220, 1154, 1093, 1011, 781, 764, 749, 732, 694

4.2.2 Sinteza *N*-(2,3-dihidro-1*H*-inden-5-il)-2-(2-(2-(fenilsulfonamido)etil)-1*H*-benzo [*d*]imidazol-1-il)acetamida (**5**)



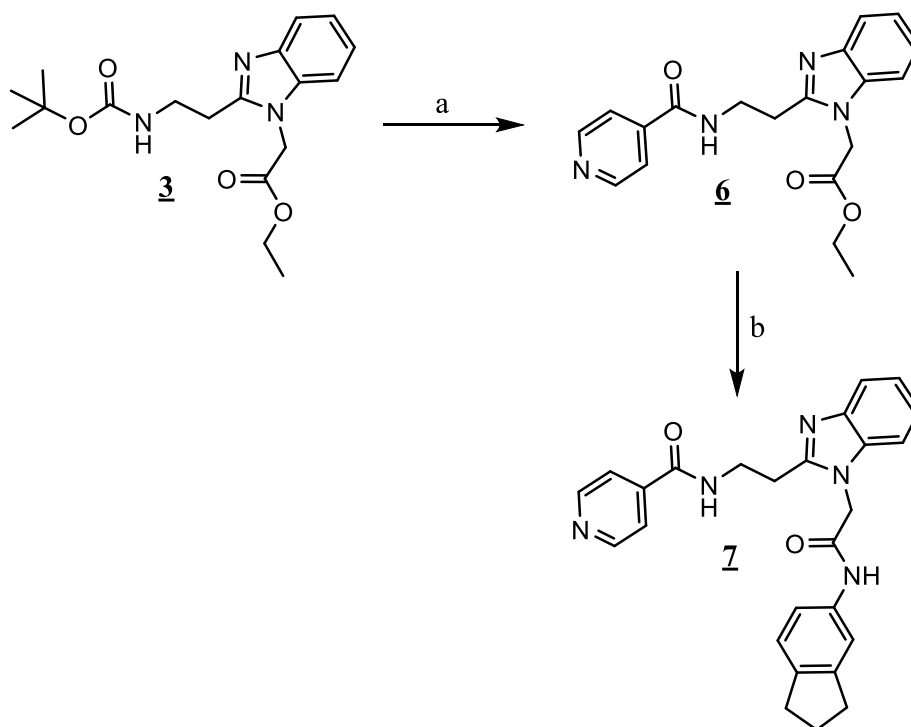
V 25 ml bučko smo zatehtali spojino **4** (46,0 mg; 0,119 mmol), jo raztopili v 2 mL THF in raztopini dodali 1M NaOH (595 μ L; 0,595 mmol; 5 ekv.). Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni T 1,5 h. Po končani reakciji smo zmes z 1M HCl nakisali do pH=5 in topilo odpareli pod znižanim tlakom. S surovim produktom smo takoj nadaljevali naslednjo stopnjo sinteze. Surovo kislino (42,8 mg; 0,119 mmol) smo raztopili v 1 mL DMF in dodali 5-aminoindan (12,6 mg; 0,0910 mmol, 0,76 ekv.), EDC \times HCl (34,3 mg; 0,179 mmol; 1,5 ekv), HOBT (24,8 mg; 0,179 mmol; 1,5 ekv), trietilamin (29,2 μ L; 0,21 mmol; 1,8 ekv.) ter katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo 48 h mešali pri sobni T. Po končani reakciji smo k zmesi dolili 10 mL vode in jo postavili v hladilnik za 30 min. Nastala je oborina, ki smo jo odnučali, sprali z etrom, v sušilniku posušili do suhega in dobili spojino **5** (24,0 mg; 0,0506 mmol).

Produkt	Masa	Množina
Teoretično	43,2 mg	0,0910 mmol
Praktično	24,0 mg	0,0506 mmol
Izkoristek: 55,57%		

<i>N</i> -(2,3-dihidro-1 <i>H</i> -inden-5-il)-2-(2-(2-(fenilsulfonamido)etil)-1 <i>H</i> -benzo [<i>d</i>]imidazol-1-il)acetamid (5)	$M_r=474,58$
Elementna sestava	$C_{26}H_{26}N_4O_3$
Izgled	Rumenkasto-rjav prašek
R _f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH 9:1 + AcOH)	0
T _t	106-111 °C

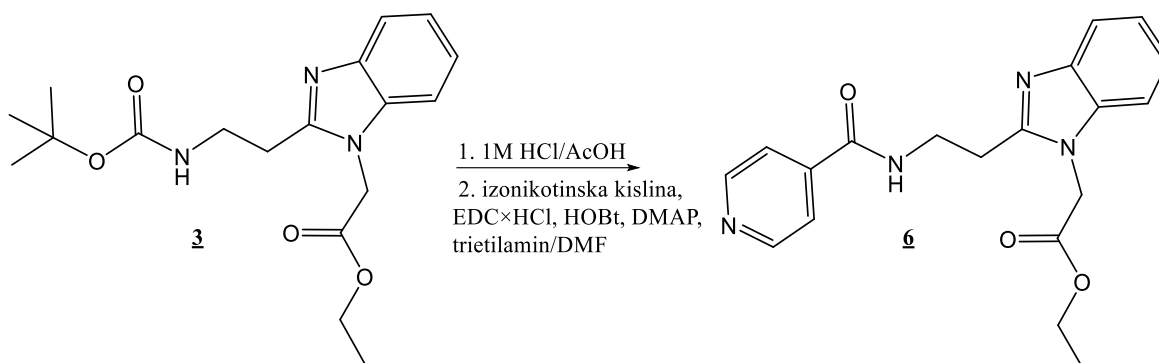
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz)	δ [ppm] = 1.99 (t, 2H, J = 6.8 Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.80-2.82 (m, 4H, $2\times\text{Ph-CH}_2\text{CH}_2$), 2.98-3.01 (m, 2H, $\text{Ar-CH}_2\text{-CH}_2$), 3.25-3.27 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 5.05 (s, 1H, $\text{N-CH}_2\text{-CO}$), 7.17-7.29 (m, 4H, $4\times\text{Ar-H}$), 7.45-7.63 (m, 6H, $5\times\text{Ar-H}$ in $\text{CH}_2\text{-NH-SO}_2$), 7.76-7.92 (m, 3H, $3\times\text{Ar-H}$), 10.39 (s, 1H, CO-NH-Ar)
$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO, 100 MHz)	δ [ppm] = 25.12, 27.27, 31.75, 32.44, 40.52, 45.96, 109.65, 115.48, 117.39, 118.42, 121.43, 121.84, 124.25, 126.47, 129.23, 132.45, 135.48, 136.65, 138.93, 140.10, 141.99, 144.26, 152.98, 165.02
MS (ESI)	m/z : 473,2 (M-H^-)
HRMS za $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$	izračunano: 473,1647 izmerjeno: 473,1656
IR	ν [cm^{-1}] = 2843, 2357, 2168, 2028, 2009, 1673, 1460, 1437, 1407, 1326, 1151, 1096, 1014, 962, 869, 851, 817, 770, 739, 717, 685
HPLC (254 nm)	100% ($t_r=11,604$ min)

4.3 REAKCIJSKA SHEMA 3



a: 1. 1M HCl/AcOH; 2. izonikotinska kislina, EDC \times HCl, HOBt, DMAP, trietilamin/DMF

b: 1. 1M NaOH/THF; 2. 5-aminoindan, EDC \times HCl, HOBt, DMAP, trietilamin/DMF

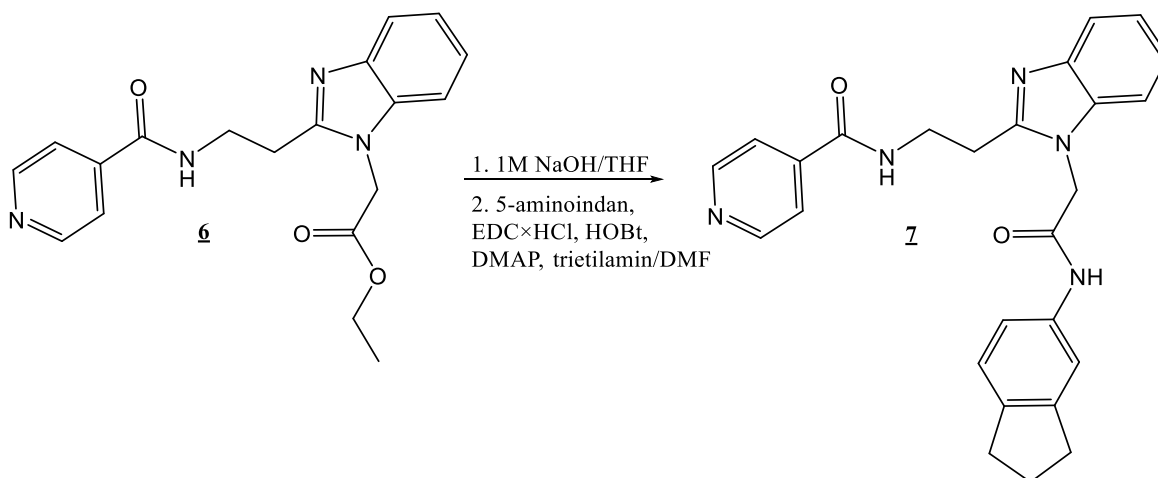
4.3.1 Sinteza etil 2-(2-(2-(izonikotinamido)etil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetata (**6**)

V 25 mL bučki smo v 4 mL AcOH raztopili spojino **3** (104 mg; 0,300 mmol), raztopino ohladili na 0 °C, ji na ledeni kopeli dodali 1M HCl/AcOH (1 mL; 1,00 mmol; 3,3 ekv.) ter mešali 2 h pri sobni T. Nato smo pod znižanim tlakom odpareli topilo in takoj nadaljevali z naslednjo stopnjo sinteze. Surov preostanek smo raztopili v 3 mL DMF in dodali izonikotinsko kislino (48,1 mg; 0,391 mmol; 1,3 ekv.), EDC·HCl (62,9 mg; 0,391 mmol; 1,3 ekv.), HOBt (53,2 mg; 0,391 mmol; 1,3 ekv.), trietilamin (196 µL; 1,40 mmol; 4,6 ekv.) ter katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo nato 48 h mešali pri sobni T. Po končani reakciji smo v bučko dodali 15 mL vode in zmes ekstrahirali z etilacetatom (5×20 mL). Organsko fazo smo spirali z NaHCO₃ (1×20 mL) ter nasičeno raztopino NaCl (1×20 mL). Nato smo jo posušili z Na₂SO₄ in topilo odpareli pod znižanim tlakom ter dobili surovo spojino **6** (45,0 mg; 0,128 mmol). Ker je produkt bil surov in neprečiščen, smo ga brez obširnega spektroskopskega vrednotenja uporabili v naslednji stopnji sinteze.

Produkt	Masa	Množina
Teoretično	106 mg	0,300 mmol
Praktično	45,0 mg	0,128 mmol
Izkoristek: 42,57%		

Etil 2-(2-(2-(izonikotinamido)etil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetata (6)	M _r =352,39
Elementna sestava	C ₂₆ H ₂₆ N ₄ O ₃
Izgled	Oranžno bel prah
R _f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH 9:1 + AcOH)	0,48 (ninhidrin)

4.3.2 Sinteza *N*-(2-(1-(2-((2,3-dihidro-1*H*-inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)etil)izonikotinamida (**7**)



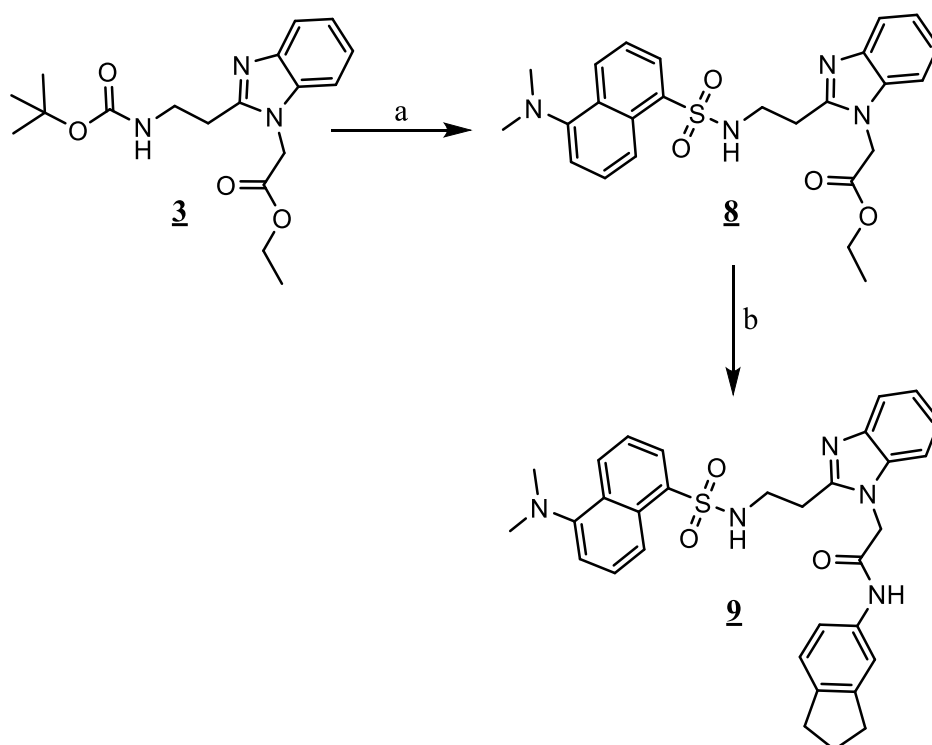
V 25 ml bučko smo zatehtali surov produkt **6** (108 mg; 0,306 mmol), ga raztopili v 2 mL THF in raztopini dodali 1M NaOH (1,53 mL; 1,53 mmol; 5 ekv.). Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni T 1,5 h. Nato smo zmes z 1M HCl nakisali do pH=5 in topilo odpareli pod znižanim tlakom. S surovim produktom smo takoj nadaljevali naslednjo stopnjo sinteze. Surovo kislino (99 mg; 0,306 mmol) smo raztopili v 1 mL DMF in v raztopino dodali 5-aminoindan (32,4 mg; 0,234 mmol; 0,76 ekv.), EDC·HCl (86,4 mg; 0,450 mmol; 1.5 ekv.), HOBt (61,2 mg; 0,450 mmol; 1.5 ekv.), trietilamin (75 μ L; 0,54 mmol; 1.76 ekv.) ter katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo 48 h mešali pri sobni T. Po končani reakcijski zmesi dodali 15 mL vode in ekstrahirali z etilacetatom (5×20 mL) ter nato organsko fazo spirali z NaHCO₃ (1×20 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1×20 mL). Nato smo jo posušili z Na₂SO₄ in topilo odpareli pod znižanim tlakom ter dobili spojino **7** (86 mg, 0,193 mmol)

Produkt	Masa	Množina
Teoretično	104 mg	0,234
Praktično	86,0 mg	0,193
Izkoristek: 82,48%		

<i>N</i> -(2-(1-(2-((2,3-dihidro-1 <i>H</i> -inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-il)etil)izonikotinamid (7)	$M_r=439,51$
Elementna sestava	C ₂₆ H ₂₅ N ₅ O ₂
Izgled	Rjav prah
R _f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH 9:1 + AcOH)	0,48 (ninhidrin)
T _t	150-155 °C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz)	δ [ppm] = 1.90-2.02 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.73-2.77 (m, 4H $2\times\text{Ph-CH}_2\text{CH}_2$), 3.04 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, $\text{Ar-CH}_2\text{-CH}_2$), 3.58 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 5.03 (s, 1H, $\text{N-CH}_2\text{-CO}$), 7.03-7.05 (m, 2H, Ar-H), 7.14-7.19 (m, 4H, $4\times\text{Ar-H}$), 7.32-7.36 (m, 3H, $2\times\text{Ar-H}$ in $\text{CH}_2\text{-NH-CO}$), 7.53-7.55 (m, 1H, NH), 7.61-7.63 (m, 1H, Ar-H), 8.50-8.51 (m, 1H, Ar-H)
$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO, 100 MHz)	δ [ppm] = 22.60, 26.68, 28.09, 33.26, 33.90, 38.82, 47.38, 110.80, 117.61, 119.31, 119.56, 123.65, 124.03, 125.41, 136.69, 137.33, 141.73, 142.96, 146.10, 155.07, 167.08, 173.63
MS (ESI)	m/z: 440,2 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ ($\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_2$)
IR	ν [cm^{-1}] = 3294, 2943, 2842, 1611, 1491, 1437, 1278, 811, 742
HPLC (254 nm)	94,41% ($t_r=6,526$ min)

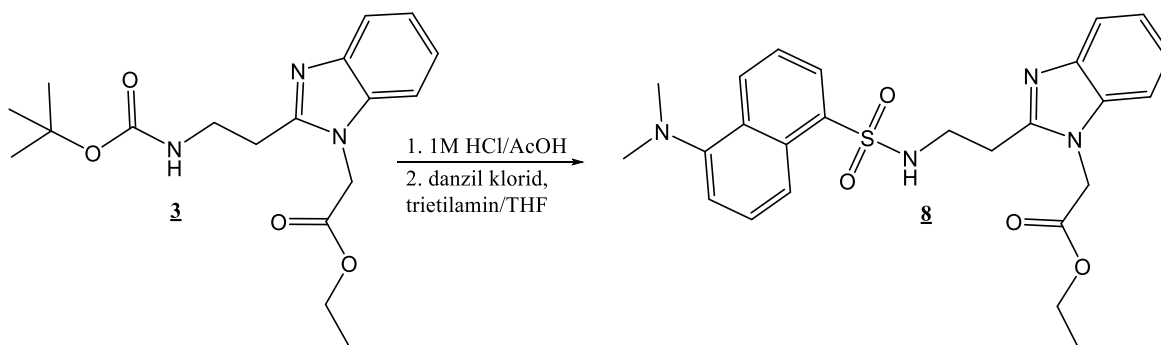
4.4 REAKCIJSKA SHEMA 4



a: 1. 1M HCl/AcOH; 2. danzil klorid, trietilamin/THF

b: 1. 1M NaOH/THF; 2. 5-aminoindan, EDC \times HCl, HOBT, DMAP, trietilamin/DMF

4.4.1 Sinteza etil 2-(2-(2-((5-(dimetilamino)naftalen)-1-sulfonamido)etil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)acetata (**8**)

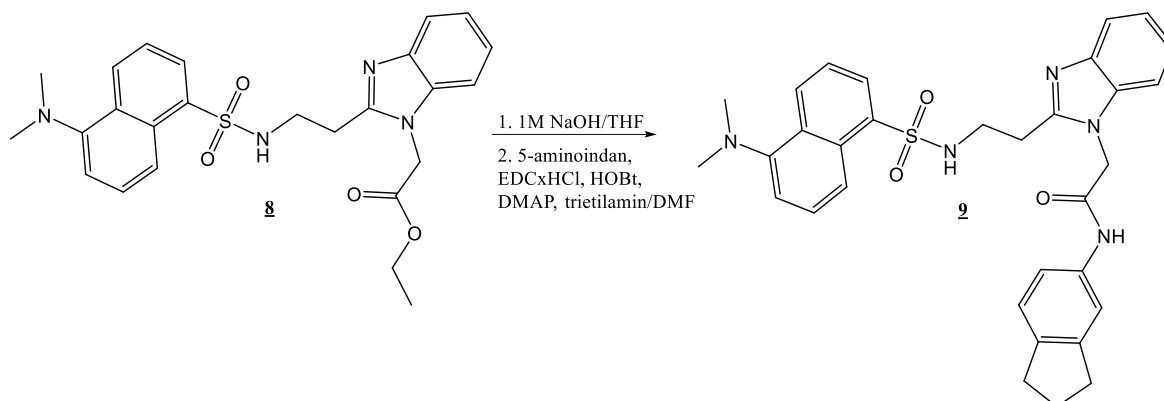


V 25 ml bučko smo zatehtali spojino **3** (102 mg; 0,212 mmol), jo raztopili v 4 mL AcOH in raztopino ohladili na 0 °C. Na ledeni kopeli smo dodali 1M HCl/AcOH (1 mL; 1,00 mmol; 4,7 ekv.) in mešali pri sobni T 2 h. Nato smo pod znižanim tlakom odpareli topilo in preostanek raztopili v 3 mL THF in kapljici DMF. Raztopini smo na ledeni kopeli po kapljicah dodali trietilamin (82 µL; 0,590 mmol; 2,8 ekv.) in danzil klorid (88,0 mg; 0,325 mmol; 1,5 ekv.) ter reakcijsko zmes preko noči mešali pri sobni T. Po končani reakciji smo THF odpareli pod znižanim tlakom in preostanku v bučki dodali 20 mL diklorometana. Tega smo nato spirali z vodno raztopino NaOH s pH=9 (1×10 mL) in nasičeno NaCl (1×10 mL). Organsko fazo smo nato posušili z Na₂SO₄ in topilo odpareli pod znižanim tlakom ter dobili surovo spojino **8** (75 mg; 0,156 mmol). Ker je produkt bil surov in neprečiščen, smo ga brez obširnega spektroskopskega vrednotenja uporabili v naslednji stopnji sinteze.

Produkt	Masa	Množina
Teoretično	102 mg	0,212 mmol
Praktično	75,0 mg	0,156 mmol
Izkoristek: 73,62%		

Etil 2-(2-(2-((5-(dimetilamino)naftalen)-1-sulfonamido)etil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)acetat (8)	M _r =480,58
Elementna sestava	C ₂₅ H ₂₈ N ₄ O ₄ S
Izgled	Oranžen prah
Rf (CH ₂ Cl ₂ /MeOH 9:1 + AcOH)	0,67 (ninhidrin)
MS (ESI)	m/z: 479,2 (M-H) ⁻
HRMS za C ₂₅ H ₂₇ N ₄ O ₄ S	izračunano: 479,1753 izmerjeno: 479,1743

4.4.2 Sinteza *N*-(2,3-dihidro-1*H*-inden-5-il)-2-(2-(2-((5-(dimetilamino)naftalen)-1-sulfonamido)etil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)acetamida (**9**)



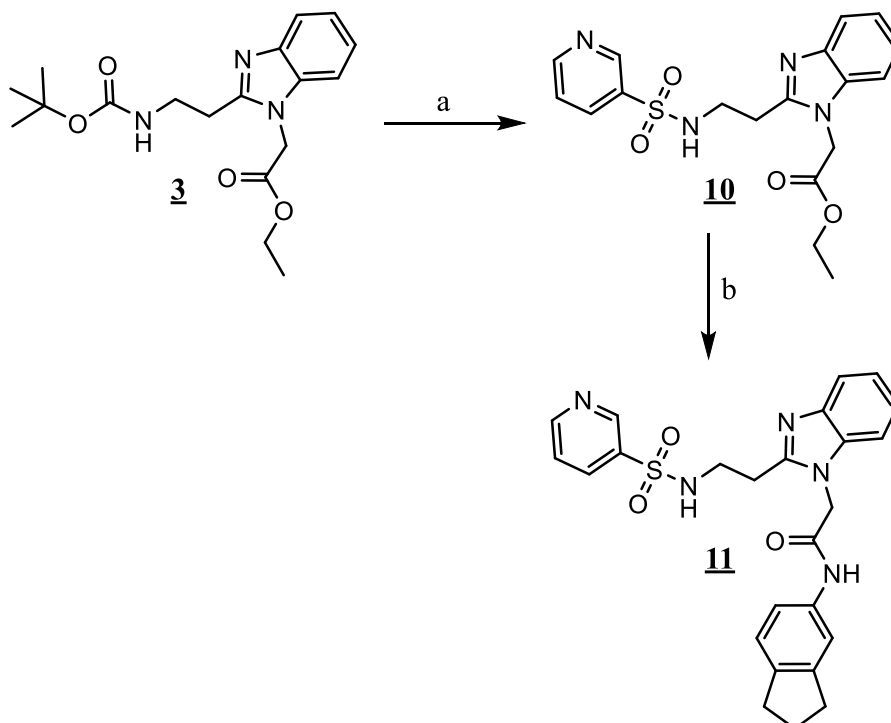
V 25 ml bučko smo zatehtali surovo spojino **8** (75 mg; 0,156 mmol), jo raztopili v 2 mL THF in raztopini dodali 1M NaOH (780 μ L; 0,780 mmol; 5 ekv.). Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni T 1,5 h. Po končani reakciji smo zmes z 1M HCl nakisali do pH=5 in topilo odpareli pod znižanim tlakom. S surovim produktom smo takoj nadaljevali naslednjo stopnjo sinteze. Surovo kislino (70,6 mg; 0,156 mmol) smo raztopili v 1 mL DMF in dodali 5-aminoindan (16,5 mg; 0,119 mmol; 0,76 ekv.), EDC \times HCl (44,0 mg; 0,229 mmol; 1,5 ekv.), HOBt (31,1 mg; 0,229 mmol; 1,5 ekv.), trietilamin (38,3 μ L; 0,275 mmol; 1,76 ekv.) ter katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo 24 h mešali pri sobni T. Po končani reakciji smo k reakcijski zmesi dolili 10 mL vode in jo postavili v hladilnik za 30 min. Nastalo oborino smo odnučali in posušili v sušilniku pri 60 $^{\circ}$ C ter dobili spojino **9** (55 mg; 0,0506 mmol).

Produkt	Masa	Množina
Teoretično	67,6 mg	0,119 mmol
Praktično	55,0 mg	0,0970 mmol
Izkoristek: 81,41%		

<i>N</i> -(2,3-dihidro-1 <i>H</i> -inden-5-il)-2-(2-(2-((5-(dimetilamino)naftalen)-1-sulfonamido)etil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)acetamid (9)	$M_r=567,71$
Elementna sestava	C ₃₂ H ₃₃ N ₅ O ₃ S
Izgled	Rjavo-oranžen prah
R _f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH 9:1 + AcOH)	0,5 (ninhidrin)
T _t	105-110 $^{\circ}$ C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz)	δ [ppm] = 1.97-2.03 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.73-2.88 (m, 10H, $2\times\text{Ph-CH}_2\text{CH}_2$ in $2\times\text{CH}_3\text{-N}$), 2.99-3.01 (m, 2H, $J = 6.0$ Hz, $\text{Ar-CH}_2\text{-CH}_2$), 3.27-3.32 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 5.02 (s, 1H, $\text{N-CH}_2\text{-CO}$), 7.15-7.29 (m, 5H, $4\times\text{Ar-H}$ in $\text{CH}_2\text{-NH-SO}_2$), 7.43-7.60 (m, 5H, $5\times\text{Ar-H}$), 8.13-8.15 (m, 2H, $2\times\text{Ar-H}$), 8.27 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, $1\times\text{Ar-H}$), 8.44 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, $1\times\text{Ar-H}$), 10.38 (s, 1H, CO-NH-Ar)
$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO, 100 MHz)	δ [ppm] = 25.12, 27.37, 31.75, 32.44, 40.50, 45.02, 45.94, 109.60, 115.11, 115.50, 117.41, 118.38, 118.89, 121.45, 121.85, 123.53, 124.25, 127.88, 128.39, 128.94, 129.02, 129.50, 135.37, 135.46, 136.60, 138.96, 141.89, 144.26, 151.33, 152.99, 164.99
MS (ESI)	m/z: 566,2 (M-H^-)
HRMS za $\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$	izračunano: 566,2226 izmerjeno: 566,2229
IR	ν [cm^{-1}] = 3052, 2953, 2850, 1730, 1465, 1444, 1331, 1220, 1154, 1092, 1011, 784, 764, 749, 693
HPLC (254 nm)	95,43% ($t_r=11,546$ min)

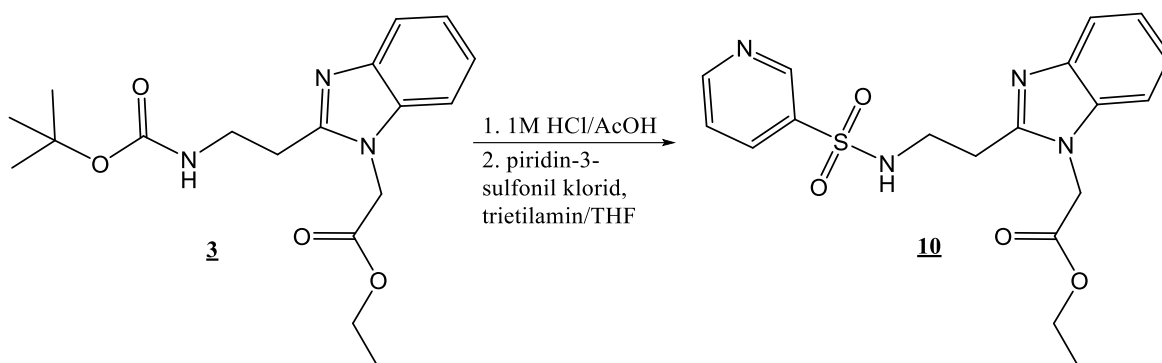
4.5 REAKCIJSKA SHEMA 5



a: 1. 1M HCl/AcOH; 2. piridin-3-sulfonil klorid, trietilamin/THF

b: 1. 1M NaOH/THF; 2. 5-aminoindan, EDC \times HCl, HOBT, DMAP, trietilamin/DMF

4.5.1 Sinteza etil 2-(2-(2-(piridin-3-sulfonamido)etil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il) acetata (10)

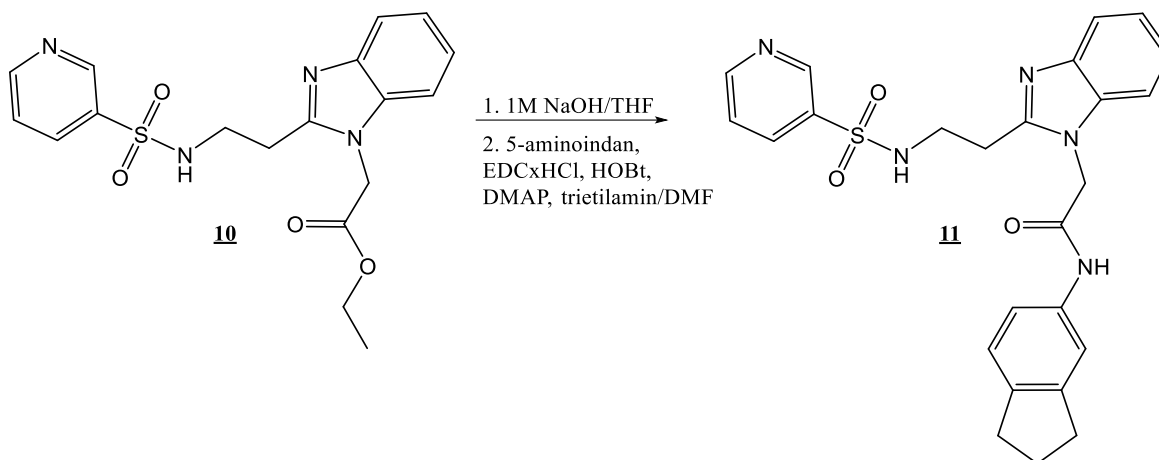


V 25 ml bučko smo zatehtali spojino **3** (97,0 mg; 0,279 mmol), jo raztopili v 4 mL AcOH in raztopino ohladili na 0 °C. Na ledeni kopeli smo dodali 1M HCl/AcOH (1,5 mL; 1,50 mmol; 6,8 ekv.) in mešali pri sobni T 2,5 h. Nato smo pod znižanim tlakom odpareli topilo in preostanek raztopili v 3 mL THF. Raztopini smo na ledeni kopeli po kapljicah dodali trietilamin (177 μ L; 0,837 mmol; 3 ekv.) in piridin-3-sulfonil klorid (45 μ L; 0,308 mmol; 1,1 ekv.) ter reakcijsko zmes preko noči mešali pri sobni T. Po končani reakciji smo THF odpareli pod znižanim tlakom in preostanku dodali 20 mL diklorometana. Tega smo nato spirali z vodno raztopino NaOH s pH=9 (1 \times 10 mL) in nasičeno NaCl (1 \times 10 mL). Organsko fazo smo posušili z Na₂SO₄ in topilo odpareli pod znižanim tlakom ter dobili surovo spojino **10** (96,0 mg; 0,247 mmol). Ker je produkt bil surov in neprečiščen, smo ga brez obširnega spektroskopskega vrednotenja uporabili v naslednji stopnji sinteze.

Produkt	Masa	Množina
Teoretično	108 mg	0,279 mmol
Praktično	96 mg	0,247 mmol
Izkoristek: 88,59%		

Etil 2-(2-(2-(piridin-3-sulfonamido)etil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il) acetat (10)	$M_r=388,44$
Elementna sestava	C ₁₈ H ₂₀ N ₄ O ₄ S
Izgled	Rjavo-rumen prah
Rf (CH ₂ Cl ₂ /MeOH 9:1 + AcOH)	0,51 (ninhidrin)

4.5.2 Sinteza *N*-(2,3-dihidro-1*H*-inden-5-il)-2-(2-(2-(piridin-3-sulfonamido)etil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)acetamida (**11**)



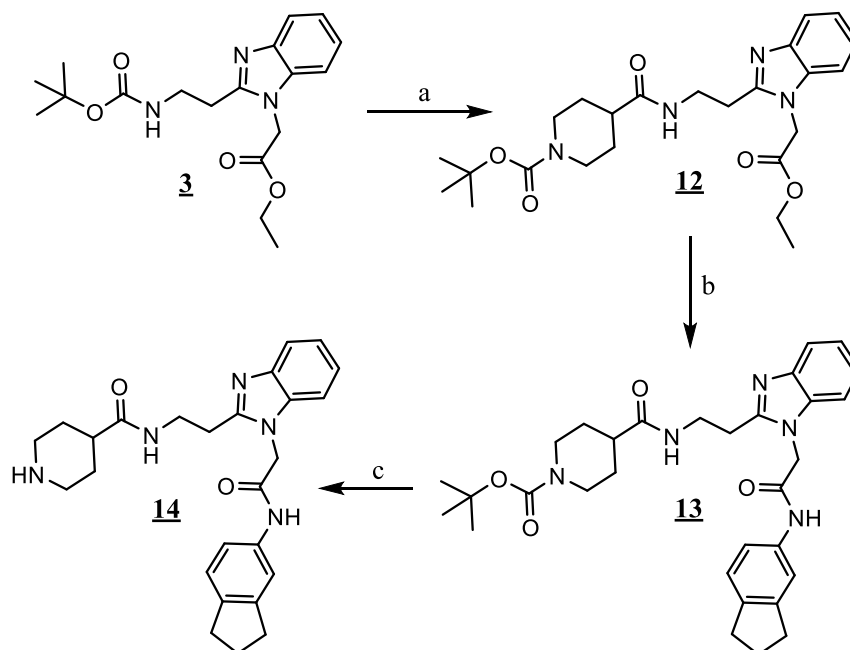
V 25 ml bučko smo zatehtali spojino **10** (96,0 mg; 0,247 mmol), jo raztopili v 2 mL THF in raztopini dodali 1M NaOH (1,24 mL; 1,24 mmol; 5 ekv.). Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni T 1,5 h. Nato smo zmes z 1M HCl nakisali do pH=5 in topilo odpareli pod znižanim tlakom. S surovim produktom smo takoj nadaljevali naslednjo stopnjo sinteze. Surovo kislino (89,0 mg; 0,247 mmol) smo raztopili v 1 mL DMF in raztopini dodali 5-aminoindan (26,2 mg; 0,189 mmol; 0,77 ekv.), EDC×HCl (69,7 mg; 0,363 mmol; 1,5 ekv.), HOBt (49,3 mg; 0,363 mmol; 1,5 ekv.), trietilamin (61 μL; 0,435 mmol; 1,8 ekv.) ter katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo 24 h mešali pri sobni T. Po končani reakciji smo k zmesi dolili 10 mL vode in jo postavili v hladilnik za 30 min. Nastalo oborino smo odnučali in v sušilniku posušili pri 60 °C ter dobili spojino **11** (41,0 mg; 0,086 mmol).

Produkt	Masa	Množina
Teoretično	89,9 mg	0,189 mmol
Praktično	41,0 mg	0,0860 mmol
Izkoristek: 45,61%		

<i>N</i> -(2,3-dihidro-1 <i>H</i> -inden-5-il)-2-(2-(2-(piridin-3-sulfonamido)etil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)acetamid (11)	$M_r=475,57$
Elementna sestava	$C_{25}H_{25}N_5O_3S$
Izgled	Rjav prah
R _f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH 9:1 + AcOH)	0,7 (ninhidrin)
T _t	141-146 °C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz)	δ [ppm] = 1.99 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.78-2.82 (m, 4H, $2 \times \text{Ph-CH}_2\text{CH}_2$), 3.00-3.04 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, $\text{Ar-CH}_2\text{-CH}_2$), 3.35 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 5.06 (s, 1H, $\text{N-CH}_2\text{-CO}$), 7.15-7.19 (m, 3H, $2 \times \text{Ar-H}$ in $\text{CH}_2\text{-NH-SO}_2$), 7.27-7.29 (m, 1H, $1 \times \text{Ar-H}$), 7.45-7.49 (m, 2H, $2 \times \text{Ar-H}$), 7.54-7.60 (m, 2H, $2 \times \text{Ar-H}$), 8.13-8.19 (m, 2H, $2 \times \text{Ar-H}$), 8.79 (d, 1H, $J = 4.0$ Hz, $1 \times \text{Ar-H}$), 8.97 (d, 1H, $J = 0.8$ Hz, $1 \times \text{Ar-H}$), 10.40 (s, 1H, CO-NH-Ar)
$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO, 100 MHz)	δ [ppm] = 22.58, 25.12, 27.28, 31.75, 32.43, 40.43, 45.98, 109.65, 115.49, 117.40, 118.44, 121.44, 121.86, 124.25, 134.51, 135.49, 136.55, 136.62, 138.95, 141.98, 144.27, 147.03, 153.03, 165.04, 169.36
MS (ESI)	474,2 (M-H) $^-$
HRMS za $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$	izračunano: 474,1600 izmerjeno: 474,1605
IR	ν [cm^{-1}] = 2360, 1667, 1559, 1437, 1335, 1156, 1096, 819, 743, 698
HPLC (254 nm)	93,00% ($t_r=8,380$ min)

4.6 REAKCIJSKA SHEMA 6

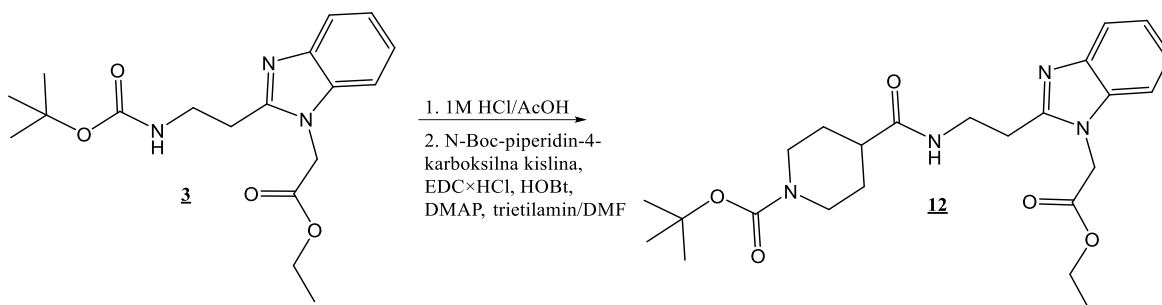


a: 1. 1M HCl/AcOH; 2. N-Boc-piperidin-4-karboksilna kislina, EDC \times HCl, HOBt, DMAP, trietilamin/DMF

b: 1. 1M NaOH/THF; 2. 5-aminoindan, EDC \times HCl, HOBt, DMAP, trietilamin/DMF

c: 1M HCl/AcOH

4.6.1 Sinteza *tert*-butil 4-((2-(1-(2-etoksi-2-oksoetil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)etil)karbamoi)piperidin-1-karboksilata (**12**)

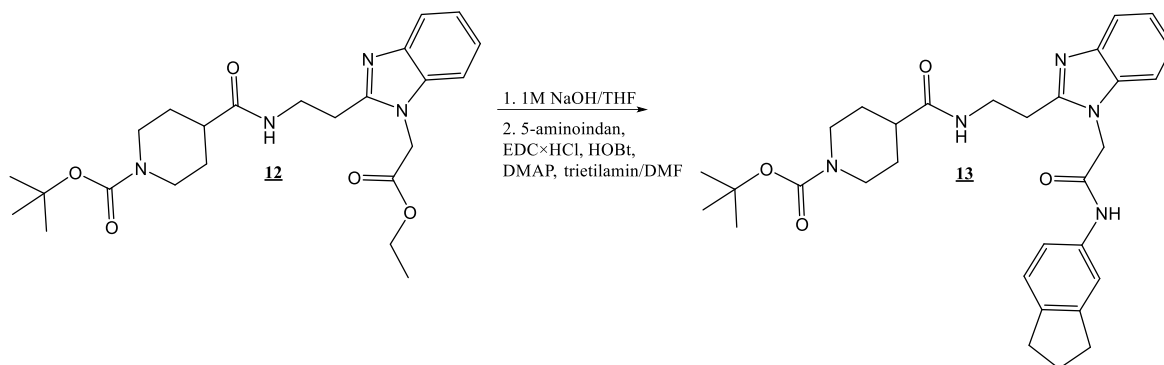


V 25 mL bučki smo v 4 mL AcOH raztopili spojino **3** (196 mg; 0,564 mmol), raztopino ohladili na 0 °C in ji na ledeni kopeli dodali 1M HCl/AcOH (2 mL; 2,00 mmol; 3,5 ekv.). Reakcijsko zmes smo 2 h mešali pri sobni T, nato smo pod znižanim tlakom odpareli topilo in takoj nadaljevali z naslednjo stopnjo sinteze. Surov preostanek smo raztopili v 3 mL DMF in dodali N-Boc-piperidin-4-karboksilno kislino (168 mg; 0,733 mmol; 1,3 ekv.), EDC·HCl (140 mg; 0,733 mmol; 1,3 ekv.), HOBt (100 mg; 0,733 mmol; 1,3 ekv.), trietilamin (367 µL; 2,64 mmol; 4,7 ekv.) ter katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo 48 h mešali pri sobni T. Po končani reakciji smo k reakcijski zmesi dodali 15 mL vode in jo ekstrahirali z etilacetatom (5×20 mL). Organsko fazo smo spirali z NaHCO₃ (1×20 mL) ter nasičeno raztopino NaCl (1×20 mL). Nato smo jo posušili z Na₂SO₄ in topilo odpareli pod znižanim tlakom ter dobili surovo spojino **12** (238 mg; 0,490 mmol). Ker je produkt bil surov in neprečiščen, smo ga brez obširnega spektroskopskega vrednotenja uporabili v naslednji stopnji sinteze.

Produkt	Masa	Množina
Teoretično	267 mg	0,564 mmol
Praktično	238 mg	0,490 mmol
Izkoristek: 89,14%		

<i>Terc</i> -butil 4-((2-(1-(2-etoksi-2-oksoetil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-il)etil)karbamoi)piperidin-1-karboksilat (12)	$M_r=458,56$
Elementna sestava	C ₂₄ H ₃₄ N ₄ O ₅
Izgled	Oranžen prah
Rf (CH ₂ Cl ₂ /MeOH 9:1 + AcOH)	0,6 (ninhidrin)
MS (ESI)	457,2 (M-H) ⁻
HRMS za C ₂₄ H ₃₃ N ₄ O ₅	izračunano: 457,2451 izmerjeno: 457,2455

4.6.2 Sinteza *tert*-butil 4-((2-(1-(2-((2,3-dihidro-1*H*-inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)etil)karbamoil)piperidin-1-karboksilata (**13**)



V 25 ml bučko smo zatehtali surovo spojino **12** (238 mg; 0,490 mmol), jo raztopili v 2 mL THF in raztopini dodali 1M NaOH (2,5 mL; 2,50 mmol; 5,1 ekv.). Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni T 1,5 h. Po končani reakciji smo zmes z 1M HCl nakisali do pH=5 in topilo odpareli pod znižanim tlakom. S surovim produktom smo takoj nadaljevali naslednjo stopnjo sinteze. Surovo kislino (211 mg; 0,490 mmol) smo raztopili v 1 mL DMF in raztopini dodali 5-aminoindan (52,6 mg; 0,380 mmol; 0,78 ekv.), EDC·HCl (141 mg; 0,735 mmol; 1,5 ekv.), HOBt (100 mg; 0,735 mmol; 1,5 ekv.), trietilamin (123 μ L; 0,880 mmol; 1,8 ekv.) ter katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo 24 h mešali pri sobni T. Po končani reakciji smo zmesi dolili 10 mL vode in jo postavili v hladilnik za 30 min. Nastalo oborino smo odnučali in v sušilniku posušili pri 60 °C ter dobili produkt. Zaradi premajhne količine smo matičnico še dodatno ekstrahirali z etilacetatom (3×20 mL). Tega smo nato sprali z nasičeno raztopino NaCl (1×20 mL), posušili z Na₂SO₄ in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Preostanek v bučki smo združili z oborino in tako skupaj dobili spojino **13** (87,0 mg; 0,159 mmol).

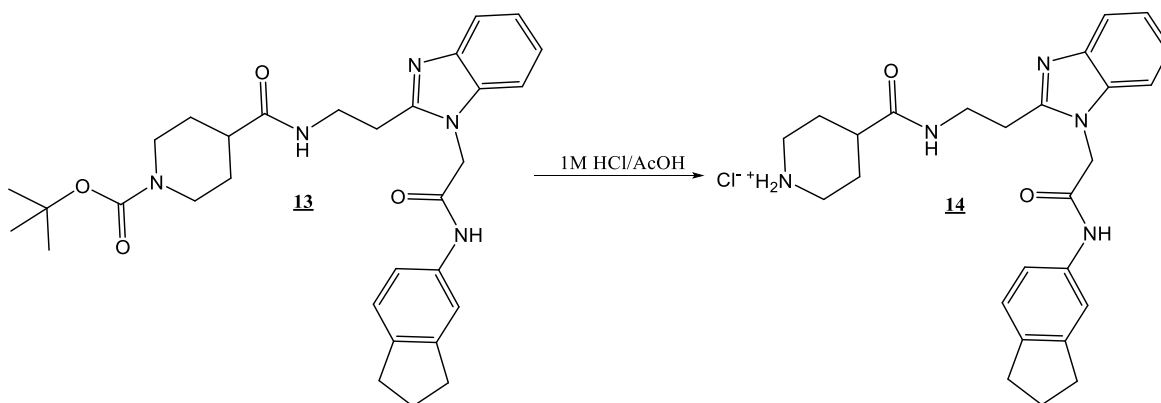
Produkt	Masa	Množina
Teoretično	207 mg	0,380 mmol
Praktično	87 mg	0,159 mmol
Izkoristek: 41,96%		

<i>Tert</i> -butil 4-((2-(1-(2-((2,3-dihidro-1 <i>H</i> -inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-il)etil)karbamoil)piperidin-1-karboksilat (13)	$M_r=545,68$
Elementna sestava	C ₃₁ H ₃₉ N ₅ O ₄
Izgled	Oranžno-rjav prah
R _f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH 9:1 + AcOH)	0,28 (ninhidrin)
T _t	90-95 °C

¹ H-NMR (MeOD, 400 MHz)	δ [ppm] = 1.40 (s, 9H, 3×CH ₃ -C), 1.59-1.62 (m, 2H, CH ₂ -CH ₂ -CH ₂), 1.96-2.05 (m, 2H, CH ₂ -CH ₂ -CH ₂), 2.55-2.83 (m, 8H, 2×CH ₂ -CH ₂ -N in 2×CH ₂), 3.09 (t, 2H, <i>J</i> = 6.8 Hz, Ar-CH ₂ -CH ₂), 3.59-3.64 (m, 2H, CH ₂ -CH ₂ -NH), 5.10 (s, 1H, N-CH ₂ -CO), 7.09 (d, 1H, <i>J</i> = 8.0 Hz, Ar-H) 7.19-7.25 (m, 3H, 3×Ar-H), 7.37-7.41 (m, 2H, 2×Ar-H), 7.56-7.58 (m, 1H, Ar-H)
¹³ C NMR (DMSO, 100 MHz)	δ [ppm] = 26.71, 28.08, 28.67, 29.57, 33.26, 33.94, 38.67, 38.82, 43.87, 47.47, 81.08, 110.83, 117.58, 119.28, 119.53, 123.67, 123.71, 124.07, 125.41, 136.69, 137.39, 141.73, 142.91, 146.09, 155.10, 156.38, 167.13, 177.71
MS (ESI)	544,3 (M-H) ⁻
HRMS za C ₃₁ H ₃₈ N ₅ O ₄	izračunano: 544,2924 izmerjeno: 544,2929
HPLC (254 nm)	86,07% (t _r =13,359 min)*

* spojina na koloni razpada zaradi kislih pogojev, uporabljenih pri HPLC kromatografiji

4.6.3 Sinteza 4-(2-(1-(2-((2,3-dihidro-1H-inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1-H-benzo[d]imidazol-2-il)etil)karbamoil piperidin-1-il klorida



V 25 mL bučko smo zatehtali spojino **13** (62,0 mg; 0,109 mmol), jo raztopili v 1 mL AcOH in raztopini na ledeni kopeli dodali 1M HCl/AcOH (1 mL, 1,00 mmol; 9.2 ekv) ter reakcijsko zmes pustili mešati 2,5 h pri sobni T. Po končani reakciji smo odpareli topilo, preostanek pa prelili z etrom in pustili preko noči. Nastalo oborino smo odnučali in posušili ter dobili spojino **14** (40,0 mg, 0,0900 mmol).

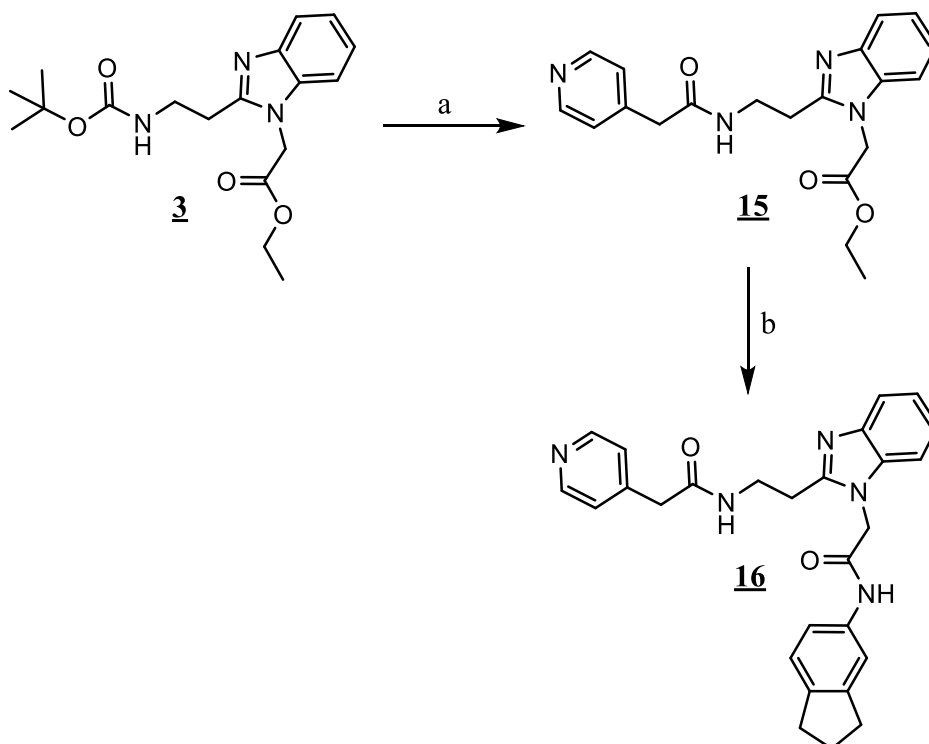
Produkt	Masa	Množina
Teoretično	53,2 mg	0,109 mmol
Praktično	40,0 mg	0,0820 mmol
Izkoristek: 75,19%		

Matevž Slivnik:

Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorja NOD2 na osnovi N-alkilbenzamidnega osnovnega ogrodja

4-(2-(1-(2-((2,3-dihidro-1H-inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1-H-benzo[d]imidazol-2-il)etil)karbamoil piperidin-1-il klorid (14)	$M_r=482,03$
Elementna sestava	$C_{26}H_{32}N_5O_2Cl$
Izgled	Rjavo olje
Rf ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1 + AcOH)	0,375 (ninhidrin)
1H -NMR (MeOD, 400 MHz)	δ [ppm] = 1.58-1.68 (m, 2H, $\underline{CH_2}$), 1.79-1.98 (m, 6H, $3 \times CH_2$), 2.70-2.72 (m, 4H, $2 \times CH_2$), 2.78-2.84 (m, 2H, $\underline{CH_2-CH_2-N}$), 3.32-3.38 (m, 2H, $\underline{Ar-CH_2-CH_2}$), 3.58-3.64 (m, 2H, $\underline{CH_2-CH_2-NH}$), 5.40 (s, 1H, $\underline{N-CH_2-CO}$), 7.00-7.02 (m, 1H, $\underline{Ar-H}$), 7.21 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, $\underline{Ar-H}$), 7.36 (s, 1H, $\underline{Ar-H}$), 7.46 (d, 2H, $J = 7.6$ Hz, $2 \times \underline{Ar-H}$), 7.67-7.72 (m, 2H, $2 \times \underline{Ar-H}$)
^{13}C NMR (DMSO, 100 MHz)	δ [ppm] = 22.71, 26.49, 26.70, 27.46, 33.29, 33.94, 38.03, 40.73, 44.34, 113.55, 115.56, 117.48, 117.52, 119.45, 119.50, 125.49, 127.45, 127.49, 127.72, 137.25, 141.94, 146.17, 164.83, 176.47
MS (ESI)	444,2 ($C_{26}H_{30}N_5O_2^-$)
HRMS za $C_{26}H_{30}N_5O_2$	izračunano: 444,2400 izmerjeno: 444,2394
IR	ν [cm^{-1}] = 3239, 2933, 2848, 1655, 1550, 1488, 1428, 1217, 822, 749
HPLC (254 nm)	78,75% ($t_r=3,716$ min)

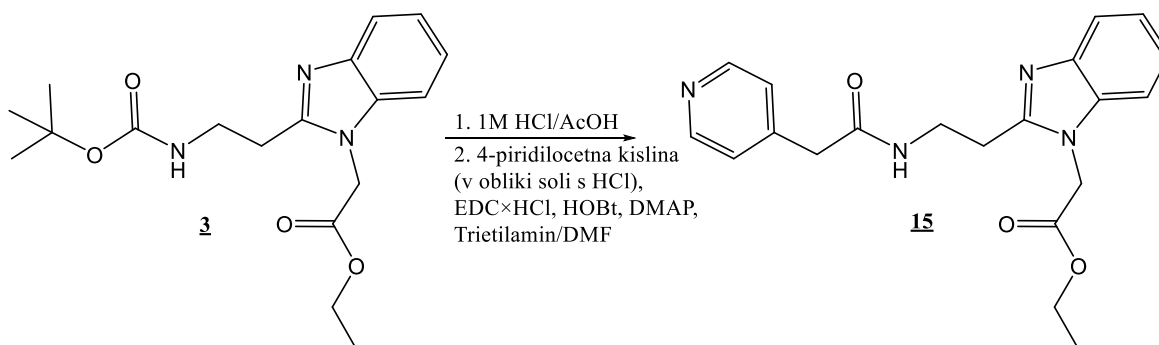
4.7 REAKCIJSKA SHEMA 7



a: 1. 1M HCl/AcOH; 2. 4-piridilocetna kislina (v obliki soli s HCl), EDC×HCl, HOBT, DMAP, trietilamin/DMF

b: 1. 1M NaOH/THF; 2. 5-aminoindan, EDC×HCl, HOBT, DMAP, trietilamin/DMF

4.7.1 Sinteza etil 2-(2-(2-(2-(piridin-4-il)acetamido)etil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetata (**15**)



V 25 mL bučki smo v 4 mL AcOH raztopili spojino **3** (146 mg; 0,420 mmol), raztopino ohladili na 0 °C in ji dodali 1M HCl/AcOH (2 mL; 2,00 mmol; 4,8 ekv.) ter mešali 2 h pri sobni T. Nato smo pod znižanim tlakom odpareli topilo in takoj nadaljevali z naslednjo

Matevž Slivnik:

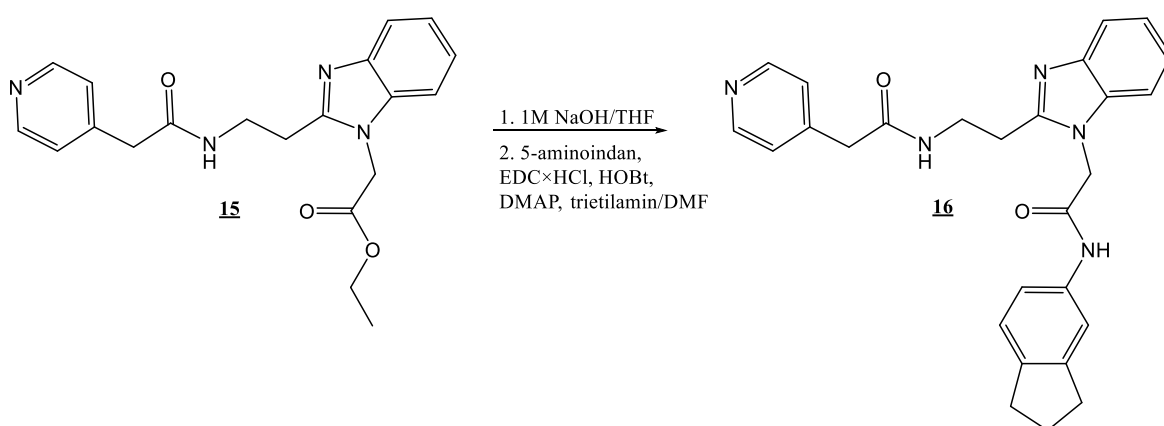
Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorja NOD2 na osnovi N-alkilbenzamidnega osnovnega ogrodja

stopnjo sinteze. Preostanek smo raztopili v 3 mL DMF in dodali 4-piridilacetno kislino v obliki soli s HCl (93,7 mg; 0,540 mmol; 1,3 ekv.), EDC×HCl (88,7 mg; 0,462 mmol; 1,1 ekv.), HOBt (62,8 mg; 0,462 mmol; 1,1 ekv.), trietilamin (250 µL; 1,8 mmol; 4,3 ekv.) ter katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo nato 48 h mešali pri sobni T. Po končani reakciji smo vanjo dodali 10 mL vode in zmes ekstrahirali z etilacetatom (5×20 mL). Organsko fazo smo nato sprali z NaHCO₃ (1×20 mL), vodno raztopino HCl (pH=4; 2×30 ml) in nasičeno raztopino NaCl (1×20 mL). Nato smo jo posušili z Na₂SO₄ in topilo odpareli pod znižanim tlakom ter dobili surovo spojino **15** (72,0 mg; 0,197 mmol). Ker je produkt bil surov in neprečiščen, smo ga brez obširnega spektroskopskega vrednotenja uporabili v naslednji stopnji sinteze.

Produkt	Masa	Množina
Teoretično	154 mg	0,420 mmol
Praktično	72,0 mg	0,197 mmol
Izkoristek: 46,78%		

Etil 2-(2-(2-(2-(piridin-4-il)acetamido)etil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetat (15)	M _r =366,42
Elementna sestava	C ₂₀ H ₂₂ N ₄ O ₃
Izgled	Oranžno-rjavo viskozno olje
R _f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH 9:1 + AcOH)	0,42 (ninhidrin)

4.7.2 Sinteza N-(2,3-dihidro-1H-inden-5-il)-2-(2-(2-(2-(piridin-4-il)acetamido)etil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetamida (**16**)



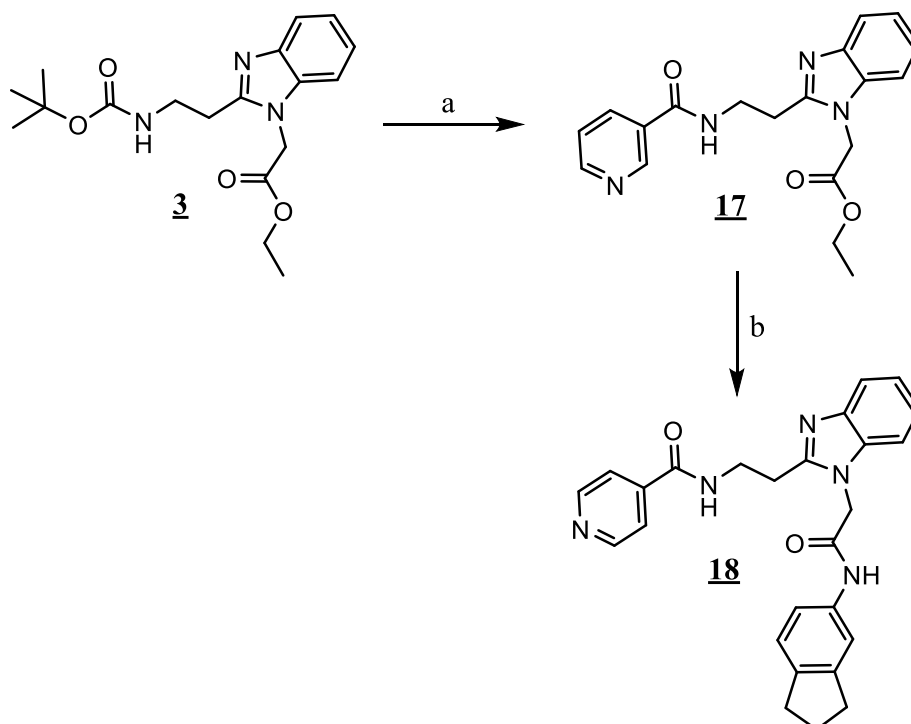
V 25 ml bučko smo zatehtali surovo spojino **15** (72,0 mg; 0,197 mmol), jo raztopili v 2 mL THF in raztopini dodali 1M NaOH (1 mL; 1,00 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni T 1,5 h. Po končani reakciji smo zmes z 1M HCl nakisali do pH=5 in topilo odpareli

pod znižanim tlakom. S surovim produktom smo takoj nadaljevali naslednjo stopnjo sinteze. Surovo kislino (67,0 mg; 0,197 mmol) smo raztopili v 1 mL DMF in raztopini dodali 5-aminoindan (21,0 mg; 0,152 mmol; 0,77 ekv.), EDC×HCl (42,2 mg; 0,220 mmol; 1,1 ekv.), HOBt (30,0 mg; 0,220 mmol; 1,1 ekv.), trietilamin (139 μ L; 1 mmol; 5,0 ekv.) ter katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo 24 h mešali pri sobni T. Po končani reakciji smo zmesi dodali 10 mL vode in jo ekstrahirali z etilacetatom (4×30 mL). Organsko fazo smo nato sprali z vodno raztopino HCl (pH=5; 1×10 mL), nasičeno raztopino NaCl (1×20 mL), jo posušili z Na₂SO₄ in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Preostanek smo prelili z etrom in postavili v hladilnik preko noči. Nastalo oborino smo odnučali, posušili in dobili spojino **16** (27 mg; 0,060 mmol).

Produkt	Masa	Množina
Teoretično	68,9 mg	0,152 mmol
Praktično	27,0 mg	0,060 mmol
Izkoristek: 39,19%		

<i>N</i> -(2,3-dihidro-1 <i>H</i> -inden-5-il)-2-(2-(2-(2-(piridin-4-il)acetamido)etil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)acetamid (16)	$M_r=453,55$
Elementna sestava	C ₂₇ H ₂₇ N ₅ O ₂
Izgled	Oranžno-rjav prah
R _f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH 9:1 + AcOH)	0,33 (ninhidrin)
T _t	85-90 °C
¹ H-NMR (MeOD, 400 MHz)	δ [ppm] = 1.93-2.00 (m, 2H, CH ₂ CH ₂ CH ₂), 2.74-2.79 (m, 4H, 2×Ph-CH ₂ CH ₂), 3.05 (t, 2H, <i>J</i> = 7.2 Hz, Ar-CH ₂ -CH ₂), 3.57-3.65 (m, 2H, CH ₂ -CH ₂ -NH), 5.01 (s, 1H, N-CH ₂ -CO), 5.05 (s, 1H, Py-CH ₂ -CO), 7.04-7.06 (m, 2H, 2×Ar-H), 7.12-7.20 (m, 4H, 4×Ar-H), 7.33-7.37 (m, 2H, 2×Ar-H), 7.54-7.56 (m, 2H, 2×Ar-H), 8.20-8.21 (m, 1H, Ar-H)
¹³ C NMR (DMSO, 100 MHz)	δ [ppm] = 22.61, 26.68, 27.87, 28.08, 33.26, 33.90, 38.82, 47.39, 110.82, 110.85, 117.61, 119.31, 119.35, 119.57, 123.65, 123.70, 124.04, 124.08, 125.41, 126.17, 136.69, 137.35, 141.72, 142.96, 146.09, 149.89, 155.08, 167.09, 173.62
MS (ESI)	452,2 (M-H) ⁻
HRMS za C ₂₇ H ₂₆ N ₅ O ₂	izračunano: 452,2087 izmerjeno: 452,2077
IR	ν [cm ⁻¹] = 3299, 3059, 2953, 2844, 2359, 1671, 1602, 1557, 1491, 1463, 1438, 1332, 1221, 1156, 1094, 805, 743
HPLC (254 nm)	77,07% (t _r =6.498 min)

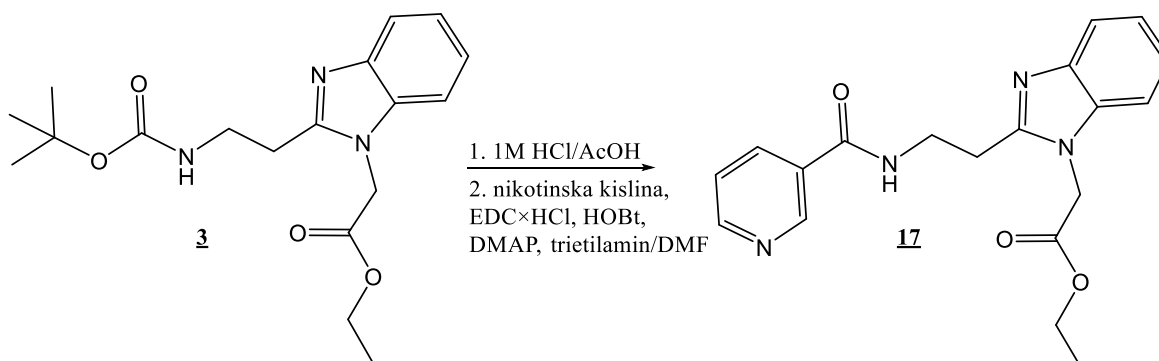
4.8 REAKCIJSKA SHEMA 8



a: 1. 1M HCl/AcOH; 2. nikotinska kislina, EDC×HCl, HOBt, DMAP, trietilamin/DMF

b: 1. 1M NaOH/THF; 2. 5-aminoindan, EDC×HCl, HOBt, DMAP, trietilamin/DMF

4.8.1 Sinteza etil 2-(2-(2-(nikotinamido)etil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetata (**17**)



V 25 mL bučki smo v 4 mL AcOH raztopili spojino **3** (133 mg; 0,383 mmol), raztopino ohladili na 0 °C, vanjo na ledeni kopeli dodali 1M HCl/AcOH (2 mL; 2,00 mmol) ter mešali 2 h pri sobni T. Nato smo pod znižanim tlakom odpareli topilo in takoj nadaljevali z naslednjo stopnjo sinteze. Surov preostanek smo raztopili v 3 mL DMF in v raztopino dodali nikotinsko kislino (60,6 mg; 0,492 mmol; 1,3 ekv.), EDC×HCl (80,9 mg; 0,420 mmol; 1,1

Matevž Slivnik:

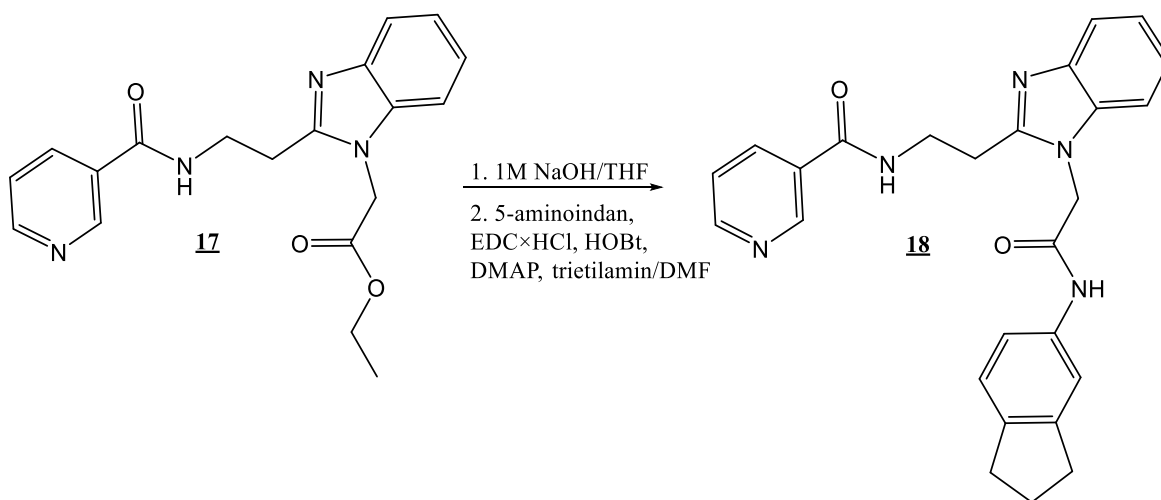
Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorja NOD2 na osnovi N-alkilbenzamidnega osnovnega ogrodja

ekv.), HOBt (57,0 mg; 0,420 mmol; 1,1 ekv.), trietilamin (230 μ L; 1,65 mmol; 4,4 ekv.) ter katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo nato 48 h mešali pri sobni T. Po končani reakciji smo v bučko dodali 10 mL vode in zmes ekstrahirali z etilacetatom (5 \times 20 mL). Organsko fazo smo nato sprali z NaHCO₃ (1 \times 20 mL), nasičeno raztopino NaCl (1 \times 20 mL), joposušili z Na₂SO₄ in topilo odpareli pod znižanim tlakom ter dobili surovo spojino **17** (60,0 mg; 0,170 mmol). Ker je produkt bil surov in neprečiščen, smo ga brez obširnega spektroskopskega vrednotenja uporabili v naslednji stopnji sinteze.

Produkt	Masa	Množina
Teoretično	134 mg	0,383 mmol
Praktično	60,0 mg	0,170 mmol
Izkoristek: 44,78%		

Etil 2-(2-(2-(nikotinamido)etil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)acetat (17)	$M_r=352,39$
Elementna sestava	C ₁₉ H ₁₉ N ₄ O ₃
Izgled	Rjav prah
R _f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH 9:1 + AcOH)	0,34 (ninhidrin)
MS (ESI)	m/z: 351,1 (M-H) ⁻
HRMS za C ₁₉ H ₁₉ N ₄ O ₃	izračunano: 351,1457 izmerjeno: 351,1451

4.8.2 Sinteza N-(2-(1-(2-((2,3-dihidro-1*H*-inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)etil)nikotinamida (**18**)



V 25 ml bučko smo zatehtali spojino **17** (60 mg; 0,137 mmol), jo raztopili v 2 mL THF in raztopini dodali 1M NaOH (1 mL; 1,00 mmol; 7,3 ekv.). Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni T 1,5 h. Po končani reakciji smo zmes z 1M HCl nakisali do pH=5 in topilo odpareli

Matevž Slivnik:

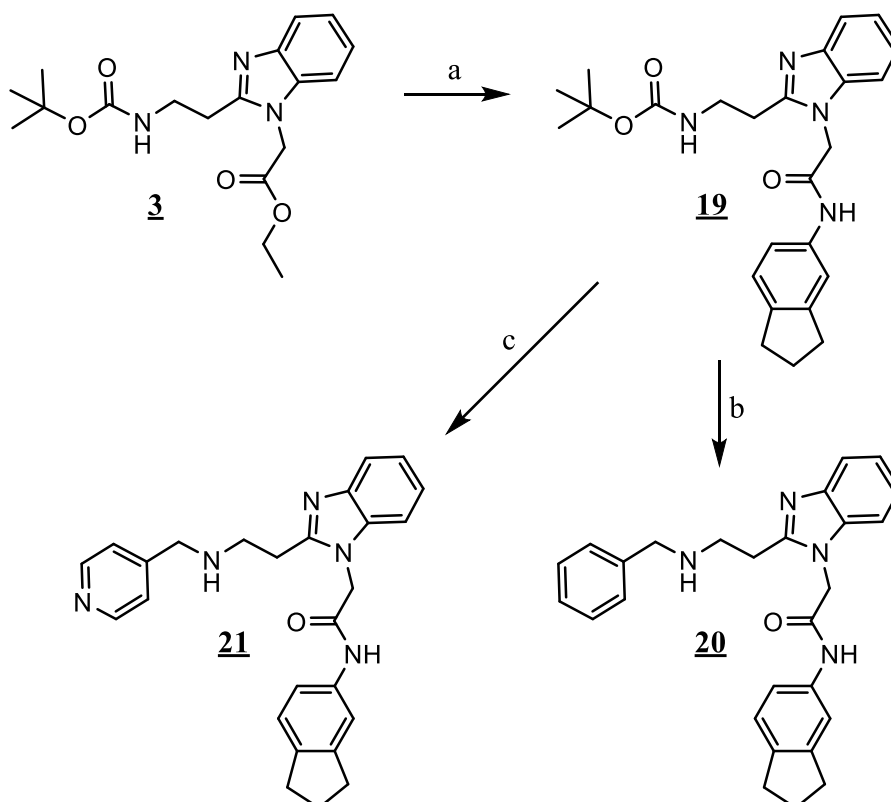
Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorja NOD2 na osnovi N-alkilbenzamidnega osnovnega ogrodja

pod znižanim tlakom. S surovim produktom smo takoj nadaljevali naslednjo stopnjo sinteze. Surovo kislino (44,4 mg; 0,137 mmol) smo raztopili v 1 mL DMF in v raztopino dodali 5-aminoindan (13,9 mg; 0,104 mmol; 0,76 ekv.), EDC×HCl (35,7 mg; 0,186 mmol; 1,4 ekv.), HOBt (25,1 mg; 0,186 mmol; 1,4 ekv.), trietilamin (118 µL; 0,850 mmol; 6,2 ekv.) ter katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo 48 h mešali pri sobni T. Po končani reakciji smo k zmesi dolili 10 mL vode in jo postavili v hladilnik za 1 h. Nastalo oborino smo odnučali in posušili v sušilniku pri 60 °C ter dobili spojino **18** (13,0 mg; 0,0506 mmol).

Produkt	Masa	Množina
Teoretično	45,7 mg	0,104 mmol
Praktično	13,0 mg	0,0296 mmol
Izkoristek: 28,44%		

<i>N</i> -(2-(1-(2-((2,3-dihidro-1 <i>H</i> -inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-il)etil)nikotinamid (18)	$M_r=439,52$
Elementna sestava	$C_{26}H_{25}N_5O_2$
Izgled	Rjav prah
R _f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH 9:1 + AcOH)	0,41 (ninhidrin)
T _t	>300 °C
¹ H-NMR (CDCl ₃ , 400 MHz)	δ [ppm] = 1.96-2.04 (m, 2H, CH ₂ CH ₂ CH ₂), 2.77-2.81 (m, 4H, 2×Ph-CH ₂ CH ₂), 3.86 (t, 2H, <i>J</i> = 6.8 Hz CH ₂ -CH ₂ -NH), 5.14 (s, 1H, N-CH ₂ -CO), 7.05-7.07 (m, 1H, Ar-H), 7.17-7.24 (m, 3H, 3×Ar-H), 7.36-7.43 (m, 2H, 3×Ar-H), 7.56-7.58 (m, 1H, Ar-H), 8.13 (d, 1H, <i>J</i> = 8.0 Hz, Ar-H), 8.57-8.58 (m, 1H, Ar-H), 8.87 (d, 1H, <i>J</i> = 1.6 Hz, Ar-H)
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO)	δ [ppm] = 26.96, 27.90, 33.25, 33.91, 39.51, 47.45, 110.86, 117.50, 119.30, 119.46, 123.70, 124.08, 125.08, 125.36, 137.04, 137.34, 141.66, 143.00, 146.04, 149.22, 152.57, 155.09, 167.06, 168.01
MS (ESI)	<i>m/z</i> : 438,2 (M-H) ⁻
HRMS za C ₂₆ H ₂₄ N ₅ O ₂	izračunano: 438,1930 izmerjeno: 438,1919
IR	ν [cm ⁻¹] = 2145, 1979, 1687, 1401, 1013, 872, 787, 699
HPLC (254 nm)	100% (t _r =4,560 min)

4.9 REAKCIJSKA SHEMA 9

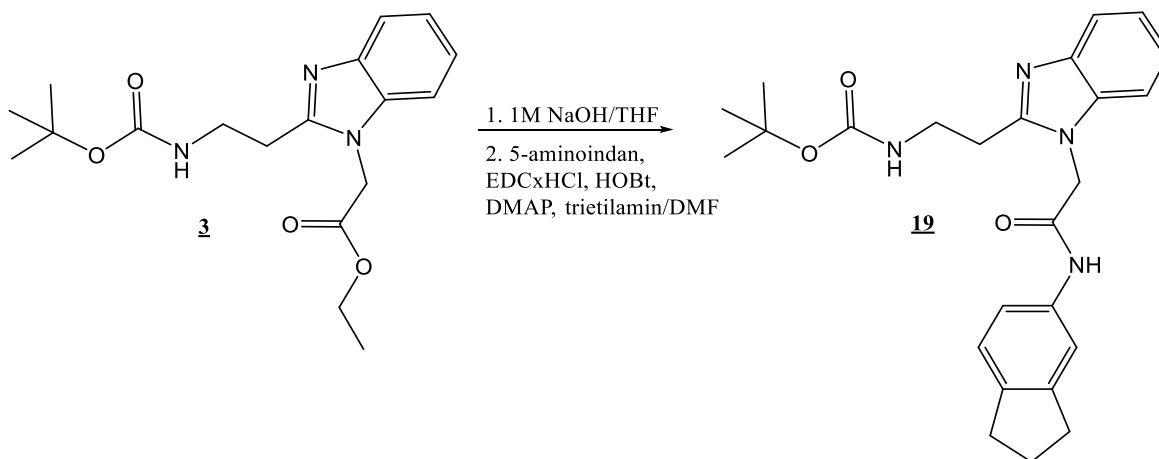


a: 1. 1M NaOH/THF; 2. 5-aminoindan, EDC×HCl, HOBt, DMAP, trietilamin/DMF

b: 1. 1M HCl/AcOH; 2. AcOH, benzaldehid, Na(OAc)₃BH/1,2-dikloroetan

c: 1. 1M HCl/AcOH; 2. AcOH, 4-piridinkarboksaldehid, Na(OAc)₃BH/1,2-dikloroetan

4.9.1 Sinteza *terc*-butil (2-(1-(2-((2,3-dihidro-1*H*-inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)etil)karbamata (**19**)



Matevž Slivnik:

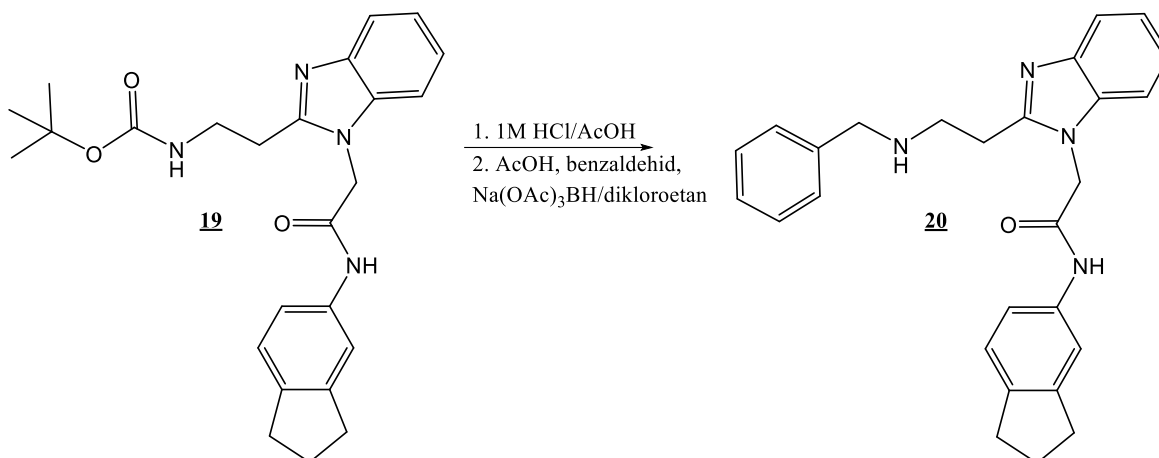
Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorja NOD2 na osnovi N-alkilbenzamidnega osnovnega ogrodja

V 100 ml bučko smo zatehtali spojino **3** (488 mg; 1,40 mmol), jo raztopili v 10 mL THF in raztopini dodali 1M NaOH (7 mL; 7,00 mmol; 5,0 ekv.). Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni T 1,5 h. Po končani reakciji smo zmes z 1M HCl nakisali do pH=5 in topilo odpareli pod znižanim tlakom. S surovim produktom smo takoj nadaljevali naslednjo stopnjo sinteze. Surovo kislino (447 mg; 1,40 mmol) smo raztopili v 5 mL DMF in raztopini dodali 5-aminoindan (148 mg; 1,07 mmol; 0,76 ekv.), EDC×HCl (296 mg; 1,54 mmol; 1,1 ekv.), HOBt (209 mg; 1,54 mmol; 1,1 ekv.), trietilamin (977 µL; 7 mmol; 5,0 ekv.) ter katalitično količino DMAP. Reakcijsko zmes smo 24 h mešali pri sobni T. Po končani reakciji smo k reakcijski zmesi dolili 50 mL vode in bučko postavili v hladilnik za 1 h. Nastalo oborino smo odnučali in preko noči posušili v sušilniku pri 65 °C ter dobili spojino **19** (193 mg; 0,444 mmol).

Produkt	Masa	Množina
Teoretično	464 mg	1,07 mmol
Praktično	193 mg	0,444 mmol
Izkoristek: 41,59%		

<i>Terc</i> -butil (2-(1-(2-((2,3-dihidro-1 <i>H</i> -inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-il)etil)karbammat (19)	$M_r=434,54$
Elementna sestava	$C_{25}H_{30}N_4O_3$
Izgled	Rjav prah
R _f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH 9:1 + AcOH)	0,52 (ninhidrin)
¹ H-NMR (CDCl ₃ , 400 MHz)	δ [ppm] = 1.26 (s, 9H, 3× CH ₃ -C), 2.01-2.08 (m, 2H, CH ₂ CH ₂ CH ₂), 2.80-2.86 (m, 4H, 2×Ph-CH ₂ CH ₂), 3.11 (t, 2H, <i>J</i> = 6.0 Hz, Ar-CH ₂ -CH ₂), 3.57 (k, 2H, <i>J</i> = 6.4 Hz, CH ₂ -CH ₂ -NH), 4.94 (s, 1H, N-CH ₂ -CO), 5.21 (t, 1H, <i>J</i> = 6.4 Hz, CH ₂ -NH <i>Boc</i>), 7.11 (d, 1H, <i>J</i> = 8.0 Hz, Ar- <u>H</u>), 7.24-7.31 (m, 1H, Ar- <u>H</u>), 7.38-7.40 (m, 1H, Ar- <u>H</u>), 7.45 (s, 1H, Ar- <u>H</u>), 7.70-7.71 (m, 1H, Ar- <u>H</u>), 9.05 (s, 1H, CO-NH-Ar)
¹³ C NMR (CDCl ₃ , 100 MHz)	δ [ppm] = 25.59, 28.19, 28.22, 32.35, 32.89, 38.59, 80.07, 109.66, 117.03, 118.71, 119.54, 122.64, 123.26, 124.25, 135.46, 135.51, 140.76, 142.59, 144.89, 156.43, 156.47
MS (ESI)	433,2 (M-H) ⁻
HRMS za C ₂₅ H ₂₉ N ₄ O ₃	izračunano: 433,2240 izmerjeno: 433,2246
IR	ν [cm ⁻¹] = 3328, 2936, 2843, 1662, 1493, 1463, 1250, 1165, 743

4.9.2 Sinteza 2-(2-(2-(benzilamino)etil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)-*N*-(2,3-dihidro-1*H*-inden-5-il)acetamida (**20**)



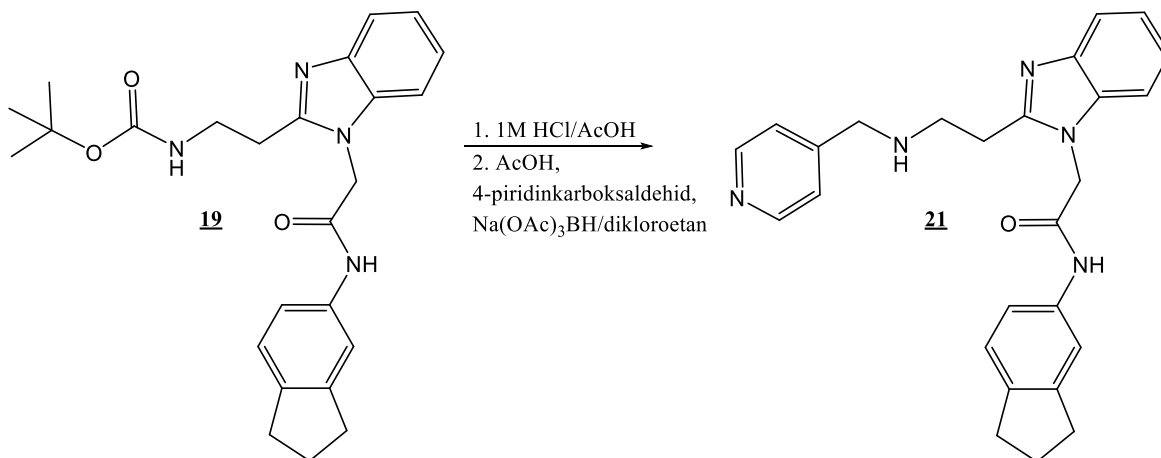
V 25 mL bučki smo v 4 mL AcOH raztopili spojino **19** (100 mg; 0,230 mmol), raztopino ohladili na 0 °C in vanjo na ledeni kopeli dodali 1M HCl/AcOH (1 mL; 1,00 mmol) ter mešali 2 h pri sobni T. Nato smo pod znižanim tlakom odpareli topilo, suhemu preostanku dodali 30 mL etilacetata in organsko fazo sprali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (1×10 mL) ter posušili z Na₂SO₄. Pod znižanim tlakom smo odpareli topilo in nadaljevali z naslednjo stopnjo sinteze. Surov preostanek smo raztopili v 6 mL 1,2-dikloroetana ter v raztopino dodali benzaldehid (24 μL; 0,237 mmol; 1,0 ekv.) in AcOH (13 μL; 0,230 mmol; 1,0 ekv.). Reakcijsko zmes smo prepihali z argonom in jo pustili mešati 2 uri pri sobni T. Nato smo dodali Na(OAc)₃BH (75,0 mg; 0,360 mmol; 1,6 ekv), reakcijsko zmes ponovno prepihali z argonom in jo pustili preko noči mešati v argonovi atmosferi pri sobni T. Po končani reakciji smo do suhega odpareli topilo, preostanku v bučki dodali 30 mL etilacetata in tega sprali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (1×7 mL). Organsko fazo smo nato posušili z Na₂SO₄ in topilo odpareli do suhega. Preostanek smo prelili z etrom in pustili preko noči. Nastalo oborino smo odnučali, v sušilniku posušili do suhega in dobili spojino **20** (70 mg; 0,165 mmol).

Produkt	Masa	Množina
Teoretično	98,0 mg	0,230 mmol
Praktično	70,0 mg	0,159 mmol
Izkoristek: 71,43%		

2-(2-(2-(benzilamino)etil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)- <i>N</i> -(2,3-dihidro-1 <i>H</i> -inden-5-il)acetamid (20)	M _r =424,55
Elementna sestava	C ₂₇ H ₂₈ N ₄ O
Izgled	Rjav prah

R _f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH 9:1 + AcOH)	0,9 (ninhidrin)
T _t	100-105 °C
¹ H-NMR (MeOD, 400 MHz)	δ [ppm] = 1.96-2.03 (m, 2H, CH ₂ CH ₂ CH ₂), 2.77-2.81 (m, 4H, 2×Ph-CH ₂ CH ₂), 3.10 (s, 4H, NH-CH ₂ -CH ₂ -Ar), 3.78 (s, 2H, Ph-CH ₂ -NH), 5.03 (s, 1H, N-CH ₂ -CO), 7.07-7.09 (m, 2H, 2×Ar-H), 7.17-7.28 (m, 7H, 7×Ar-H), 7.35-7.37 (m, 2H, 2×Ar-H), 7.55-7.57 (m, 1H, Ar-H)
¹³ C NMR (MeOD 100 MHz)	δ [ppm] = 26.70, 33.26, 33.92, 47.30, 54.10, 110.72, 117.54, 119.29, 119.49, 123.63, 124.01, 125.42, 128.44, 129.58, 129.67, 136.66, 137.36, 139.78, 141.71, 142.96, 146.11, 155.51, 167.01
MS (ESI)	423,2 (M-H) ⁻
HRMS za C ₂₇ H ₂₇ N ₄ O	izračunano: 423,2185 izmerjeno: 423,2181
IR	ν [cm ⁻¹] = 3292, 3061, 2943, 2843, 1440, 1331, 1154, 1093, 742, 695
HPLC (254 nm)	91,13% (t _r =8,460 min)

4.9.3 Sinteza N-(2,3-dihidro-1H-inden-5-il)-2-(2-(2-((piridin-4-ilmetil)amino)etil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetamida (**21**)



V 25 mL bučki smo v 4 mL AcOH raztopili spojino **19** (96,0 mg; 0,220 mmol), raztopino ohladili na 0 °C in vanjona ledeni kopeli dodali 1M HCl/AcOH (1 mL; 1,00 mmol, 4,5 ekv.) ter mešali 2 h pri sobni T. Nato smo pod znižanim tlakom odpareli topilo, suhemu preostanku dodali 30 mL etilacetata in organsko fazo sprali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (1×10 mL) ter posušili z Na₂SO₄. Pod znižanim tlakom smo odpareli topilo in nadaljevali z naslednjo stopnjo sinteze. Surov preostanek smo raztopili v 6 mL 1,2-dikloroetana ter dodali 4-pyridinkarboksaldehid (13 μL; 0,140 mmol; 1,0 ekv.) in AcOH (8 μL; 0,140 mmol; 1,0 ekv.).

Matevž Slivnik:

Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorja NOD2 na osnovi N-alkilbenzamidnega osnovnega ogrodja

Reakcijsko zmes smo prepihali z argonom in jo pustili mešati 2 uri pri sobni T. Nato smo dodali Na(OAc)₃BH (45,0 mg; 0,161 mmol; 1,1 ekv.), reakcijsko zmes ponovno prepihali z argonom in jo pustili preko noči mešati v argonovi atmosferi pri sobni T. Po končani reakciji smo do suhega odpareli topilo, preostanku v bučki dodali 30 mL etilacetata in tega sprali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (1×7 mL). Organsko fazo smo nato posušili z Na₂SO₄ in topilo odpareli do suhega ter dobili spojino **21** (36,0 mg; 0,085 mmol).

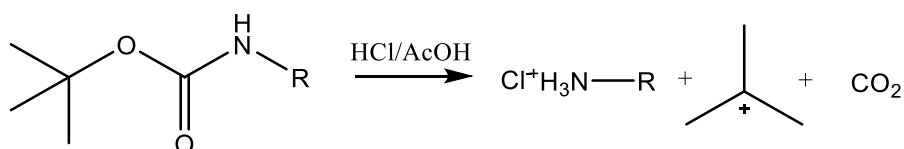
Produkt	Masa	Množina
Teoretično	61,0 mg	0,14 mmol
Praktično	36,0 mg	0,085 mmol
Izkoristek: 59,02%		

<i>N</i> -(2,3-dihidro-1 <i>H</i> -inden-5-il)-2-(2-(2-((piridin-4-ilmetil)amino)etil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)acetamida (21)	$M_r=425,54$
Elementna sestava	C ₂₆ H ₂₇ N ₅ O
Izgled	Svetlo rjav prah
R _f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH 9:1 + AcOH)	0,63 (ninhidrin)
T _t	92-97 °C
¹ H-NMR (MeOD, 400 MHz)	δ [ppm] = 1.95-2.03 (m, 2H, CH ₂ CH ₂ CH ₂), 2.77-2.80 (m, 4H, 2×Ph-CH ₂ CH ₂), 3.08 (s, 4H, NH-CH ₂ -CH ₂ -Ar), 3.79 (s, 2H, Py-CH ₂ -NH), 5.06 (s, 1H, N-CH ₂ -CO), 7.06-7.08 (m, 1H, Ar- <u>H</u>), 7.15-7.22 (m, 3H, 3×Ar- <u>H</u>), 7.30-7.37 (m, 4H, 4×Ar- <u>H</u>), 7.54-7.57 (m, 1H, Ar- <u>H</u>), 8.31-8.33 (m, 2H, 2×Ar- <u>H</u>)
¹³ C NMR (MeOD, 100 MHz)	δ [ppm] = 26.70, 28.17, 33.26, 33.92, 47.34, 47.91, 52.88, 110.75, 117.50, 119.25, 119.44, 123.62, 123.97, 124.87, 125.43, 136.68, 137.40, 141.69, 142.97, 146.12, 149.95, 151.63, 155.80, 167.03
MS (ESI)	424,2 (M-H) ⁻
HRMS za C ₂₆ H ₂₆ N ₅ O	izračunano: 424,2137 izmerjeno: 424,2131
IR	ν [cm ⁻¹] = 2925, 1684, 1601, 1557, 1490, 1413, 1286, 1060, 815, 743
HPLC (254 nm)	93,20% (t _r =3,458 min)

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 ODSTRANITEV BOC ZAŠČITE

Odstranitev *tert*-butilkarbamatne zaščite (Boc) smo z namenom pridobitve proste aminske skupine izvajali pred tvorbo amidne vezi (spojine **6**, **12**, **15** in **17**), sulfonamidne vezi (spojine **4**, **8**, in **10**), reduktivnim aminiranjem (spojini **20** in **21**) in sintezo končne spojine **14**. Zaščito se odstrani z acidolizo, v našem primeru smo uporabili 1M HCl/AcOH, ki smo jo na ledeni kopeli po kapljicah dodajali v raztopino Boc-zaščitenih aminov pri 0 °C. Pri odstranitvi nastane prosti amin v obliki soli, kot stranska produkta pa *tert*-butilni kation in CO₂ (Slika 11) (26). Za odstranitev Boc bi lahko uporabili tudi trifluoroocetno kislino (TFA), vendar pa gre v primerjavi s HCl za šibkejšo kislino, ki bi za uspešen potek reakcije potrebovala daljši čas (27). Kot alternativo HCl bi lahko izbrali koncentrirano H₂SO₄/*t*BuOAc ali metansulfonsko kislino v mešanici *t*BuOAc in diklorometana (28).



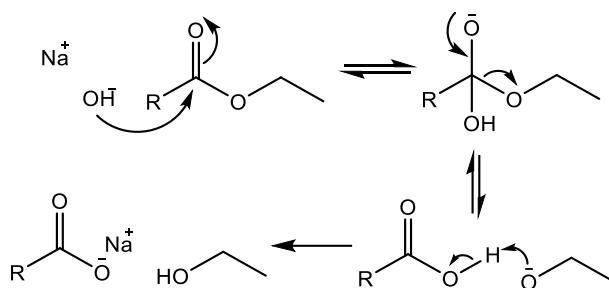
Slika 11: Acidoliza *tert*-butilkarbamatne zaščitne skupine (prirejeno po (26))

Pri sintezi spojin **4**, **6**, **8**, **10**, **12**, **15** in **17** smo po odstranitvi Boc zaščite samo odparili topilo (AcOH) in s surovim produktom takoj nadaljevali z naslednjo stopnjo sinteze, saj smo z dodanim presežkom trietilamina v naslednji stopnji sinteze sol pretvorili v neprotonirano obliko amina. Pri sintezi spojin **20** in **21**, kjer je kot naslednja reakcija po acidolizi sledilo reduktivno aminiranje, pa nismo šli takoj v naslednjo stopnjo, ampak smo prosto aminske oblike za naslednjo stopnjo sinteze dobili tako, da smo suh preostanek po odparevanju raztopili v etilacetatu in ga spirali z nasičeno raztopino NaHCO₃. Pri končni spojini **14** smo večino AcOH odpareli pod znižanim tlakom, preostanek v bučki pa smo prelili z etrom, v katerem je AcOH dobro topna, in pustili preko noči, da se je spojina **14** izoborila (v obliki soli s HCl). Po nučanju in sušenju oborine je izkoristek sinteze spojine **14** znašal **75,19%**. Glede na to da je HCl/AcOH zelo učinkovit pri odstranitvi Boc zaščite in da smo je uporabili kar 9,2 ekv., bi pričakovali večji izkoristek. Prav tako lahko sklepamo, da je reakcija potekla do konca, saj je ves produkt v obliki soli (razpotegnjena lisa na začetku TLC-ja). Razlog za

nekoliko slabši izkoristek je rahlo nečista izhodna spojina **13**, kar je razvidno iz HPLC analize (2 vrhova).

5.2 ALKALNA HIDROLIZA ESTRA

Da smo dobili prosto karboksilno skupino, smo pred sintezo spojin **5**, **7**, **9**, **11**, **13**, **16**, **19** in **18** morali najprej odstraniti etilni ester. To smo izvedli z alkalno hidrolizo z 1M NaOH v THF, pri kateri pride do nastanka karboksilne kisline v obliki natrijeve soli. Reakcija poteka kot nukleofilna substitucija, kjer hidroksidni ion kot nukleofil napade elektrofilni karbonilni ogljikov atom estra, kar privede do tvorbe tetraedričnega intermedijata, ki pa hitro razpade na karboksilno kislino in ustreznemu alkoksidni anion. Alkoksidni anion nato deluje kot baza, ki deprotonira karboksilno kislino (Slika 12) (29).



Slika 12: Mehanizem alkalne hidrolize etilnega estra (prirejeno po (29))

Po končani hidrolizi smo reakcijsko zmes z 1M HCl nakisali na pH=5, da smo ravnotežje pomaknili v smer nedisociirane oblike karboksilne kisline. Nato smo topilo odpareli ter s surovo kislino takoj nadaljevali z naslednjo stopnjo sinteze, saj smo se na ta način izognili velikim izgubam zaradi potencialnega prehoda produkta v vodno fazo pri ekstrakciji (v primeru, da vsa karboksilna kislina ne bi bila v nedisociirani obliki; oziroma zaradi velike polarnosti same kisline).

5.3 TVORBA AMIDNE VEZI

Amidno vez smo tvorili pri sintezi spojin, kjer smo izvajali:

- Sklopitev med karboksilno kislino Boc- β -Ala in primarno aromatsko aminsko skupino 1,2-diaminobenzena (spojina **1**),
- Sklopitev med karboksilno kislino/reagenti v obliki kislinskih kloridov substituentov in prosto aminsko skupino (spojine **6**, **12**, **15** in **17**).

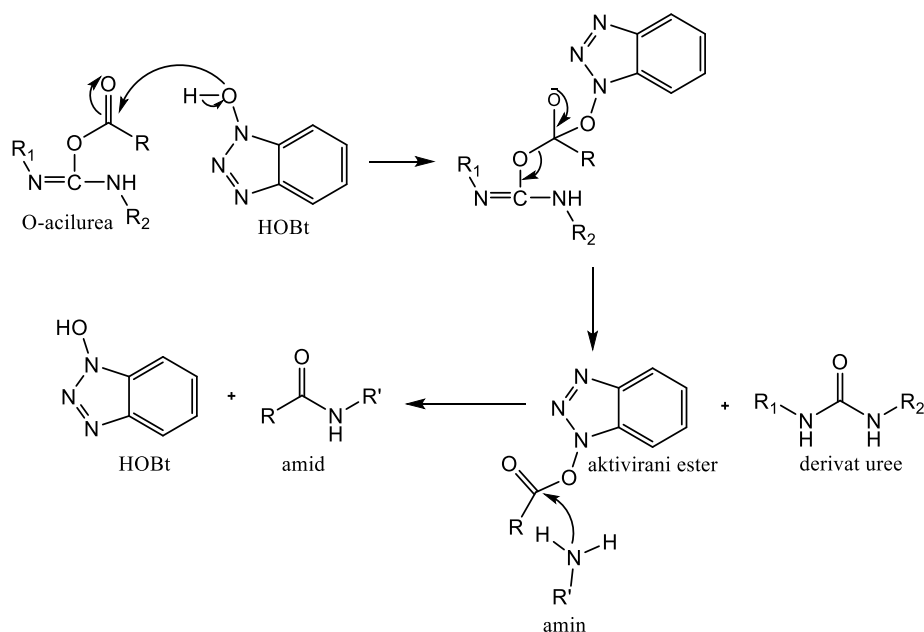
- c) Sklopitev med amsko skupino 5-aminoindana in karboksilno skupino po hidrolizi estra (spojine 5, 7, 9, 11, 13, 16, 18 in 19).

Pri vseh tvorbah amidne vezi smo kot bazo uporabili trietilamin, kot sklopitveni reagent EDC×HCl in HOBt kot pomožni nukleofil. Pri vseh reakcijah, razen pri sintezi spojine 1, smo v reakcijsko zmes dodali tudi DMAP kot katalizator, kot topilo pa uporabili DMF. V njem so topni vsi reagenti, po končani reakciji in dodatku vode gre večina DMF v vodno fazo, produkt pa se izobori in ga lahko odnučamo. Pri sintezi spojine 1 smo kot topilo izbrali THF, ki prav tako zagotavlja ustrezno topnost reagentov, saj smo imeli opravka z večjo količino reagenta, za kar smo potrebovali večji volumen topila, ki ga lahko zlahka odparimo.

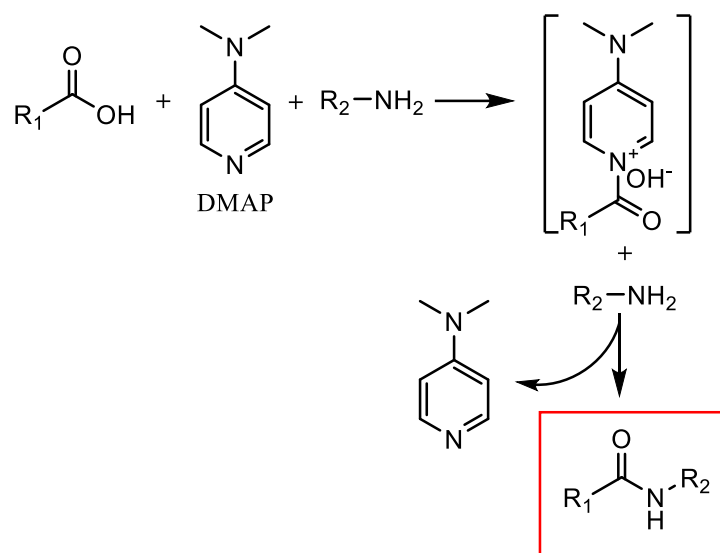
EDC×HCl (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid) spada v skupino karbodiimidov, ki karboksilno skupino aktivirajo tako, da tvorijo O-acilsečnino (*in-situ*). Ta intermediat lahko direktno tvori amidno vez prek sklopitve s prostim aminom, kot stranski produkt pa nastane derivat sečnine, lahko pa se pretvori do ustreznega anhidrida, ki nadalje zreagira do amida (v tem primeru potrebujemo 2 ekvivalenta kisline). Dobra stran reagenta EDC×HCl je ta, da je tako kot njegov stranski produkt sečnina, dobro topen v vodi in se ju po končani reakciji lahko odstrani s spiranjem s kislno vodno raztopino. Problematično je le, če pride do epimerizacije (racemizacije) ali do prenosa acilne skupine na O-acilsečnini, pri čemer nastane nereaktivna N-acilsečnina. Nobena od naših spojin nima kiralnega centra, zato je večjo težavo predstavljala ravno tvorba tega stranskega produkta. Temu smo se izognili z dodatkom pomožnih nukleofilov HOBt in DMAP, ki v primerjavi z reakcijo nastanka N-acilsečnine reagirata hitreje in ustvarita intermediat, ki je še vedno sposoben tvorbe amidne vezi z aminom (Slike 13-15) (30,31).

Matevž Slivnik:

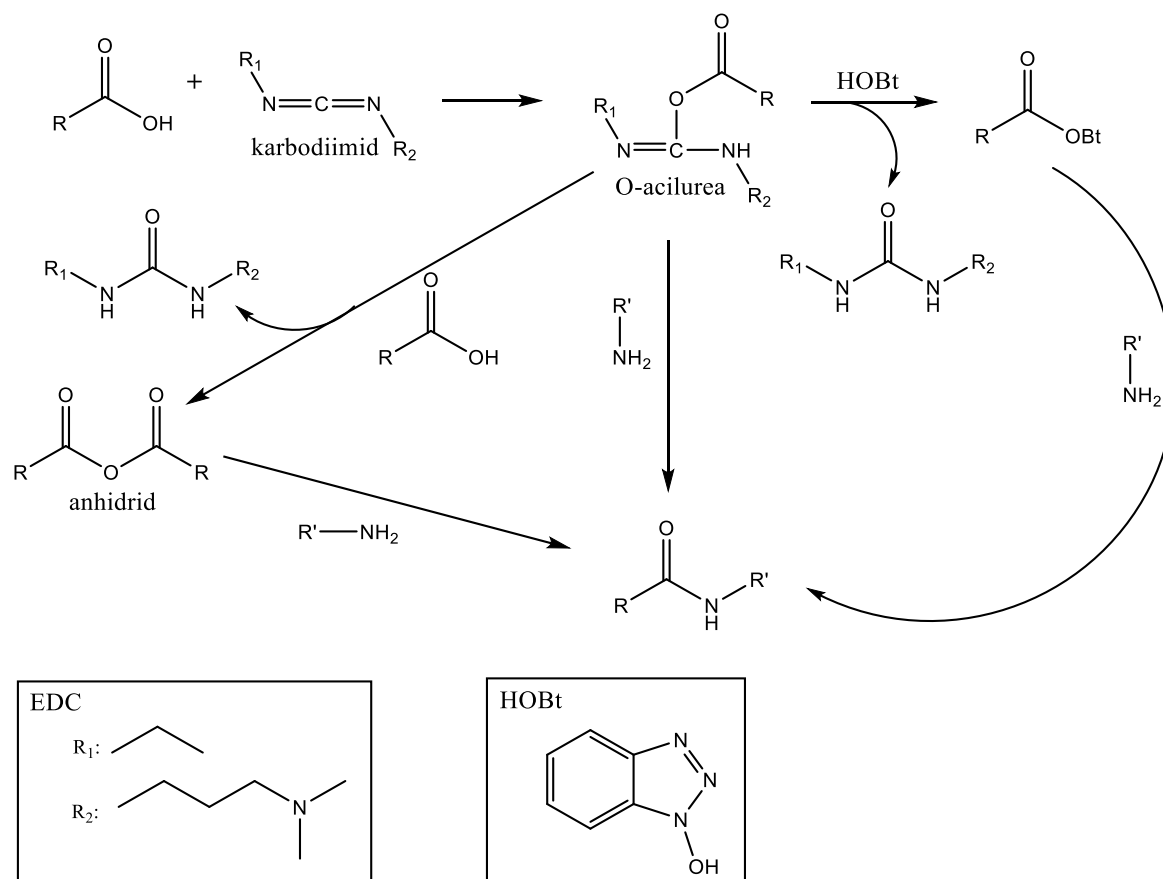
Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorja NOD2 na osnovi N-alkilbenzamidnega osnovnega ogrodja



Slika 13: Mehanizem nastanka amida prek aktiviranega estra z HOBT (prirejeno po (30))



Slika 14: Mehanizem DMAP kot katalizatorja pri sintezi amidov (prirejeno po (31))

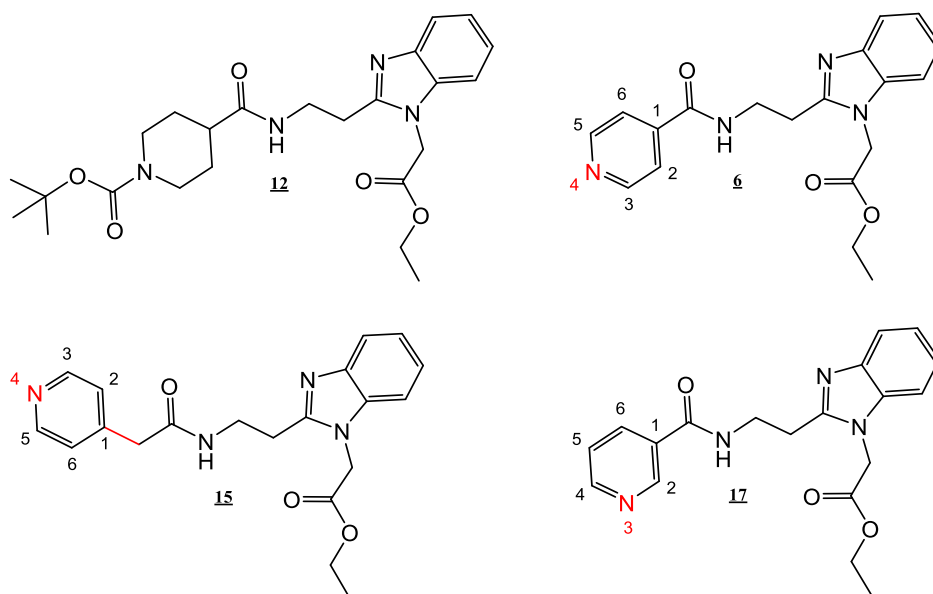


Slika 15: Mehanizem tvorbe amidne vezi s karbodiimidi in HOBt (prirejeno po (32))

Pri sintezi spojine **1** je šlo za sklopitev Boc- β -Ala s primarno aromatsko aminske skupino 1,2-diaminobenzena. Reakcija je dobro potekla, saj je bil izkoristek (**82,48%**) primerljiv (82%, 85%) (33) ali celo boljši (44%) (24) od izkoristkov podobnih reakcij iz literature.

Sinteza spojin **6**, **12**, **15**, in **17** je potekala po predhodni odstranitvi *tert*-butilkarbamatne (Boc) zaščitne skupine. Ker dodatek vode k reakcijski zmesi po končani reakciji ni privedel do izobarjanja spojin, smo spojine **6**, **12**, **15** in **17** iz zmesi DMF/voda ekstrahirali z etilacetatom in očistili s spiranjem z vodo in nasičeno raztopino $NaHCO_3$ ter jih posušili s spiranjem z nasičeno $NaCl$ in sušenjem z Na_2SO_4 . Najboljši izkoristek po končani izolaciji smo izračunali pri sintezi spojine **12** (**89,14%**), medtem ko smo pri sintezi spojin **6** in **17** dobili nižje izkoristke (**42,58%** in **44,78%**). Razlog za nižje izkoristke lahko pripišemo razliki v strukturi karboksilnih kislin, ki smo jih sklapljali s spojino **3**. Po deprotonaciji z bazo aniona nikotinske oziroma izonikotinske kisline, ki smo ju uporabili pri sintezi **6** in **17**, zaradi elektron privlačnega efekta piridinskega dušika težje napade elektrofilni ogljikov atom HOBt. Pri sintezi spojine **12** je bil reagent *N*-Boc-piperidin-4-karboksilna kislina, kjer je anion lažje reagiral, posledično pa je bil izkoristek višji. Poleg tega pa *tert*-

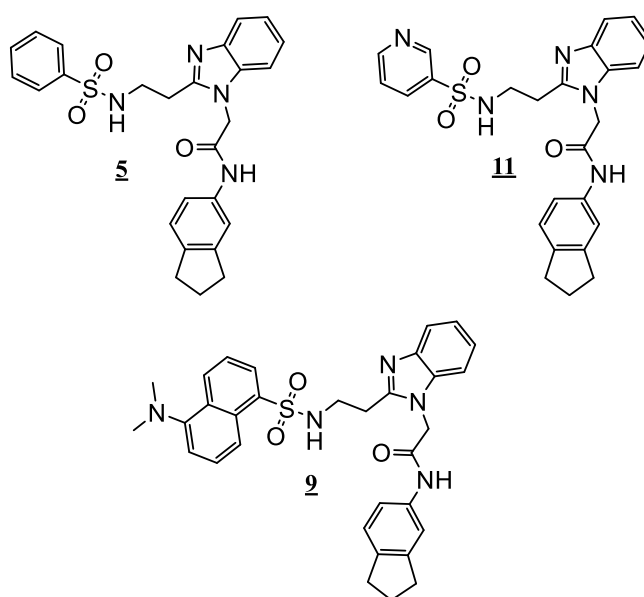
butilkarbamatna zaščita naredi spojino dovolj lipofilno, da ta pri spiranju ne prehaja v vodno fazo, kot se je to zgodilo v primeru izolacije spojin **6** in **17**, kjer je zaradi večje polarnosti (bazični piridinski fragment) nekaj spojine šlo v vodno fazo, kar smo zaznali s pomočjo TLC kromatogramov. Podoben razlog za nižje izkoristke je pri spojini **15** (46,87%), ki se od spojine **6** razlikuje le v tem, da je piridinski fragment za eno metilensko enoto bolj oddaljen od karbonilnega ogljika amidne vezi (Slika 16). V tem primeru smo pri čiščenju spirali z vodno raztopino HCl s pH=4 in ne klasično 1M HCl, da bi se izognili prehodu produkta v vodno fazo (tvorba soli med HCl in dušikom na piridinu) in hkrati očistili bazične komponente reakcijske zmesi, vendar pa je produkt vseeno šel v vodno fazo. Boljši izkoristek v smislu reaktivnosti reakcije bi lahko dosegli z alternativno sintezo, kjer bi karboksilne kisline pripravili v obliki natrijevega karboksilata, nato pa dodali spojino **3**, Hünigovo bazo, HBTU/DMF in reakcijo izvajali 1 uro pri sobni temperaturi (34). Izgubam zaradi uhajanja produkta v vodno fazo pa bi se izognili s povišanjem pH vodne raztopine na 9-10, saj vse spojine v svoji strukturi vsebujejo bazični piridinski fragment.



Slika 16: Strukturne razlike spojin **6**, **12**, **15** in **17**

Spojine **5**, **7**, **9**, **11**, **13**, **16** in **18** so končne spojine, spojino **19** pa smo uporabili kot intermediat pri sintezi spojin **20** in **21**. Pri sintezi je šlo za sklopitev 5-aminoindana s karboksilno kislino po predhodni hidrolizi estra. Reakcije smo izvajali v DMF, kot sklopitveni reagent smo uporabili EDC×HCl, HOBt kot pomožni nukleofil in DMAP kot

katalizator. Po končani reakciji in dodatku vode so se spojine **5**, **9**, **11**, **13**, **18** in **19** izoborile, tako da smo jih lahko odnučali in posušili. Spojine **5**, **9** in **11** vsebujejo sulfonamidno vez, ki izboljša topnost v vodi, najboljši izkoristek pa smo dobili pri sintezi spojine **9** (**81,41%**), ki vsebuje danzilni (5-(dimetilamino)-1-naftalensulfonilni) fragment, saj dovolj poveča lipofilnost, da produkt po dodatku vode ne prehaja v vodno fazo, kot se je to zgodilo v primeru sintez spojin **5** in **11**, kjer so bili izkoristki nižji (**55,57%** in **45,61%**) ravno zaradi tega razloga (s pomočjo TLC vidne lise produktov v nanosu matičnice). Skoraj 10% nižji izkoristek spojine **11** v primerjavi s spojino **5** lahko podobno kot v primeru spojine **17** pripišemo polarnosti piridinskega dela spojine (več produkta je šlo v vodno fazo).



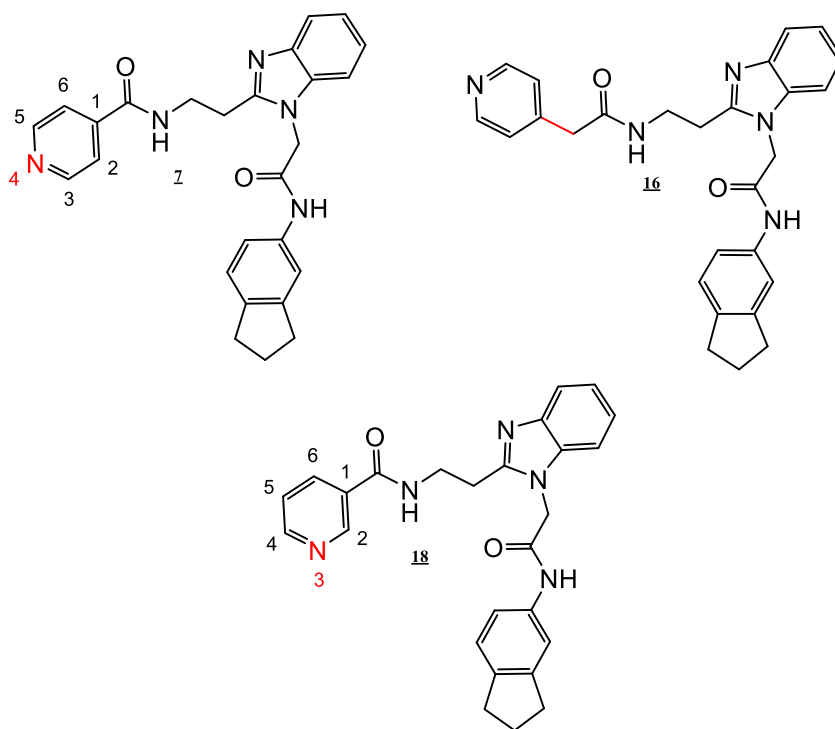
Slika 17: Strukture spojin **5**, **9** in **11**

Izkoristek oborine spojine **13** je bil pod pričakovanji, saj je nekaj produkta prav tako ušlo v vodno fazo. Zato smo matičnico še dodatno ekstrahirali z etilacetatom, ga odparili in ostanek združili z izoborjenim delom. Skupni izkoristek spojine **13** je znašal **41,96%**. Razlog za nekoliko nižji izkoristek spojine **13** je tudi zaradi tvorbe stranskih produktov (vidni 2 lisi na TLC-ju oborine in 2 vrhova pri HPLC, isti stranski produkt se pojavlja tudi pri TLC in HPLC spojine **14**, ki je spojina **13** z odstranjeno Boc zaščito). Tvorbo stranskih produktov lahko argumentiramo tudi s tem, da bi v primeru, da reakcija ni potekla do konca, nezreagirani spojini **12** pri sintezi spojine **14** tudi odstranili Boc zaščito, kar pomeni, da bi se t_r nečistote pri HPLC spojine **13** in **14** razlikoval (ali pa bi dobili dodaten vrh pri HPLC spojine **14**, če se Boc ne bi v celoti odstranil s spojine **12**). Izkoristek spojine **19** je znašal **41,59%** in je bil boljši v primerjavi s sintezo podobnih spojin iz literature (26%) (24). Najnižje izkoristke

Matevž Slivnik:

Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorja NOD2 na osnovi N-alkilbenzamidnega osnovnega ogrodja

smo dobili pri sintezi spojine **18** (**28,44%**). Pri spojini **18** je po vsej verjetnosti prišlo do tvorbe stranskih produktov, ki pa smo jih uspešno odstranili (čistost glede na HPLC kromatogram znaša 100%), prav tako pa produkt ni šel v vodno fazo (na TLC-ju matičnice po nučanju produkt ni bil viden). Spojini **7** in **16** se po dodatku vode nista izoborili. Spojini smo zato ekstrahirali z etilacetatom in spojino **7** očistili s spiranjem z nasičeno raztopino NaHCO₃ (da obdržimo produkt v organski fazi, saj spojina vsebuje bazični piridinski fragment), spojino **16** pa s spiranjem z vodno raztopino HCl s pH=5 (ki je zaradi dodatne metilenske skupine bolj lipofilna). Obe organski fazi smo posušili s spiranjem z nasičeno NaCl in sušenjem z Na₂SO₄, spojino **16** pa smo prelili še z etrom, nastalo oborino odnučali in posušili. Izkoristek spojine **7** je znašal **82,48%**, izkoristek spojine **16** pa **39,19%**, kar lahko pripišemo nastajanju stranskih produktov (na TLC-ju organske faze po čiščenju sta vidni 2 lisi, prav tako pa sta pri HPLC vidna dva vrhova).



Slika 18: Razlika v strukturi spojin **7**, **16** in **18**

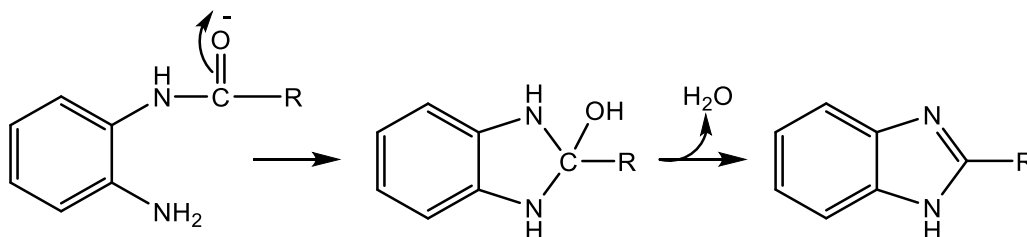
5.4 CIKLIZACIJA MONO N-ACILIRANEGA 1,2-DIAMINO BENZENA

Ciklizacijo smo izvajali pri sintezi spojine **2**, ko smo iz mono N-aciliranega 1,2-diaminobenzena dobili 2-substituiran benzimidazol. Gre za reakcijo nukleofilne adicije z eliminacijo, ki poteka pri nekoliko višji temperaturi od tališča izhodne spojine (Slika 19).

Matevž Slivnik:

Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorja NOD2 na osnovi N-alkilbenzamidnega osnovnega ogrodja

Reakcijo bi lahko izboljšali, če bi jo izvedli v dušikovi atmosferi, saj se s tem izognemo možnosti oksidacije. Tudi diacilirani derivati 1,2-diaminobenzena lahko ciklizirajo do benzimidazolov, vendar pa je za to potrebna višja temperatura (35).



Slika 19: Ciklizacija mono N-aciliranih 1,2-diaminobenzenov (prirejeno po (35))

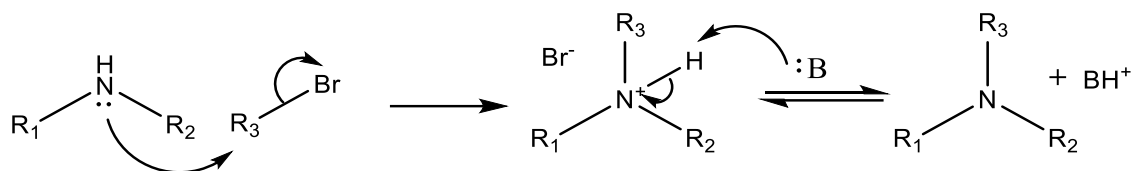
Za to reakcijo smo se odločili na podlagi predhodnega raziskovalnega dela, saj je bila reakcija enostavna in hitra, poleg tega pa smo v prejšnji stopnji sintetizirali ravno mono N-aciliran 1,2-diaminobenzen (spojina **1**) (33). Reakcijo smo izvajali v AcOH pri temperaturi 80 °C. Po končani reakciji smo odpareli topilo, preostanek raztopili v diklorometanu, spojino pa očistili s spiranjem z nasičeno raztopino NaHCO₃, vodo in organsko fazo smo posušili s spiranjem z nasičeno NaCl in sušenjem z Na₂SO₄. Izkoristek sinteze spojine **2** je bil **86,18%** in je primerljiv z izkoristki raziskovalnega dela na podlagi katerega smo reakcijo izvajali. Alternativno je mogoče 2-substituirane benzimidazole pripraviti tudi direktno iz 1,2-diaminobenzena, če kot substituent uporabimo monoprotično kislino v 4M HCl pod refluxom (35). V našem primeru sicer imamo monoprotično kislino (Boc-β-Ala), vendar pa bi pri tem načinu sinteze zaradi izvajanja reakcije v 4M HCl, prišlo do kisle hidrolize Boc zaščite, zato se je ne bi mogli poslužiti.

5.5 ALKILIRANJE OBROČNEGA DUŠIKA NA BENZIMIDAZOLNEM SKELETU

Pri sintezi spojine **3** smo alkilirali obročni dušikov atom benzimidazola. Gre za nukleofilno substitucijo, ki poteka po S_N2 mehanizmu (Slika 20). Kot elektrofil smo uporabili etil 2-bromacetat, kot bazo pa K₂CO₃. TBAI je služil kot katalizator faznega prenosa, ki olajša prehod reaktanta iz ene faze v drugo (36,37).

Matevž Slivnik:

Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorja NOD2 na osnovi N-alkilbenzamidnega osnovnega ogrodja



Slika 20: Mehanizem N-alkiliranja sekundarnih amidov z alkil halidi ob prisotnosti baze (prirejeno po (36))

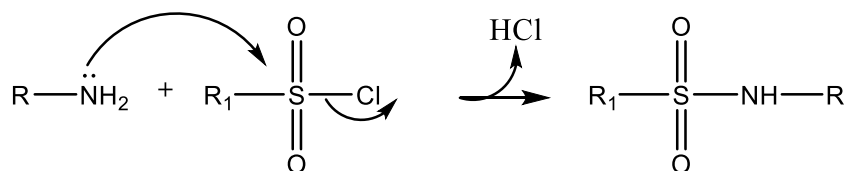
Sintezo smo izvajali v acetonitrilu, pri čemer smo najprej dodali spojino **2** in bazo ter mešali 15 min, da smo aktivirali obročni dušik, šele nato pa smo dodali etil 2-bromoacetat in TBAI, zmes segreli na 70 °C in reakcijo izvajali preko noči. Po končani reakciji, spiranju in izolaciji spojine smo po pregledu TLC-ja organske faze ugotovili, da spojina ni čista, zato smo jo dodatno očistili s kolonsko kromatografijo (mobilni fazi - CH₂Cl₂ : MeOH = 30 : 1 in CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1). Končni izkoristek spojine **3** je znašal **54,09%** in je slabši v primerjavo s predhodno raziskovalno nalogo (98%) (33). Manjši izkoristek je posledica nastanka stranskih produktov (vidni na TLC organske faze) ter izgub pri čiščenju s kolonsko kromatografijo (določene frakcije, ki smo jih zaradi nezadostne čistote zavrgli, so vsebovale tudi naš produkt). Izkoristek bi lahko izboljšali z alternativno sintezo, kjer bi reakcijo izvajali v 50% mediju NaOH-SDS (angl. sodium dodecyl sulfate – natrijev dodecilsulfat), zadostovala pa bi sobna temperatura, saj je etil-2-bromoacetat reaktiven alkil halid. Pozorni bi morali biti, da ga dodamo 1 ekv., saj bi dodatek 2 ekv. lahko povzročil odprtje benzimidazolnega obroča (38).

5.6 TVORBA SULFONAMIDNE VEZI

Sulfonamidno vez smo tvorili pri spojinah **4**, **8**, in **10**, kjer smo izvajali sklopitev sulfonil kloridov s primarno aaminsko skupino, nastalo po odstranitvi Boc zaščite na spojini **3**. Sulfonil kloridi so že sami po sebi dovolj reaktivni, zato pri teh reakcijah ni bila potrebna uporaba sklopitvenih reagentov, uporabili smo le trietilamin kot bazo. Ker so vsi reagenti topni v THF, je bil ta naša izbira topila, saj je v primerjavi z DMF veliko bolj hlapen in ga po končani reakciji z lahkoto odparimo. Pri reakciji po napadu dušika kot nukleofila pride do tvorbe pentavalentnega intermedata, ki je zelo nestabilen. Nato se odcepi še kloridni anion in nastane sulfonamidna vez (Slika 21) (39).

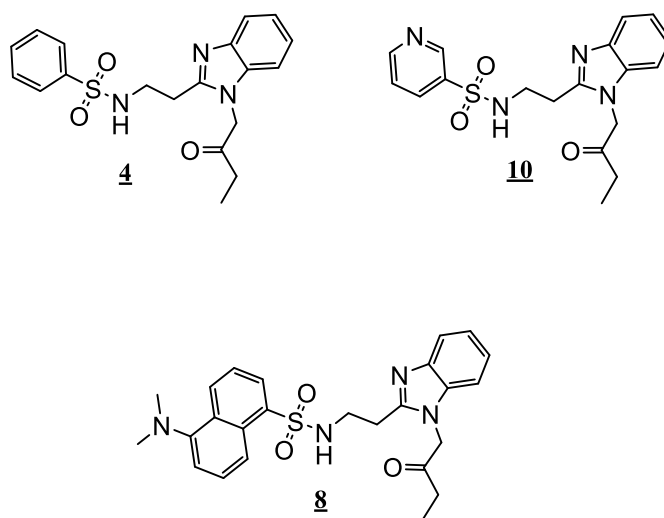
Matevž Slivnik:

Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorja NOD2 na osnovi N-alkilbenzamidnega osnovnega ogrodja



Slika 21: Mehanizem reakcije med sulfonyl kloridom in primarnim aminom (prirejeno po (39))

Po končani reakciji smo odpareli topilo in vse spojine raztopili v diklorometanu. Spojino **4**, kjer gre za smo očistili s spiranjem z vodo in vodno raztopino HCl s pH=5, spojini **8** in **10** pa s spiranjem z vodno raztopino NaOH s pH=9. Spojina **8** vsebuje piridinski fragment, spojina **10** pa danzilni fragment, s spiranjem z bazično vodno raztopino pa smo se izognili protonaciji bazičnih dušikov na teh fragmentih. Strategija se je izkazala kot dobra, saj smo pri spojinah **8** (73,62%) in **10** (88,59%) imeli višje izkoristke, ker produkt ni šel v vodno fazo, kot se je to zgodilo pri izolaciji spojine **4**, kar je posledično pomenilo nižji izkoristek 49,67%. Pri spojinah **4** je bilo nekaj produkta vidnega na TLC-ju vodne faze, medtem ko pri spojinah **8** in **10** ni bilo vidnega produkta v vodni fazi po čiščenju. Večji izkoristek spojine **4** bi dosegli, če bi spirali samo z vodno raztopino HCl s pH=5, saj je sulfonamidni vodik v osnovi kisel (Slika 22).

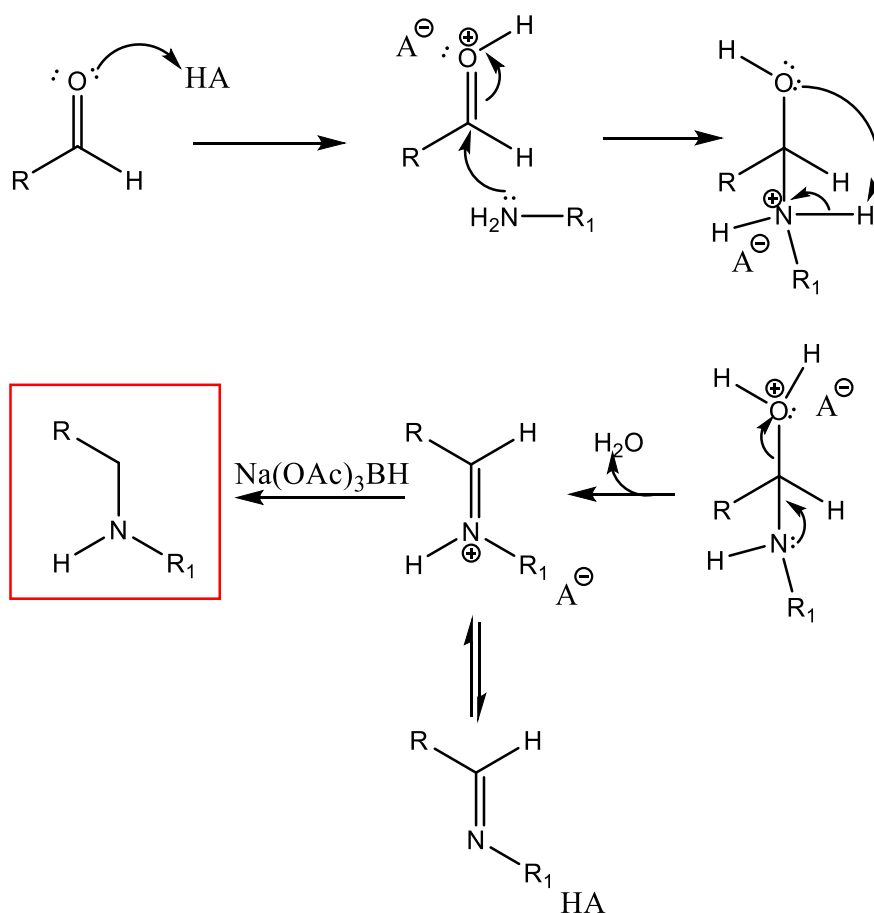


Slika 22: Strukture spojin **4**, **8** in **10**

5.7 REDUKTIVNO AMINIRANJE ALDEHIDA

Reduktivnega aminiranja aldehydov smo se poslužili pri sintezi končnih spojin **20** in **21** po odstranitvi Boc zaščite iz aminske skupine spojine **19**. Reakcija med aldehydom in primarnim aminom vodi do nastanka imina, ki se v kislih pogojih protonira do iminijevega iona. Po

dotatku reducenta se iminijev ion reducira in nastane nov amin (Slika 23) (40). Kot reducent bi lahko izbrali $\text{Na}(\text{CN})_3\text{BH}$, ki sicer ne reducira aldehydov in ketonov, vendar pa je reagent zelo toksičen, prav tako pa so toksični njegovi stranski produkti HCN in NaCN. Zato smo kot reducent izbrali $\text{Na}(\text{OAc})_3\text{BH}$, ki lahko reducira tudi aldehyde, a smo se temu izognili z dodatkom reducenta po 2 urah reakcije med aldehydom in aminom, poleg tega pa smo reakcijo izvajali v 1,2-dikloroetanu, saj reakcije v 1,2-dikloroetanu potekajo hitreje kot v THF, dodatek AcOH pa je še dodatno pospešil reakcijo (41). Reakcijo smo izvajali v argonovi atmosferi, da smo preprečili možnost oksidacije.



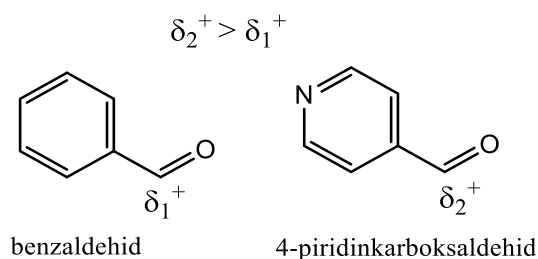
Slika 23: Mehanizem reduktivnega aminiranja aldehyda s primarnim aminom in uporabo $\text{Na}(\text{OAc})_3$ kot reducenta (prirejeno po (40))

Pri spojini **20** je bil po čiščenju še vedno prisoten benzaldehid, zato smo ostanek v bučki prelili z etrom, v katerem je benzaldehid veliko bolje topen, in pustili preko noči. Oborino smo odnučali in posušili ter dobili čisto spojino **20**. Izkoristka reakcij sta znašala **71,43%** za spojino **20** in **59,02%** za spojino **21**. Reakcije načeloma potekajo z visokimi izkoristki. Razlog za nekoliko nižje izkoristke pri spojini **20** je to, da reakcija do nastanka imina pri

Matevž Slivnik:

Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorja NOD2 na osnovi N-alkilbenzamidnega osnovnega ogrodja

spojini **20** ni potekla do konca (v reakcijski zmesi je bil prisoten še benzaldehid, izhodno molsko razmerje pa je bilo 1:1). Eden od razlogov za še nižje izkoristke pri spojini **21** je lahko ta, da reakcija med aminom in aldehydom ni potekla do konca, po dodatku reducenta pa se je reduciral tudi 4-piridinkarboksaldehid. Drugi razlog pa je lahko v večji reaktivnosti spojine, saj elektronegativni učinek obročnega piridinskega dušika 4-piridinkarboksaldehida poveča elektrofilnost karbonilnega ogljika aldehyda (Slika 24) in s tem olajša nukleofilni napad amina. Pri reakcijah s primarnimi amini lahko pogosto pride do tvorbe dialkiliranih stranskih produktov. Temu bi se lahko izognili z rahlim presežkom amina (do 5%) in izvajanju reakcije brez dodatka AcOH kot katalizatorja, saj lahko aldehydi za razliko od ketonov zreagirajo do iminov že brez dodatka AcOH (41).

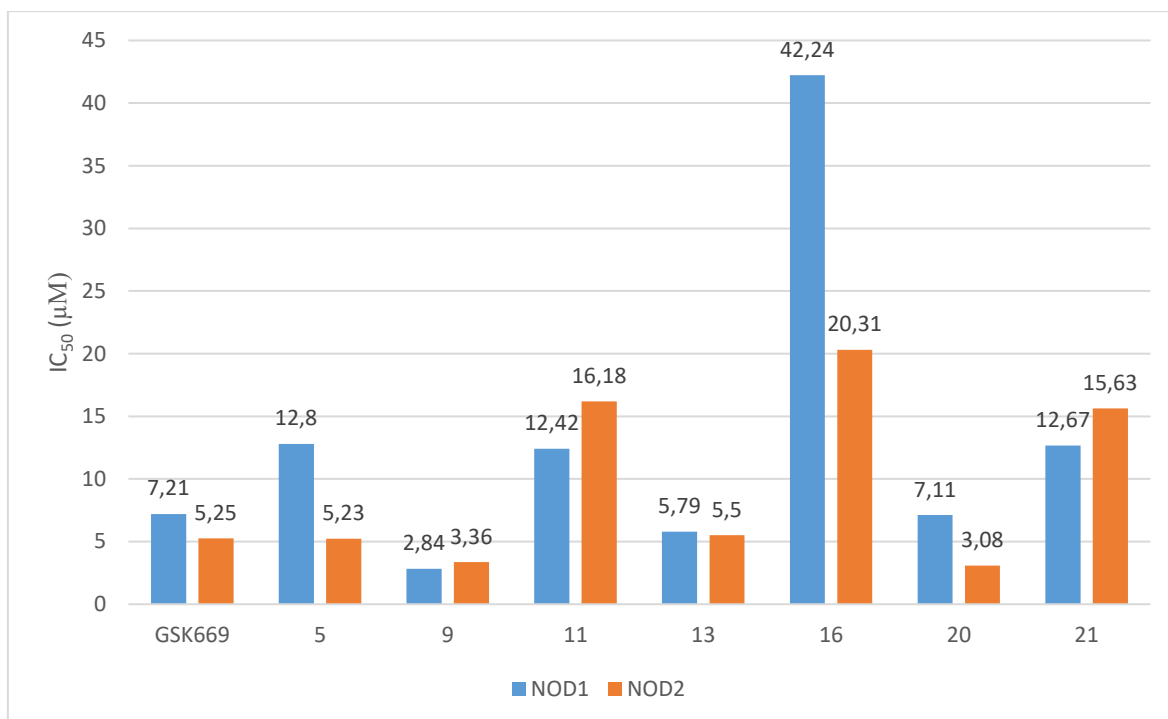


Slika 24: Razlika v strukturi aldehydnih reagentov pri sintezi spojin **20** in **21**

5.8 BIOLOŠKO TESTIRANJE

Končne spojine smo dali ovrednotiti na Katedro za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo. Izvedli so teste citotoksičnosti in ovrednotili antagonistično delovanje na receptorjih NOD1 in NOD2. Testiranja so izvedli na celičnih linijah HEK-Blue™ NOD1 in NOD2. Teste citotoksičnosti so izvedli pri maksimalni koncentraciji 20 μM , kot potencialno citotoksično pa so pri tej koncentraciji klasificirali le spojino **20** (zmanjšanje relativne metabolne aktivnosti 40% (NOD1) in 30% (NOD2) glede na kontrolo). Za ovrednotenje antagonističnega delovanja pa so najprej opravili presejalni test pri koncentraciji 20 μM . Kot validiran agonist NOD2 so uporabili MDP, kot agonist NOD1 pa C12-iE-DAP. Negativno kontrolo so predstavljale netretirane celice (dodan je bil le gojitveni medij). Po presejalnem testu, kjer so celice tretirali s končno koncentracijo 20 μM , so izločili spojine **7**, **14** in **18**, saj že ta koncentracija ni pokazala antagonističnega delovanja. Spojinam **5**, **9**, **11**, **13**, **16** in **21**, ki so izkazale antagonistično delovanje, pa so nato določili še vrednosti IC_{50} , in sicer so

analogen test izvedli še pri večjih koncentracijah [μM]: 40, 30, 20, 10, 5, 2.5 in 1.25, za spojino **20** pa so zaradi izkazane citotoksičnosti pri višjih koncentracijah izbrali nižje delovne koncentracije [μM]: 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125.



Graf 1: Vrednosti IC₅₀ NOD1/NOD2 spojine vodnice (GSK669) in novih antagonistov NOD2 (prirejeno po (42))

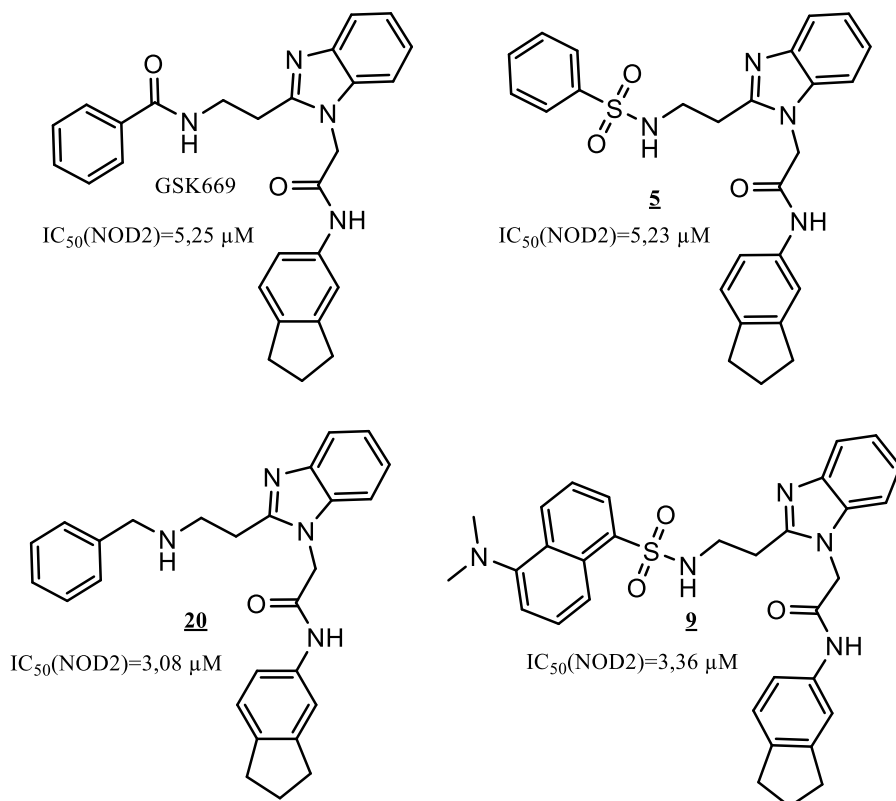
Iz rezultatov lahko napravimo nekaj zaključkov glede odnosa med strukturo in delovanjem naših končnih spojin. Uvedba arilsulfonilnega dela na mesto benzoilnega dela spojine vodnice pri spojini **5** (IC₅₀=5,23 μM) in **9** (IC₅₀=3,36 μM) je nekoliko izboljšala NOD2 antagonistično aktivnost v primerjavi z GSK669 (IC₅₀=5,25 μM). Po drugi strani pa je uvedba 3-piridilsulfonilnega dela pri spojini **11** (IC₅₀=16,18 μM) za več kot 3 \times zmanjšala NOD2 antagonistično aktivnost. Uvedba 4-piridoilnega fragmenta v primeru spojine **7** in 3-piridoilnega fragmenta pri spojini **18** je povzročila popolno izgubo NOD2 antagonistične aktivnosti. Spojina **16** (IC₅₀=20,31 μM), ki je analog spojine **7**, le da je 4-piridoilni del za 1 metilensko skupino bolj oddaljen od karbonilnega ogljika amidne vezi je izkazala približno 4 \times slabšo NOD2 antagonistično aktivnost v primerjavi z GSK669 (IC₅₀=5,25 μM). Sklepamo lahko, da tako zamenjava benzoilnega dela spojine vodnice z benzilnim, kot tudi uvedba večjega arilnega substituenta na mesto benzoilnega dela spojine vodnice ugodno vplivata na NOD2 antagonistično delovanje. Po drugi strani pa zamenjava benzoilnega segmenta s piridoilnim (obročni dušik na mestu 3 ali 4) zmanjša ali vodi do izgube NOD2

antagonistične aktivnosti. Spojina **13** ($IC_{50}=5,5 \mu M$), ki namesto fenilnega obroča vsebuje N-Boc-piperidinski del, je obdržala NOD2 antagonistično delovanje, medtem ko piperidinski analog brez Boc zaščite, spojina **14**, ne izkazuje nikakršnih NOD2 antagonističnih lastnosti. Iz tega lahko sklepamo, da je bazični center na mestu 4 neugoden, saj tudi ciklični alifatski prosti dušik na mestu 4 podobno kot aromatski dušik pri piridoilni zamenjavi (spojina **7**) neugodno vpliva na NOD2 antagonistično delovanje. Na tem mestu morda prihaja do odboja z bazičnimi aminokislinskimi ostanki (R803, R857 – arginin ali K969 – lizin) receptorja NOD2. Kot najmočnejši antagonist se je izkazala spojina **20** ($IC_{50}=3,08 \mu M$), ki kaže nekoliko izboljšano NOD2 antagonistično aktivnost v primerjavi s spojino vodnico ($IC_{50}=5,25 \mu M$). V tem primeru smo benzoilni spojine GSK669 nadomestili z benzilnim. Ta pristop pa se ni izkazal za dobrega v primeru spojine **21** ($IC_{50}=5,25 \mu M$), ki je analog spojine **20** vendar namesto benzilnega vsebuje 4-piridilmetilni fragment in izkazuje okoli 3x slabšo NOD2 antagonistično aktivnost v primerjavi z GSK669. Tudi v tem primeru je razlog za slabše antagonistično delovanje najverjetneje prisotnost bazičnega centra (aromatski dušik na mestu 4).

Nobena od spojin, vključno s spojino vodnico, ne kaže posebne selektivnosti za receptor NOD2. Pravzaprav izkazuje večina spojin prepoznanih kot NOD2 antagonistov tudi primerljivo NOD1 antagonistično aktivnost. Rahlo selektivnost za receptor NOD2 lahko opazimo le pri spojinah **5** ($2,4\times$ selektivnost) in **20** ($2,3\times$ selektivnost).

Matevž Slivnik:

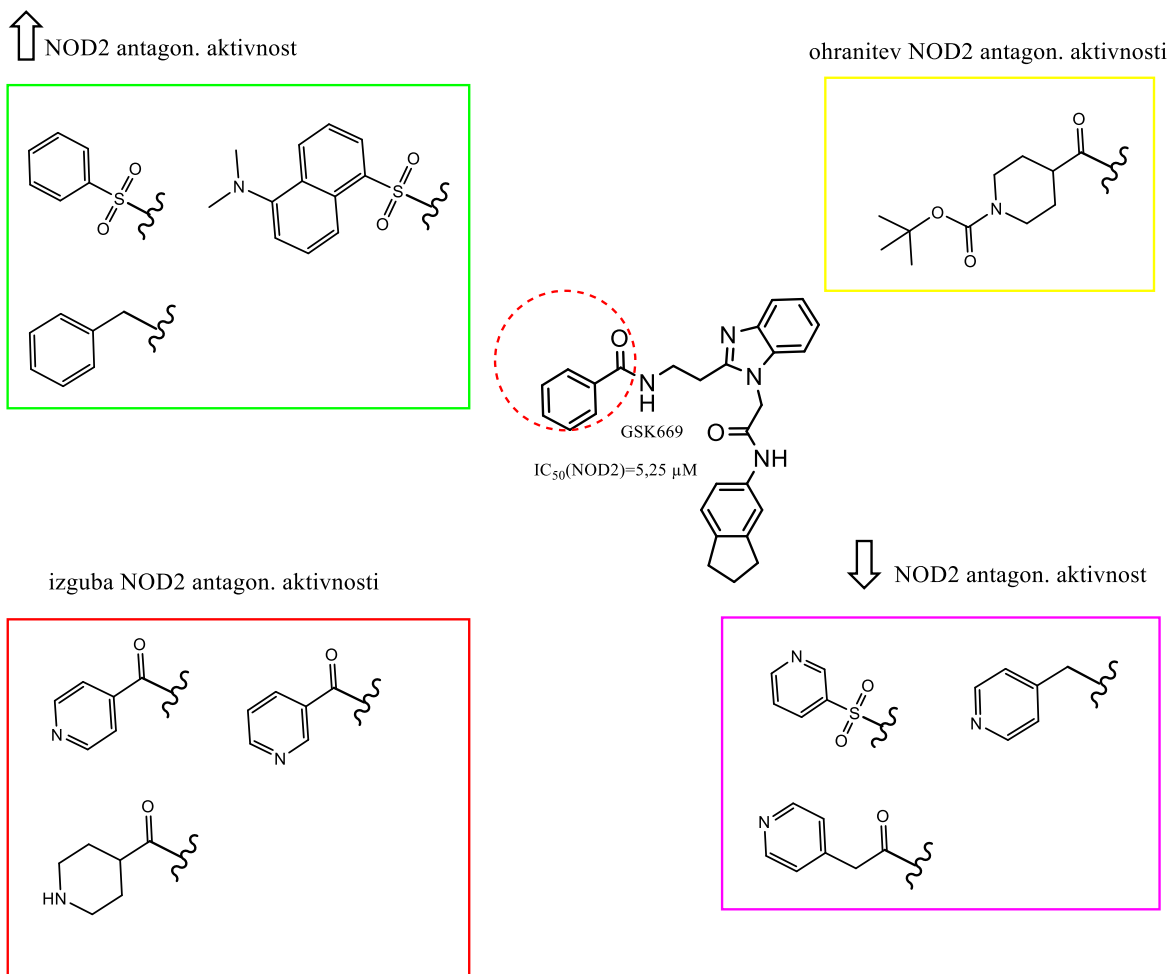
Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorja NOD2 na osnovi N-alkilbenzamidnega osnovnega ogrodja



Slika 25: Novi antagonisti NOD2, ki so izkazali boljšo antagonistično aktivnost kot spojina vodnica

Matevž Slivnik:

Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorja NOD2 na osnovi N-alkilbenzamidnega osnovnega ogrodja



Slika 26: SAR novih antagonistov NOD2

Glede na ugotovljeno lahko zaključimo, da smo rahlo izboljšali NOD2 antagonistično aktivnost naše spojine vodnice. To smo dosegli z bioizosterno zamenjavo amidne vezi spojine vodnice za sulfonamidno ter z zamenjavo benzoilnega dela spojine vodnice z benzilnim ali večjim arilnim substituentom, ki ni vseboval obročnega dušika (danzilni fragment). Glede na to da danzilni fragment tudi vsebuje bazični center, pa je možno, da ta zaradi velikosti fragmenta in poziciji na mestu 5 ne pride v stik z bazičnimi ostanki temveč se veže s kislim aminokislinskim ostankom (E939 – glutaminska kislina). Presenetljivo ima veliko NOD2 antagonistov primerljivo antagonistično delovanje na NOD1, kar je v nasprotju z ugotovitvami študije, ki jo je izvedel Rickard s sodelavci, kjer so benzimidazol diamide domnevno identificirali kot selektivne antagoniste NOD2 (24). Res pa je, da za selektivnost niso predstavili nedvoumnih dokazov.

6 SKLEPI

- Sintetizirali smo 10 novih antagonistov NOD2, izmed katerih so trije pokazali izboljšano NOD2 antagonistično aktivnost v primerjavi s spojino vodnico (spojine **5**, **9** in **20**).
- Prisotnost bazičnega centra pri spojinah **7**, **14** in **18** vodi v izgubo pri spojinah **11**, **16** in **21** pa v zmanjšanje NOD2 antagonistične aktivnosti.
- Uvedba benzilnega na mesto benzoilnega dela spojine vodnice vodi v izboljšanje NOD2 antagonistične aktivnosti (spojina **20**). Ta spojina se je tudi izkazala kot najmočnejši antagonist NOD2 iz naše serije spojin.
- Večina identificiranih antagonistov NOD2 izkazuje primerljivo antagonistično aktivnost tudi na receptor NOD1. Za potencialno izboljšanje selektivnosti bo zato potrebno še nadalje raziskati njihov kemijski prostor. Predvsem bi bilo zdaj, ko je na voljo tudi kristalna struktura receptorja NOD2, pomembno ugotoviti mesto vezave na receptor NOD1/NOD2, s čimer bo omogočeno strukturno podprto načrtovanje.
- Ker se zadnje čase vse več raziskuje uporaba dvojnih NOD1/NOD2 antagonistov kot adjuvansov pri kemoterapiji, bi bilo smiselno benzimidazol diamide proučiti tudi na tem področju.

7 VIRI IN LITERATURA

1. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *The Lancet* 2001; 357(9270): 1777–1789.
2. Vozelj M. *Temelji Imunologije*. Ljubljana: DZS, 2000.
3. Alberts B ed. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York: Garland Science, 2002.
4. The innate and adaptive immune systems. [Na spletu]. Dostopno na: http://missinglink.ucsf.edu/lm/immunology_module/prologue/objectives/obj02.html. [Pridobljeno: 11-feb-2018].
5. Innate Immunity. [Na spletu]. Dostopno na: <http://www.biology-pages.info/I/Innate.html#cells>. [Pridobljeno: 11-feb-2018].
6. Monie P. Tom. *The Innate Immune System: A Compositional and Functional Perspective*. Oxford: Academic Press, 2017.
7. British Society for Immunology. Pattern recognition receptors. [Na spletu]. Dostopno na: <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/receptors-and-molecules/pattern-recognition-receptors>. [Pridobljeno: 11-feb-2018].
8. Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology* 2015; 16(4): 343–353.
9. Kim YK, Shin J-S, Nahm MH. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. *Yonsei Medical Journal* 2016; 57(1): 5.
10. Jakopin Ž. Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) inhibitors: a rational approach toward inhibition of NOD signaling pathway. *Journal of Medicinal Chemistry* 2014; 57(16): 6897–6918.
11. Ting JP-Y, Lovering RC, Alnemri ES, Bertin J, Boss JM, Davis BK, Flavell RA, Girardin SE, Godzik A, Harton JA, Hoffman HM, Hugot J-P, Inohara N, Mackenzie A, Maltais LJ, Nunez G, Ogura Y, Otten LA, Philpott D, Reed JC, Reith W, Schreiber S, et al. The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity* 2008; 28(3): 285–287.
12. Shigeoka AA, Kambo A, Mathison JC, King AJ, Hall WF, da Silva Correia J, Ulevitch RJ, McKay DB. Nod1 and nod2 are expressed in human and murine renal tubular epithelial cells and participate in renal ischemia reperfusion injury. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 2010; 184(5): 2297–2304.
13. Fujimoto Y, Pradipta AR, Inohara N, Fukase K. Peptidoglycan as Nod1 ligand; fragment structures in the environment, chemical synthesis, and their innate immunostimulation. *Natural Product Reports* 2012; 29(5): 568.

14. Ogawa C, Liu Y-J, Kobayashi KS. Muramyl dipeptide and its derivatives: peptide adjuvant in immunological disorders and cancer therapy. *Current Bioactive Compounds* 2011; 7(3): 180–197.
15. Moreira LO, Zamboni DS. NOD1 and NOD2 Signaling in Infection and Inflammation. *Frontiers in Immunology* 2012; 3.
16. Nakamura N, Lill JR, Phung Q, Jiang Z, Bakalarski C, de Mazière A, Klumperman J, Schlatter M, Delamarre L, Mellman I. Endosomes are specialized platforms for bacterial sensing and NOD2 signalling. *Nature* 2014; 509(7499): 240–244.
17. Negroni A, Pierdomenico M, Cucchiara S, Stronati L. NOD2 and inflammation: current insights. *Journal of Inflammation Research* 2018; Volume 11: 49–60.
18. Kestra AM, Bäuml AJ. Detection of enteric pathogens by the nodosome. *Trends in immunology* 2014; 35(3): 123–130.
19. Shaw MH, Kamada N, Warner N, Kim Y-G, Nuñez G. The ever-expanding function of NOD2: autophagy, viral recognition, and T cell activation. *Trends in immunology* 2011; 32(2): 73–79.
20. Genetics Home Reference - NIH. NOD2 gene. [Na spletu]. Dostopno na: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/NOD2#>. [Pridobljeno: 18-jul-2018].
21. Geddes K, Magalhães JG, Girardin SE. Unleashing the therapeutic potential of NOD-like receptors. *Nature Reviews. Drug Discovery* 2009; 8(6): 465–479.
22. Wang S, Yang J, Li X, Liu Z, Wu Y, Si G, Tao Y, Zhao N, Hu X, Ma Y, Liu G. Discovery of 1,4-Benzodiazepine-2,5-dione (BZD) Derivatives as Dual Nucleotide Binding Oligomerization Domain Containing 1/2 (NOD1/NOD2) Antagonists Sensitizing Paclitaxel (PTX) To Suppress Lewis Lung Carcinoma (LLC) Growth in Vivo. *Journal of Medicinal Chemistry* 2017; 60(12): 5162–5192.
23. Dong Y, Wang S, Wang C, Li Z, Ma Y, Liu G. Antagonizing NOD2 Signaling with Conjugates of Paclitaxel and Muramyl Dipeptide Derivatives Sensitizes Paclitaxel Therapy and Significantly Prevents Tumor Metastasis. *Journal of Medicinal Chemistry* 2017; 60(3): 1219–1224.
24. Rickard DJ, Sehon CA, Kasparcova V, Kallal LA, Zeng X, Montoute MN, Chordia T, Poore DD, Li H, Wu Z, Eidam PM, Haile PA, Yu J, Emery JG, Marquis RW, Gough PJ, Bertin J. Identification of benzimidazole diamides as selective inhibitors of the nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2) signaling pathway. *PloS One* 2013; 8(8): e69619.
25. Li X, Yu J, Xu S, Wang N, Yang H, Yan Z, Cheng G, Liu G. Chemical conjugation of muramyl dipeptide and paclitaxel to explore the combination of immunotherapy and chemotherapy for cancer. *Glycoconjugate Journal* 2008; 25(5): 415–425.
26. Boc Deprotection Mechanism - HCl. [Na spletu]. Dostopno na: http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_HCl_Mech.htm. [Pridobljeno: 11-avg-2018].

27. Ashworth IW, Cox BG, Meyrick B. Kinetics and Mechanism of N-Boc Cleavage: Evidence of a Second-Order Dependence upon Acid Concentration. *The Journal of Organic Chemistry* 2010; 75(23): 8117–8125.
28. Lin LS, Lanza T, de Laszlo SE, Truong Q, Kamenecka T, Hagmann WK. Deprotection of N-tert-butoxycarbonyl (Boc) groups in the presence of tert-butyl esters. *Tetrahedron Letters* 2000; 41(36): 7013–7016.
29. Ch20: Hydrolysis of Esters. [Na spletu]. Dostopno na: <http://www.chem.ucalgary.ca/courses/350/Carey5th/Ch20/ch20-3-3-1.html>. [Pridobljeno: 11-avg-2018].
30. Valeur E, Bradley M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chemical Society Reviews* 2009; 38(2): 606–631.
31. A. G. N. Montalbetti C, Falque V. Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *Tetrahedron* 2005; 61: 10827–10852.
32. Al-Warhi TI, Al-Hazimi HMA, El-Faham A. Recent development in peptide coupling reagents. *Journal of Saudi Chemical Society* 2012; 16(2): 97–116.
33. Frank A. Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorjev NOD2 z benzimidazolnim skeletom. Magistrska naloga. Univerza v Ljubljani. Ljubljana, 2016.
34. Goodreid JD, Duspara PA, Bosch C, Batey RA. Amidation Reactions from the Direct Coupling of Metal Carboxylate Salts with Amines. *The Journal of Organic Chemistry* 2014; 79(3): 943–954.
35. Salahuddin, Shaharyar M, Mazumder A. Benzimidazoles: A biologically active compounds. *Arabian Journal of Chemistry* 2017; 10: S157–S173.
36. Ch22: Alkylation of Amines. [Na spletu]. Dostopno na: <http://www.chem.ucalgary.ca/courses/350/Carey5th/Ch22/ch22-3-1.html>. [Pridobljeno: 10-avg-2018].
37. Hashimoto T, Maruoka K. The Basic Principle of Phase-Transfer Catalysis and Some Mechanistic Aspects. Pp. 1–8 in 2008.
38. Chakraborty A, Debnath S, Ghosh T, Maiti DK, Majumdar S. An efficient strategy for N-alkylation of benzimidazoles/imidazoles in SDS-aqueous basic medium and N-alkylation induced ring opening of benzimidazoles. *Tetrahedron* 2018.
39. Hermanson GT. Chapter 3 - The Reactions of Bioconjugation. Pp. 229–258 in Hermanson GT (ed). *Bioconjugate Techniques (Third Edition)*. Boston: Academic Press, 2013.
40. Master Organic Chemistry. Reductive Amination. [Na spletu]. Dostopno na: <https://www.masterorganicchemistry.com/2017/09/01/reductive-amination-post/#one>. [Pridobljeno: 11-avg-2018].

Matevž Slivnik:

Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorja NOD2 na osnovi N-alkilbenzamidnega osnovnega ogrodja

41. Abdel-Magid AF, Carson KG, Harris BD, Maryanoff CA, Shah RD. Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures(1). *The Journal of Organic Chemistry* 1996; 61(11): 3849–3862.
42. Zinterl A. Biological evaluation of NOD1/2 antagonists based on a substituted benzimidazole scaffold. Bachelor Thesis. Fachhochschule Joanneum, 2018.