

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŽAN TOPLAK

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŽAN TOPLAK

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA PIRAZOL[3,4-*D*]PIRIMIDINOV KOT
POTENCIALNIH ANTAGONISTOV RECEPTORJA NOD2 IN
BENZOTIAZOLPIROLAMIDOV KOT ZAVIRALCEV DNA-GIRAZE**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF PYRAZOLO[3,4-*D*]PYRIMIDINES AS
POTENTIAL NOD2 RECEPTOR ANTAGONISTS AND
BENZOTHIAZOLPYRROLAMIDES AS DNA GYRASE INHIBITORS**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljal na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo, pod mentorstvomizr. prof. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Zahvala

Zahvaljujem seizr. prof. dr. Tihomirju Tomašiču, mag. farm., za trud, prijaznost, potrpežljivost ter veliko posredovanega novega znanja in izkušenj pri nastajanju magistrske naloge. Zahvalil bi se tudi preostalim sodelavcem Katedre za farmacevtsko kemijo za pomoč in mnoge nasvete.

Prav tako bi se rad zahvalil družini in prijateljem za vso podporo in spodbudo tekom celotnega študija. Posebna zahvala gre tudi tebi, Laura, za vso pomoč in zaupanje vame.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvomizr. prof. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm.

Žan Toplak

Ljubljana, 2018

Predsednik komisije:izr. prof. dr. Matjaž Jeras

Mentor:izr. prof. dr. Tihomir Tomašič

Članica:asist. dr. Barbara Zorec

Vsebina

Vsebina.....	I
Povzetek	III
Abstract.....	IV
Seznam okrajšav	V
1. Uvod.....	1
1.1 NOD 2.....	1
1.1.1 Imunski sistem.....	1
1.1.2 NOD-u podobni receptorji (NLRs).....	2
1.1.3 NOD1 in NOD2.....	3
1.1.4 Bolezni povezane z receptorji NOD	4
1.1.5 Inhibicija NOD2	5
1.1.6 ATP-vezavno mesto NOD2.....	6
1.2 DNA-giraza	8
1.2.1 Protibakterijske učinkovine in bakterijska rezistenca	8
1.2.2 DNA in topoizomeraze	8
1.2.3 DNA-giraza	9
2. Načrt dela	14
2.1 NOD2.....	14
2.2 DNA-giraza	14
3. Materiali in metode	16
3.1 Materiali.....	16
3.2 Kromatografske metode	16
3.2.1 Tankoplastna kromatografija – TLC	16
3.2.2 "Flash" kolonska kromatografija	16
3.3 Spektroskopske metode	16
3.3.1 Jedrska magnetna resonanca (NMR).....	16
3.3.2 Masna spektrometrija	17
3.4 Določanje talilnega intervala	17
3.5 Računalniška oprema.....	17
3.5.1 Nomenklatura in risanje spojin.....	17

3.5.2	Virtualno rešetanje in sidranje spojin	17
3.5.3	Ostalo.....	17
3.6	Računalniško načrtovanje NOD2 inhibitorjev	17
4.	Ekperimentalni del.....	20
4.1	Reakcijska shema inhibitorjev NOD2	20
4.2	Reakcijske sheme inhibitorjev DNA-giraze	22
4.3	Sintezni postopki	25
5.	Rezultati in razprava	35
5.1	Komentar molekulskega modeliranja inhibitorjev NOD2.....	35
5.1.1	Knjižnica fragmentov	35
5.1.2	Ciljana knjižnica.....	38
5.1.3	Sintetizirane spojine	46
5.2	Komentar sinteznih postopkov	49
5.2.1	Zaščita aminske skupine z Boc ₂ O	49
5.2.2	Odstranitev zaščitne skupine Boc.....	49
5.2.3	Tvorba amida s sklopitvenim reagentom	50
5.2.4	Reduktivno aminiranje	51
5.2.5	Ciklizacija metil 2-amino-5-hidroksibenzo[<i>d</i>]tiazol-6-karboksilata	51
5.2.6	Uvedba <i>tert</i> -butildimetilsililne zaščitne skupine (TBDMS).....	53
5.2.7	Fischer-jeva esterifikacija (tvorba metilnega estra).....	53
5.2.8	Uvedba acetilne zaščitne skupine	54
5.2.9	Hidroliza estra.....	54
5.2.10	Tvorba aril aminov	55
6.	Sklep.....	56
7.	Literatura	57

Povzetek

Imunski sistem predstavlja zapleteno obrambo človeškega telesa pred različnimi nevarnostmi. Del tega sistema so tudi receptorji NOD2 (nukleotid vezavna domena oligomerizacije 2), ki prepoznavajo muramilni dipeptidni fragment peptidoglikana, ki sestavlja bakterijsko celično steno. S to prepoznavo pride do aktivacije signalnih poti, ki so del prirojenega imunskega odziva. Pri prekomerni aktivnosti receptorjev NOD2 pa lahko pride tudi do pojava različnih bolezni, zato je smiselno razviti inhibitorje teh receptorjev. Iskanja potencialnih inhibitorjev receptorja NOD2 smo se lotili tudi v okviru te magistrske naloge. Z računalniško podprtim načrtovanjem smo iskali spojine vodnice, ki bi s kompetitivno vezavo v ATP vezavno mesto inhibirale receptorje NOD2. Pri rezultatih molekulskega sidranja knjižnice fragmentov se je večkrat pojavil 1*H*-pirazol[3,4-*d*]pirimidinski strukturni fragment, ki tvori dobre interakcije z vezavnim mestom. Na podlagi tega smo sestavili knjižnico spojin analogov tega fragmenta in del teh spojin tudi sintetizirali. Sintetizirane spojine so pripravljene za testiranje v celičnih sistemih, s čimer se bodo potrdili ali ovrgli rezultati računalniškega modeliranja.

V prvem delu magistrske naloge smo se osredotočili predvsem na zaviranje imunskega sistema z zaviralnim delovanjem na NOD2, kar bi potencialno lahko ugodno vplivalo na nekatere bolezni (npr. sindrom Blau in sarkoidoze z zgodnjim začetkom). V drugem delu naloge pa smo se navezali na pomoč imunskemu odzivu pri bakterijskih okužbah. Namreč, ko je imunski sistem oslabljen, je še posebej pomembno, da imamo učinkovite protimikrobne učinkovine. Teh je vedno manj zaradi razvoja bakterijske rezistence. Ena izmed zanimivih tarč za razvoj novih protimikrobnih učinkovin je encim DNA-giraza. Ta skrbi za nastanek dodatnih negativnih zvitij v verigi DNA, ki so pomembna pri prepisovanju in podvajanju dedne informacije. Znano je že, da na podenoto A DNA-giraze deluje skupina protimikrobnih učinkovin, imenovanih fluorokinoloni. V naši raziskavi pa nas je zanimala podenota B DNA-giraze, ki vsebuje ATP vezavno mesto. Pri eksperimentalnem delu smo optimizirali sintezo ključnega gradnika spojin, ki imajo znano odlično inhibitorno delovanje na podenoto B DNA-giraze. Z uvedbo nove *terc*-butildimetilsililne zaščitne skupine smo povečali izkoristek, skrajšali čas in število potrebnih reakcij za sintezo spojine **17**, ki jo bodo uporabili pri optimizaciji benzotiazolnega strukturnega razreda zaviralcev DNA-giraze.

Abstract

The immune system is our body's complex defense against various dangers. Part of this defense are NOD2 receptors (nucleotide-binding oligomerization domain 2) that recognize the muramyl dipeptide fragment of peptidoglycan which forms the bacterial cell wall. This recognition activates signaling pathways that are part of the innate immune response. However, excessive activity of NOD2 receptors may cause multiple diseases; it therefore seems worthwhile to develop inhibitors of these receptors. The search for potential inhibitors of the NOD2 receptor was tackled in this master's thesis. With computer-aided molecular design, we searched for lead compounds which would competitively inhibit the ATP-binding site on NOD2 receptors. Molecular docking of our fragment library into the ATP-binding site of NOD2 resulted in multiple examples of the 1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine structural fragment which mimics the binding of adenine ring of ATP. Based on this, we created a library of derivatives and synthesized some of these compounds. The synthesized compounds will be used for further testing in cellular systems which will be used to confirm or reject the results of computer-aided molecular modelling.

In the first part of this master's thesis, we focused primarily on the suppression of the immune system by NOD2 inhibition, which could potentially have a beneficial effect on certain diseases (e.g. Blau syndrome and early onset sarcoidosis). The second part of the thesis deals with helping the immune response in the case of bacterial infections. When the immune system is weakened, effective antimicrobial drugs are of utmost importance since their number decreases due to the development of bacterial resistance. One of the interesting targets for the development of new antimicrobial drugs is the DNA gyrase enzyme. Its task is to enable forming additional negative supercoils in the DNA chain that play an important role in transcription and replication of the genetic material. It is already known that a group of antimicrobial drugs called fluoroquinolones act by interacting with the subunit A of DNA gyrase. Our research, however, focuses on the subunit B of DNA gyrase which contains the ATPase activity. In the laboratory, we optimized the synthesis of the essential building block for compounds which are known for excellent inhibition of the subunit B of DNA gyrase. With the introduction of a new *tert*-butyldimethylsilyl protecting group, we increased the yield as well as shortened the time and the number of required reactions for the synthesis of compound **17**, which will be used in the optimization of the benzothiazole-based DNA gyrase inhibitors.

Ključne besede: Virtualno reševanje, NOD2 inhibitorji, GyrB inhibitorji, optimizacija sinteze, 1*H*-pirazol[3,4-*d*]pirimidin

Key words: Virtual screening, NOD2 inhibitors, GyrB inhibitors, synthase optimization,, 1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine

Seznam okrajšav

A ₂ B ₂	oznaka za heterotetramerno strukturo DNA-giraze
ADP	adenozin difosfat
ATP	adenozin trifosfat
Boc	<i>tert</i> -butiloksikarbonil
Boc ₂ O	di- <i>tert</i> -butiloksikarbonat
CARD	domena za rekrutiranje kaspaz (ang. caspase recruitment domain)
CDCl ₃	deuteriran kloroform
CDSs	citosolni senzorji DNA (ang. cytosolic DNA sensors)
DAMPs	s poškodbo povezani molekularni vzorci (ang. damage-associated molecular patterns)
<i>D</i> -Glu- <i>mezo</i> -DAP	<i>D</i> -glutamil- <i>mezo</i> -diaminopimelinska kislina
DKM	diklorometan
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO- <i>d</i> ₆	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
EtOAc	Etilacetat
GyrA	podenota A DNA-giraze
GyrB	podenota B DNA-giraze
HD1/HD2	vijačna domena 1 in 2 (ang. helical domain 1/2)
HOBt	1-hidroksibenzotriazol
HR-MS	masna spektrometrija visoke ločljivosti
IL-1	interlevkin-1

LRRs	ponovitve, bogate z levcinom (ang. leucine rich repeats)
MAPK	z mitogenom aktivirana proteinska kinaza (ang. mitogen-activated protein kinase)
MeOH	metanol
MF	mobilna faza
MS	masna spektrometrija
NACHT	domena, skupna receptorjem NAIP, CIITA, HEET-E in TPI
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NBD	nukleotid vezoča domena (ang. nucleotide-binding domain)
NF- κ B	jedrni faktor κ B (ang. nuclear factor κ B)
NLRs	NOD-u podobni receptorji (ang. NOD-like receptors)
NMM	<i>N</i> -metilmorfolin
NMR	jedrska magnetna resonanca
NOD	nukleotid vezavna domena oligomerizacije (ang. nucleotide-binding oligomerization domain)
PAMPs	s patogeni povezani molekularni vzorci (ang. pathogen-associated molecular patterns)
PDB	podatkovna baza proteinov (ang. protein data bank)
PRR	receptor za prepoznavo molekulskih vzorcev (ang. pattern recognition receptor)
PYD	pirinska domena (ang. pyrin domain)
R _f	retencijski faktor
RIP2	serin-treonin/tirozin kinaza (ang. serin-threonine/tyrosine kinase)
RLRs	RIG-u podobni receptorji (ang. RIGs-like receptors)
RNA	ribonukleinska kislina
TAK1	transformirajoči rastni dejavnik β aktivirajoča kinaza 1
TBDMS	<i>tert</i> -butildimetilsililna zaščitna skupina
TFA	trifluoroocetna kislina
TLC	tankoplastna kromatografija (ang. thin layer chromatography)

TLRs	Toll-u podobni receptorji (ang. Toll-like receptors)
TMS	trimetilsilan
TNF- α	tumorje nekrotizirajoči faktor α
WHD	krilata vijačna domena (ang. winged-helix domain)

1. Uvod

1.1 NOD 2

1.1.1 Imunski sistem

Človeški organizem je neprestano izpostavljen mnogim tujkom, ki mu lahko škodujejo. Zato je razvil zapleten imunski sistem, ki mu omogoča obrambo pred njimi in s tem preživetje. Bakterije, viruse, parazite in glive imunski sistem prepozna kot tujke in sproži sistem obrambe. Tudi nekatere človeške celice sprožijo imunski sistem. Takšne so na primer spremenjene in poškodovane telesne celice ter presajeni organi. Ko imunski sistem ne deluje pravilno in se odzove na zdrave celice, govorimo o avtoimunskih boleznih (1).

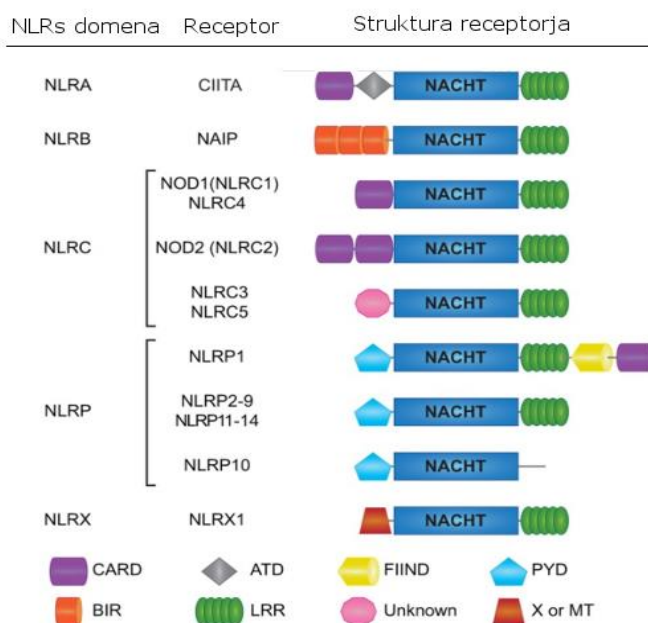
Najprej se človeško telo odzove na patogene s prirojenim imunskim odzivom. Ta je splošen glede na določene skupine mikroorganizmov in je človeška prva linija obrambe. Predstavljajo ga različne fizične in kemijske bariere (npr. epitelij s protimikrobnimi snovmi), fagociti (nevtrofilci in makrofagi), dendritične celice, naravne celice ubijalke, nekateri proteini v krvi (npr. proteini komplementa) in različni mediatorji vnetja. Po hitrem odzivu prirojenega imunskega sistema se aktivira tudi počasnejši, a bolj specifičen, pridobljen imunski sistem. V ospredju so limfociti in protitelesa, ki jih le-ti tvorijo. Pridobljen imunski sistem se gradi tekom celega človeškega življenja, z vsakim antigenom, s katerim se imunski sistem sreča. Če se znova sreča z že znanim antigenom, se odzove hitreje in burneje. Temu pravimo, da ima imunski sistem spomin (2).

Hitrost odziva prirojenega imunskega sistema je odvisna od tega, kako hitro bo prepoznal nek patogen. Da odziv prve obrambne linije ne bi trajal predolgo, je prilagojen tako, da se odziva na takšne molekule oz. molekulske strukture, ki so pogosto prisotne pri raznolikih patogenih. Tem patogenim komponentam pravimo s patogeni povezani molekulski vzorci (PAMPs oz. ang. pathogen-associated molecular patterns). Najpogosteje so to komponente bakterijske celične stene (npr. peptidoglikan in lipopolisahardi), bakterijskih bičkov (npr. flagelin), dvoverižna nemetilirana DNA in dvoverižna RNA. Prirojen imunski sistem prepozna tudi s poškodbo povezane molekulske vzorce (DAMPs oz. ang. damage-associated molecular patterns), kot so na primer proteini toplotnega šoka in natrijev urat. Vse omenjene molekule celica prepozna, ko se vežejo na receptor za prepoznavo molekulskih vzorcev (PRR oz. ang. pattern recognition receptor). Poznamo veliko različnih družin PRR. Toll-u podobni receptorji (TLRs oz. ang. Toll-like receptors) se nahajajo na plazemski in

endosomski membrani različnih celic, prepoznavajo pa med drugim bakterijske lipopolisaharide, peptidoglikan in virusne nukleinske kisline. Na plazemski membrani fagocitov najdemo odstranjevalne receptorje (ang. scavenger receptors) in C-tip lektinskih receptorjev, ki prepoznavajo ogljikove hidrate s terminalno manozo in fruktozo, ter glivične glukane. V citozolu celic najdemo RIG-u (RLRs oz. ang. RIGs-like receptors) podobne receptorje, ki prepoznavajo virusno RNA. Virusno in bakterijsko DNA prepoznavajo citozolni senzorji DNA (CDSs oz. ang. cytosolic DNA sensors). Velika družina citozolnih so receptorji PRR, podobni NOD-u (NLRs oz. ang. NOD-like receptors). Ti zaznavajo številne različne PAMPs, kot so npr. peptidoglikan, urati in citozolni ATP (2).

1.1.2 NOD-u podobni receptorji (NLRs)

Poznanih je že 23 sesalskih receptorjev NLR (Slika 1), ki imajo vsi podobno tridimensko strukturo, sestavljeno iz C-končne domene, centralne (NACHT oz. domena, skupna receptorjem NAIP, CIITA, HEET-E in TPI) domene in N-končne domene (3). C-končna domena je pri vseh, razen receptorjih NLRP10, sestavljena iz ponovitev, bogatih z levcinom (LRRs oz. ang. leucine rich repeats), ki so odgovorne za prepoznavanje PAMPs. Domena NACHT omogoči vezavo receptorjev NLR med seboj in s tem tvorbo oligomerov. Samo-oligomerizacija aktivira receptorje NLR in omogoči prenos signala z N-končno domeno. Glede na N-končno domeno se receptorji NLR delijo na več podskupin. Lahko vsebujejo domeno CARD (ang. caspase recruitment domains), domeno PYD (ang. pyrin domains) ali



Slika 1: Različni receptorji NLR. Prirejeno po (4).

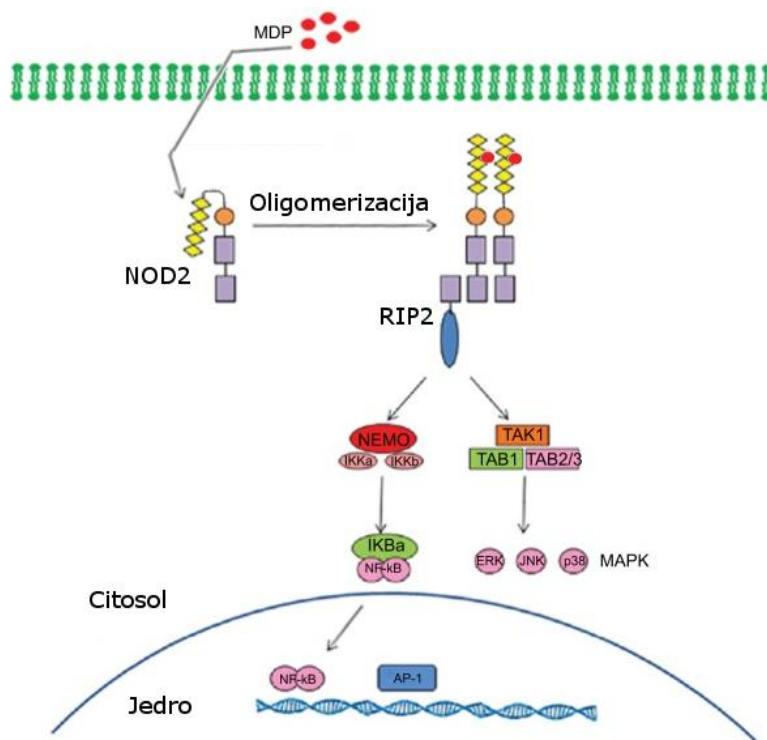
druge domene, kot na primer domena BIR (ang. baculovirus repeat domains) (2). Multipla skleroza, Addisonova bolezen, atopijski dermatitis, vitiligo, Crohnova bolezen, sindrom dednih periodičnih vročic, sindrom golih limfocitov, sistemski lupus eritematosus in astma so le nekatere izmed bolezni, ki jih povezujejo z receptorji NLR (5).

1.1.3 NOD1 in NOD2

Pri razgradnji bakterijske celične stene, zgrajene iz peptidoglikana, nastanejo različni fragmenti. V skupini receptorjev NLR poznamo dva receptorja NOD (ang. nucleotide-binding oligomerization domain), NOD1 in NOD2, ki prepoznavata specifične fragmente te razgradnje. NOD1 prepozna dipeptidni fragment D-Glu-*mezo*-DAP, ki vsebuje diaminopimelinsko kislino, ki jo najdemo pretežno v po Gramu negativnih bakterijah (npr. *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Chlamydia spp*, *Helicobacter pylori*) (6, 7, 8). NOD2 pa prepozna muramilni dipeptidni fragment peptidoglikana, ki ga najdemo tako v po Gramu pozitivnih kot tudi v po Gramu negativnih bakterijah in mikobakterijah (npr. *Mycobacterium tuberculosis*) (6, 9).

Prepoznavanje omenjenih fragmentov poteka na LRRs C-končne domene NOD1 in NOD2. Tako kot ostali receptorji NLR vsebujeta oba receptorja NOD domeno NACHT, razlikujeta pa se v številu domen CARD, ki skrbijo za prenos signala. NOD1 ima eno domeno CARD, pri NOD2 pa sta zaporedno vezani dve. Preden pride do prepoznavanja PAMPs, sta oba receptorja v neaktivnem stanju. To stanje je stabilizirano z LRRs, ki prekrivajo domeno NACHT, in s proteinom Hsp90 (10, 11). Da pride do aktivacije NOD1 in NOD2, se mora sprostiti molekula ADP iz vezavnega mesta domene NACHT, na njeno mesto pa se mora vezati ATP, ki se hidrolizira in omogoči oligomerizacijo domen NACHT (12). Obenem se zmanjša tudi afiniteta do proteina Hsp90. Nadaljnje CARD-CARD interakcije oligomera omogočijo vezavo RIP2 (serin treonin/tirozin kinaza oz. ang. serin-threonine/tyrosine kinase), ki z ubikvitinacijo preko modulatorja NEMO (ang. NF- κ B essential modulator) regulira aktivacijo NF- κ B (jedrni faktor κ B oz. ang. nuclear factor κ B). Pri tem sodeluje še TAK1 (transformirajoči rastni dejavnik β aktivirajoča kinaza 1), ki v kombinaciji z RIP2 aktivira še signalno pot MAPK (z mitogenom aktivirana proteinska kinaza oz. ang. mitogen-activated protein kinase) (Slika 2). Z NF- κ B in MAPK se sproži močan vnetni odziv preko aktivacije genov za različne citokine, kemokine in nekatere protimikrobne peptide (13). NOD1 in NOD2 inducirata tudi NO-sintazo in NADPH-oksidozo (nikotinamid adenin

dinukleotid fosfat oksidaza) ter tako sodelujeta pri tvorbi kisikovih in dušikovih reaktivnih zvrsti (14).



Slika 2: Mehanizem delovanja NOD2; MDP je muramil dipeptid. Prirejeno po (15).

1.1.4 Bolezni povezane z receptorji NOD

Delovanje imunskega sistema je skrbno uravnavano, saj odstopanja v eno ali drugo smer privedejo do različnih bolezni. Premalo aktiviran imunski sistem ne prepozna tujkov, ki ga ogrožajo, če pa je preveč aktiviran, pa lahko pride do razvoja avtoimunskih bolezni. Mutacije genov *CARD4* in *CARD15* privedejo do nepravilnosti NOD1 in NOD2, ki se lahko izražajo kot bolezni povezane s kroničnim vnetjem, avtoimunske bolezni in rak (7). Ugotovili so, da pride pogosteje do mutacij pri NOD2 kot pri NOD1 (16). Najpogostejše bolezni povezane z mutacijami NOD2 so kronične vnetne bolezni, med katere sodijo Crohnova bolezen, sindrom Blau in sarkoidoze z zgodnjim začetkom (ang. early-onset sarcoidosis) (17). Nekatere študije povezujejo NOD2 še z nastankom multiple skleroze, systemskega eritematoznega lupusa (17) in artritisa (19). Polimorfizmi na NOD1 naj bi bili povezani z različnimi malignimi obolenji (npr. rak črevesja, jajčnikov, prsi, prostate) (20, 21, 22). Tako NOD1 kot NOD2 bi naj bila povezana z atopijskim dermatitisom in astmo (23, 24).

1.1.5 Inhibicija NOD2

Za razliko od Crohnove bolezni, pri kateri pride do izgube funkcije NOD2, se pri sindromu Blau in pri sarkoidozah z zgodnjim začetkom poveča signalizacija preko receptorjev NOD2. Prav tako pride do povečane signalizacije pri divjem tipu NOD2. Zato bi bilo smiselno pri navedenih stanjih inhibirati NOD2. Trenutno se v klinični praksi uporabljajo glukokortikoidi in biološka zdravila, ki zavirajo vnetje (inhibitorji TNF- α in IL-1). Pri inhibiciji signalnih poti, odgovornih za nadaljnjo signalizacijo z NF- κ B, je pričakovano, da ne pride do zavrtja celotnega prirojenega obrambnega mehanizma. Takšno selektivno delovanje je zaželeno pri boleznih, ki nastanejo zaradi spremenjenih signalnih poti NOD2 (25).

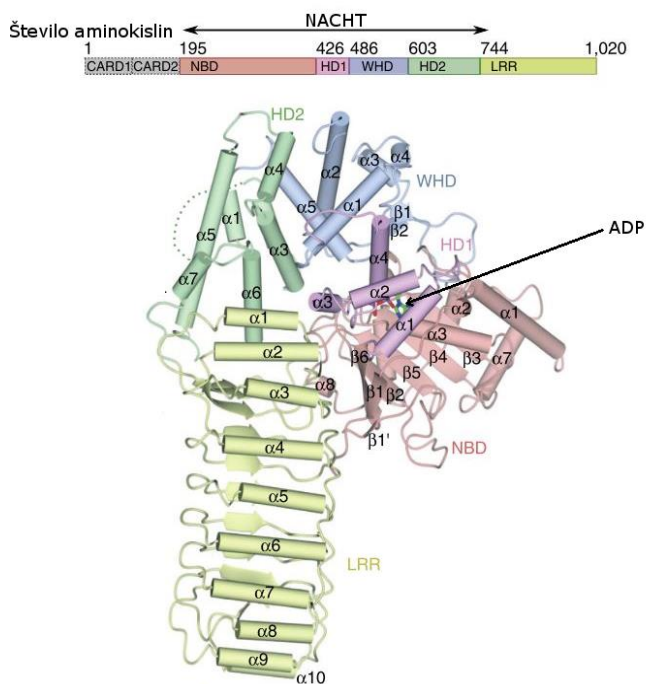
Inhibicijo NOD2 bi lahko dosegli na različnih točkah mehanizma njegovega delovanja. Inhibicija vezave liganda na domeno LRR je nekoliko manj smiselna, saj je mutacija domene LRR, ki privede do povečane signalizacije, pogosta in bi zato bila vezava inhibitorja vprašljiva. Za povečano signalizacijo preko domene LRR je pogosteje odgovorna mutacija domene LRR, redko pa je vzrok prevelika koncentracija liganda. ATP-vezavno mesto je obetavna tarča za inhibicijo in je bila v farmaciji večkrat izkoriščena za uporabo raznolikih encimov. Težava vezave ligandov v vezavno mesto za ATP je njihova selektivnost, saj v človeški celici obstaja veliko encimov, ki vežejo ATP. Naslednja možna tarča bi bila tudi preprečevanje oligomerizacije domene NACHT, ki poteče s tvorbo disulfidne vezi, saj je to pomemben proces za prenos signala. Še nižje po signalizacijski poti pa bi bila možna inhibicija RIP2 ali TAK1 (14).

1.1.6 ATP-vezavno mesto NOD2

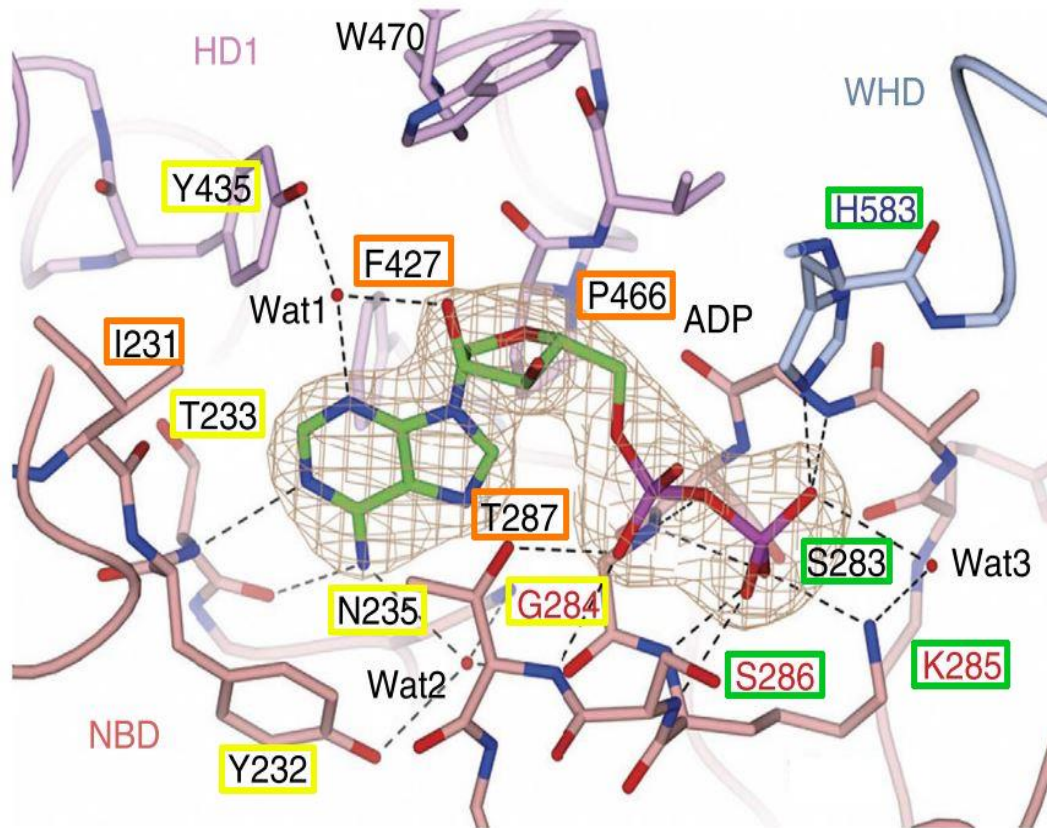
Razrešena je bila kristalna struktura zajčjega receptorja NOD2, ki ima v vezavnem mestu vezano molekulo ADP (Slika 3). Njegovo aminokislinsko zaporedje je v 86% podobno zaporedju človeškega receptorja NOD2. V kristalni strukturi lahko vidimo domeno LRR in domeno NACHT, v katero se veže ATP. Domeno NACHT lahko razdelimo še naprej na nukleotid-vezočo domeno (NBD oz. ang. nucleotide-binding domain), vijačno domeno 1 in 2 (HD1/HD2 oz. ang. helical domain 1/2) in krilato vijačno domeno (WHD oz. ang. winged-helix domain). Domene NBD, HD1 in WHD sodelujejo pri vezavi ADP (26).

Iz kristalne strukture je razvidno, kakšne interakcije tvori molekula ADP v vezavnem mestu (Slika 4). Z dušiki adeninske baze tvori vodikove vezi z aminokislinskim ostankom Thr233 ter preko

molekul vode še s Tyr232, Asn235 Gly284 in Tyr435. Aminokislinski ostanek Tyr435 tvori še dodatno vodikovo vez s hidroksilno skupino riboznega dela ADP. Ostanke Thr287, Phe427 in Pro466 tvorijo hidrofobne interakcije z adeninskim delom. Difosfatni del molekule ADP tvori devet vodikovih vezi z različnimi aminokislinskimi ostanki NOD2. Eno izmed vodikovih vezi tvori s histidinskim ostankom His583 iz domene WHD, kar je pomembno za samoinhibitorno delovanje NOD2. Na samoinhibitorno delovanje NOD2 sklepajo iz podobnosti ostanka His583 na NOD2 in histidinskega ostanka na NLRC4, ki ima prav tako samoinhibitorno delovanje (26).



Slika 3: Kristalna struktura NOD2. Prirejeno po (26).



Slika 4: NOD2 in ADP. Rumene označbe označujejo aminokislinske ostanke, ki tvorijo vodikove vezi z adeninskim delom ADP. Z oranžno so označeni ostanke, ki tvorijo hidrofobne interakcije, z zeleno pa so označeni ostanke, ki tvorijo vodikove vezi s fosfatnim delom ADP. Molekule vode so označene z rdečimi kroglicami. Prirejeno po (26).

1.2 DNA-giraza

1.2.1 Protibakterijske učinkovine in bakterijska rezistenca

Eno izmed največjih odkritij v zgodovini medicine so bili antibiotiki. Hitro za njihovim odkritjem pa so ugotovili, da so se bakterije zmožne izogniti njihovemu baktericidnemu in bakteriostatičnemu delovanju. Na začetku je bil razvoj različnih antibiotikov hitrejši, kot pa je bil razvoj bakterijske odpornosti. A že leta 1960 se je začelo zmanjševati število novih razredov antibiotikov, ki so prišli v klinično uporabo. V zadnjih 15-ih letih je v klinično uporabo prišlo le pet novih razredov protibakterijskih učinkovin, število odpornih bakterij pa narašča (27, 28).

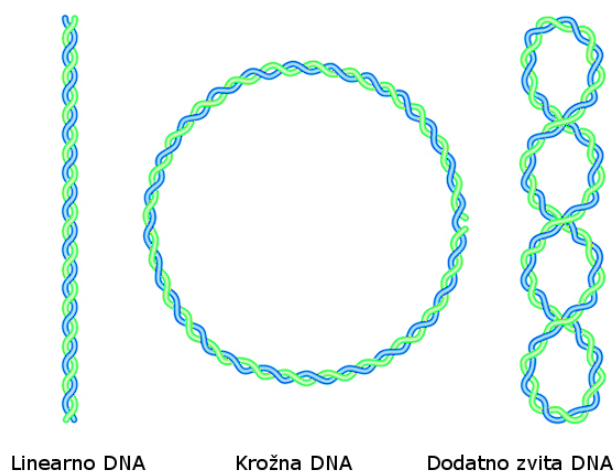
Poznamo dve vrsti odpornosti bakterij. Naravna odpornost je tista, ki jo imajo bakterije še preden prvič pridejo v stik s protibakterijsko učinkovino. Odpornost, ki se razvije po tem, ko je bakterija že bila v stiku s protibakterijsko učinkovino, imenujemo pridobljena odpornost. Da pa odpornost nastane, mora priti do mutacije ali do prenosa genske informacije, ki vključuje zapis za odpornost. Plazmid, ki je zunajkromosomska molekula DNA, pogosto nosi zapis za odpornost. V procesu transdukcije lahko odporna bakterija s pomočjo bakteriofagov prenese plazmid v neodporna bakterijo in s tem le-ta razvije odpornost proti protibakterijski učinkovini. Možen je tudi prenos preko direktnega stika dveh bakterij, kar imenujemo konjugacija. Bakterija lahko privzame zapis DNA za odpornost tudi iz okolice, pri čemer govorimo o transformaciji (29, 30).

Delovanju protibakterijskih učinkovin se bakterija lahko zoperstavi na različne načine. S spremembo celične membrane zmanjša prehod učinkovin v celico, tiste, ki vseeno pridejo v celico, pa lahko z iztočnimi črpalkami črpa iz celice. Bakterija lahko proizvaja encime, ki razgrajujejo protibakterijske učinkovine ali pa spremeni presnovno pot, na katero slednje delujejo. Možna je tudi sprememba vezavnega mesta, kamor se veže protibakterijska učinkovina (31).

1.2.2 DNA in topoizomeraze

Dedni zapis je shranjen v obliki DNA. To je makromolekula, sestavljena iz dveh komplementarnih verig nukleotidov. Heteropolimerni verigi sta sestavljeni iz kombinacije štirih različnih nukleotidov, ki so zgrajeni iz ene izmed dušikovih organskih baz (adenin, citozin, gvanin in timin), sladkorja deoksiriboze in fosfata. Komplementarni nukleotidi

preko vodikovih vezi povezujejo komplementarni verigi DNA v dvovijačno strukturo. Pri bakterijah se dolga linearna struktura DNA sklopi s konci in tako nastane krožna DNA. Če se linearni verigi DNA pred sklopitvijo vsaj enkrat zasukata okrog svoje osi, nastane dodatno zvita DNA (Slika 5). Takšna oblika DNA zavzame manj prostora v celici kot linearna ali krožna oblika (32).



Slika 5: Oblike DNA. Prirejeno po (33).

Dvovijačna struktura in dodatno zvitje

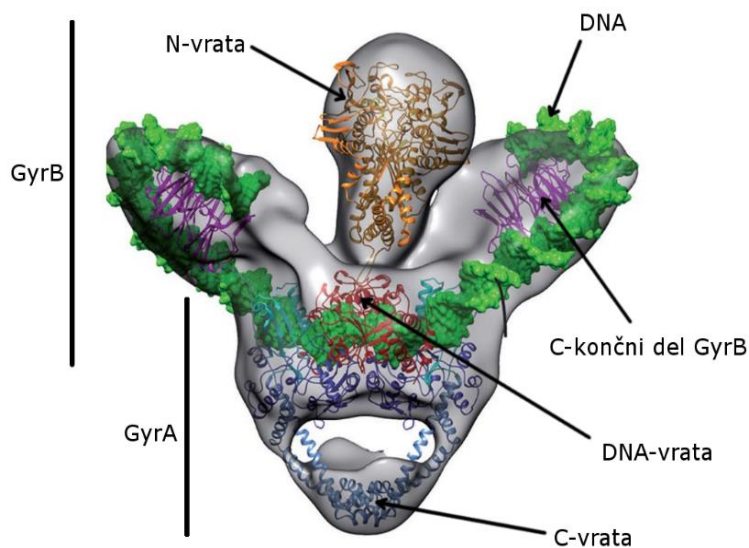
DNA otežita nekatere procese, pomembne za delovanje celice. Ti procesi so na primer prepisovanje in podvajanje DNA, kjer se morata obe verigi DNA ločiti, da se dedni material lahko prepisuje in podvojuje. Ločitev verig DNA pri dodatnem zvitju ni preprosta. Ko se del dvovijačne verige loči in sprost napetost v delu, kjer bo potekalo branje DNA, se zaradi ciklične strukture v preostalem delu DNA napetost poveča. Skozi evolucijo je zato prišlo do razvoja encimov, imenovanih topoizomeraze, ki lahko zmanjšajo to napetost (34).

Topoizomeraze zmanjšujejo napetost tako, da zmanjšajo število dodatnih zvitij. Poznamo dva načina, kako pride do spremembe topologije DNA. Pri prvem mehanizmu topoizomeraza cepi eno od verig dvovijačne DNA, pri čemer se lahko cepljen del verige prosto zavrti okrog komplementarne verige in se nato spet spoji v neprekinjeno verigo DNA. Topoizomeraze, ki razrešujejo napetost v molekulah DNA po takšnem mehanizmu, uvrščamo med topoizomeraze tipa I. Pri drugem mehanizmu sodeluje skupina topoizomeraz tipa II, ki cepijo obe verigi dvovertične DNA in skozi nastalo prekinitev premaknejo neprekinjen del DNA (34).

1.2.3 DNA-giraza

Pri prokariontih delimo topoizomeraze tipa IIa na DNA-girazo in topoizomerazo IV. Glavna funkcija topoizomeraze IV je razdruževanje hčerinskih molekul DNA po koncu podvajanja DNA. DNA-giraza pa uvaja negativna dodatna zvitja v verigo DNA. To zmanjša napetost in omogoči nastanek podvojevalnih vilic (35).

DNA-giraza je sestavljena iz dveh podenot A (GyrA) in dveh podenot B (GyrB), ki skupaj tvorijo heterotetramerno strukturo A_2B_2 . Vsaka izmed podenot ima svojo funkcijo. GyrA sodeluje pri cepitvi molekule DNA in pri njenem ponovnem združevanju. Potrebno energijo ji priskrbi podenota GyrB z vezavo in pretvorbo molekule ATP v



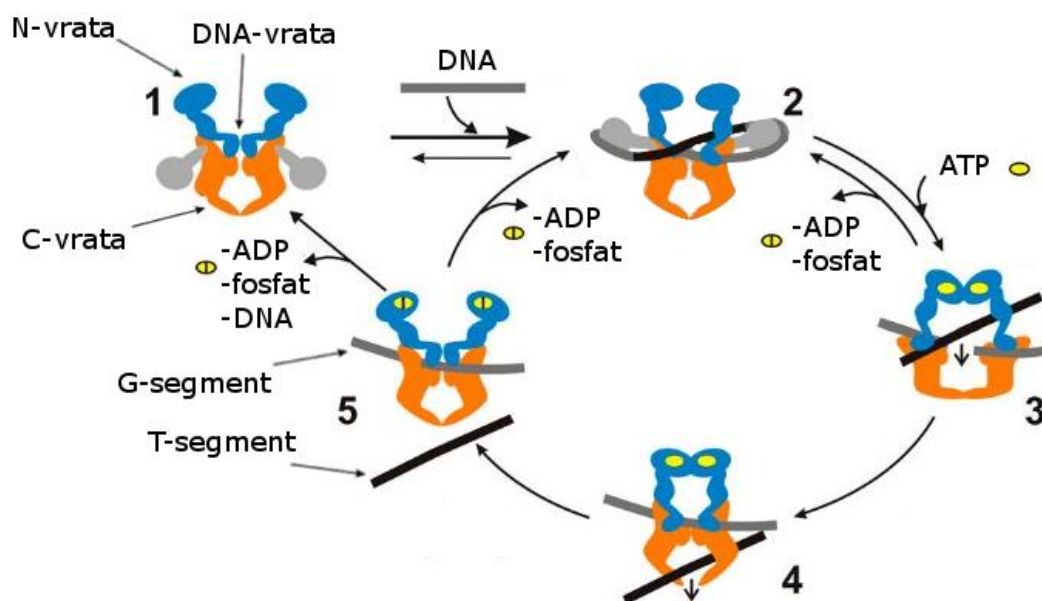
Slika 6: Model kristalne strukture DNA-giraze z molekulo DNA. Prirejeno po (33).

kristalnih struktur DNA-

giraze so raziskovalci uspeli odkriti strukturo celotnega encima, ki je v pomoč pri razumevanju delovanja le-tega (Slika 6). DNA-giraza je sestavljena iz treh vrat, ki v različnih fazah katalitičnega cikla z odpiranjem in zapiranjem skrbijo za prehod molekule DNA (Slika 7). DNA-vrata in C-vrata sestavljajo del N-končnih domen dveh podenot GyrA. V N-končni domeni GyrA pride do cepitve in združevanja verige DNA, C-končna domena pa skrbi za nastanek negativnega zvitja. C-končna dela podenot GyrB tvorita N-vrata, N-končna dela podenot GyrB pa imata vezavni mesti za ATP (36, 37).

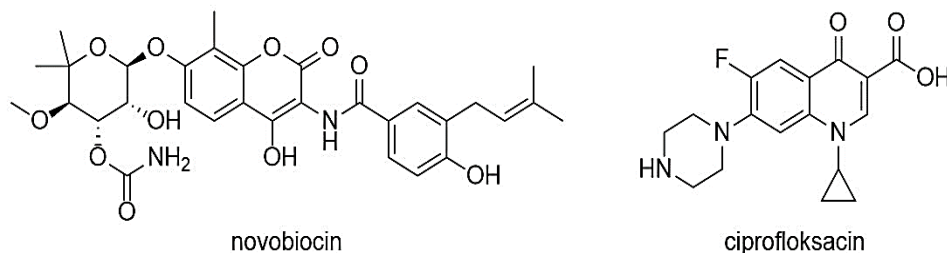
Za boljše razumevanje mehanizma uvajanja negativnega zvitja DNA, so verigo DNA razdelili na dva segmenta, glede na to, kje se nahajata v encimu (Slika 7). Vratni ali G-segment je del DNA, ki se nahaja v DNA-vratih in na katerem pride do cepitve. Transportni ali T-segment je transportiran skozi nastalo prekinitev G-segmenta. Pri delovanju DNA-giraze si sledijo različne strukturne spremembe encima. Po vezavi G-segmenta DNA na DNA-vrata se T-segment DNA ovije okrog C-končnega dela GyrA in vstopi skozi N-vrata, ki se za njim zaprejo. Da pride do popolnega zaprtja vrat, se mora na GyrB vezati ATP. ATP in Mg^{2+} omogočita cepitev G-segmenta in odpiranje DNA-vrat. Z odprtjem teh vrat nastane prostor, da se T-segment premesti skozi prekinitev G-segmenta k C-vratom. Sledi zapiranje DNA-vrat in povezovanje G-segmenta nazaj v neprekinjeno DNA ter odpiranje C-vrat, ki sprostijo T-segment DNA iz encima. Ko T-segment zapusti encim, se za njim C-vrata

zaprejo in odprejo se N-vrata, pri čemer se ADP in fosfat sprostita iz vezavnega mesta. DNA se lahko sprost iz DNA-giraze, ali pa ponovno vstopi v nov katalitični cikel (38).



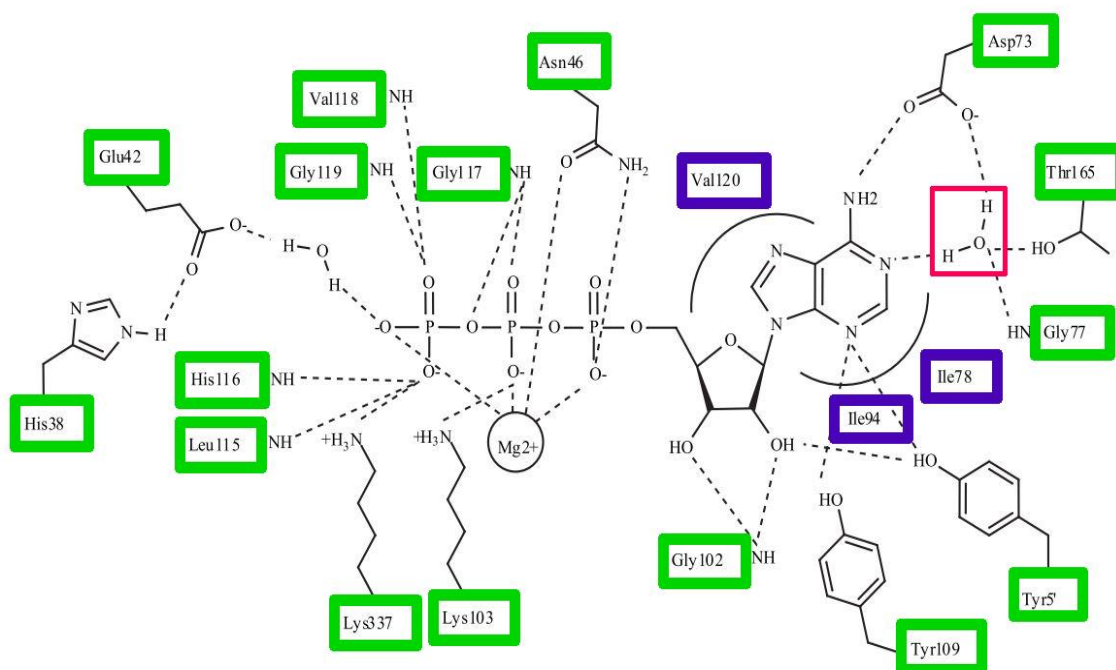
Slika 7: Mehanizem delovanja DNA-giraze. Prirejeno po (38).

Zaradi pomembnosti DNA-giraze pri bakterijah, je ta encim dobra tarča protibakterijskih učinkovin. Trenutno se v klinični praksi uporabljajo le fluorokinoloni. Najbolj znan med njimi je ciprofloksacin (Slika 8), ki je ena izmed najbolj široko spektralnih protibakterijskih učinkovin. Dokazano je bilo, da fluorokinoloni tvorijo stabilen kompleks s podenoto GyrA DNA-giraze in molekulo DNA. Ta kompleks preprečuje nadaljnje podvajanje DNA, kar vodi v celično smrt. Podobnost podenote GyrA s podenoto ParC topoizomeraze IV omogoča fluorokinolonom, da inhibirajo tudi ta encim. Poznamo tudi inhibitor GyrB, novobiocin (Slika 8), ki spada v skupino aminokumarinov, ki so naravni produkti mikroorganizmov rodu *Streptomyces*. Zaradi toksičnosti in razvoja bakterijske odpornosti se ne uporablja več v klinični praksi. Deluje tako, da se kompetitivno veže v vezavno mesto za ATP DNA-giraze in topoizomeraze IV in ostaja edina učinkovina s tem mehanizmom delovanja, ki se je uporabljala v terapiji (37).



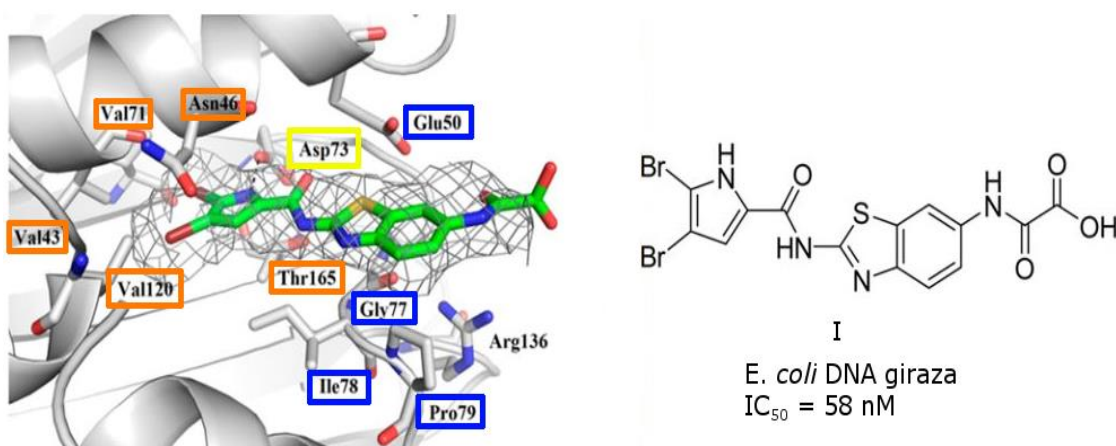
Slika 9: Novobiocin in ciprofloxacin.

Vezavno mesto za ATP GyrB je ostalo zanimivo pri iskanju novih inhibitorjev DNA-giraze. Fosfatni del molekule ATP, ki se veže v vezavno mesto, tvori interakcije z Mg^{2+} ionom in aminokislinskimi ostanki His38, Glu42, Asn46, Lys103, Leu115, His116, Gly117, Gly119, Lys337 (Slika 9). Adenin tvori vodikove vezi z ostanki Tyr5', Asp73, Tyr109 ter preko molekule vode še s Gly77 in Thr165. Hidrofobne interakcije z adeninom in ribozo pa tvorijo ostanki Val20, Ile78, Ile94 (Slika 9). Z molekulo deoksiriboze tvorita ostanka Tyr5' in Gly102 še dodatne tri vodikove vezi (39) (Slika 9).



Slika 8: Vezavno mesto GyrB z vezano molekulo ATP. Aminokislinski ostanki, označeni zeleno, tvorijo vodikove vezi, vijolično označeni ostanki tvorijo hidrofobni žep, rdeče je označena kristalna molekula vode. Prirejeno po (39).

Različne kristalne strukture DNA-giraze so pripomogle k razumevanju delovanja encima, še posebej njegove podenote GyrB. Na podlagi tega je bilo razvitih kar nekaj novih zaviralcev GyrB. Gjorgjieva in sod. (39) so pri raziskovanju odkrili analoge benzotiazolpirolamidov z inhibitorynim delovanjem na GyrB pri *E. coli* v nizkem nanomolarnem območju. S kristalno strukturo so določili vezavo spojine (I) v vezavno mesto za ATP (Slika 10). Spojina I tvori hidrofobne interakcije z aminokislinskimi ostanki Asn46, Val71, Val43, Val120, Thr165, Gly77, Ile78, Pro79, Glu50. Pri rentgenski kristalografiji zaradi slabše ločljivosti ni vidne kristalne molekule vode, ki tvori most preko vodikovih vezi med skupino NH pirola in ostankom Asp73. Arg76 in Arg136 bi glede na računalniško sidranje s programom LeadIT tvorila dodatni vodikovi vezi z oksalatom benzotiazolnega ogrodja, ki pa ju v kristalni strukturi zaradi prenizke ločljivosti ne vidimo (40).



Slika 10: Vežave spojine I v kristalni strukturi GyrB iz *E. coli*. Oranžne označbe - aminokislinski ostanki, ki tvorijo hidrofobne interakcije s 4,5-dibromopirolamidnim delom molekule, modre označbe - aminokislinski ostanki, ki tvorijo hidrofobne interakcije z benzotiazolnim ogrodjem, rumena označba - aminokislinski ostanek, ki tvori vodikovo vez. Prirejeno po (40).

2. Načrt dela

Pri eksperimentalnem delu magistrske naloge bomo uporabljali pristope računalniškega modeliranja pri iskanju novih inhibitorjev receptorja NOD2, medtem ko bomo v primeru DNA-giraze nove inihibitorje načrtovali na osnovi struktur znanih benzotiazolnih inhibitorjev DNA-giraze, ki so bili razviti na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani.

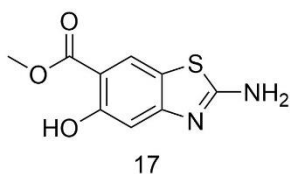
2.1 NOD2

S pomočjo računalniškega modeliranja in znane kristalne strukture receptorja NOD2 želimo odkriti in pripraviti spojine, ki bodo izkazovale inhibitorno delovanje na receptorju NOD2. Načrtovanje se bo začelo s pripravo knjižnice fragmentov, nato pa se bomo na podlagi rezultatov virtualnega rešetanja odločili kakšen tip spojin bomo sintetizirali. Glede na reagente, ki jih imamo na razpolago na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani, bomo pripravili ciljno knjižnico spojin. Vezavo teh spojin bomo prav tako ovrednotili z računalniškim sidranjem in izmed njih izbrali tiste, ki bodo izkazale največji potencial za vezavo v ATP-vezavno mesto receptorja. Izbrane spojine bomo nato sintetizirali in očistili, da bodo pripravljene za analize. Strukturo sintetiziranih spojin bomo potrdili s pomočjo jedrske magnetne resonance (NMR) in masne spektrometrije (MS) ter njihovo delovanje ovrednotili v celičnih testih.

2.2 DNA-giraza

Na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani so odkrili ATP kompetitivne inhibitorje GyrB. Med njimi so tudi različni analogi, ki v strukturi vključujejo 2-aminobenzo[d]tiazol-6-karboksilno kislino kot osrednji skelet.

Pri sintezi metil 2-amino-5-hidroksibenzo[d]tiazol-6-karboksilata (spojina **17**, Slika 11) kot ključnega gradnika pri optimizaciji najboljših spojin jim je korak s ciklizacijo delal kar nekaj težav. Sintezno je bila priprava tega vmesnega produkta dolgotrajna, potratna glede



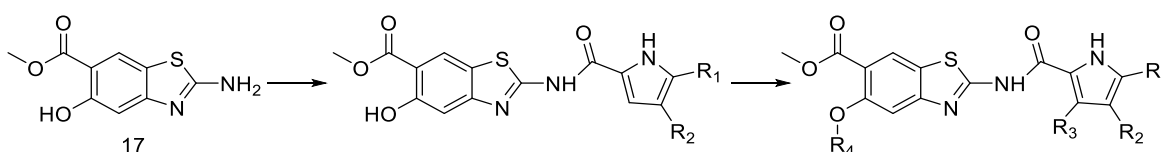
Slika 11: metil 2-amino-5-hidroksibenzo[d]tiazol-6-karboksilat

reagentov in z zelo nizkim celokupnim izkoristkom (Shema 2). V eksperimentalnem delu te naloge želimo postopek priprave omenjenega gradnika optimizirati.

Najprej bomo poskusili izboljšati izkoristek zadnje stopnje priprave metil 2-amino-5-hidroksibenzo[*d*]tiazol-6-karboksilata. Tega se bomo lotili s stopenjsko ciklizacijo, pri čemer bomo produkte vsake stopnje očistili, da bo tako čim manj možnih stranskih reakcij v naslednjih stopnjah (Shema 3).

V nadaljevanju bomo preverili idejo o možni novi poti do omenjenega produkta ciklizacije, ki za zaščito hidroksilne skupine na mestu 5 ne vsebuje acetilne skupine, temveč *tert*-butildimetilsililno zaščitno skupino (TBDMS). Zaradi selektivnosti jo bomo uvajali na hidroksilno skupino ob že zaščitenem aminu. Prav tako pa jo bomo poskusili uvesti na hidroksilno skupino ob nezaščitenem aminu, saj bi na ta način lahko prihranili dva koraka pri sintezi, s čimer bi skrajšali čas, zmanjšali porabo reagentov in povečali celokupni izkoristek (Shema 4).

Ko bi bil postopek za pripravo metil 2-amino-5-hidroksibenzo[*d*]tiazol-6-karboksilata optimiziran, bi pripravili večjo količino le-tega. Ta vmesni produkt bi se lahko uporabljal za pripravo novih inhibitorjev GyrB. Pomembna naslednja stopnja bi bila tvorba različnih pirolamidov na amino skupini na mestu 2, saj ti tvorijo pomembno interakcijo z Asp73 v ATP vezavnem mestu GyrB. Nato bi sledile različne modifikacije hidroksilne skupine, s katerimi bi lahko dosegli več vezavnih interakcij, ali pa spremenili fizikalno-kemijske lastnosti za boljši privzem v bakterijske celice (Shema 1).



Shema 1: Nadaljnja sinteza.

3. Materiali in metode

3.1 Materiali

Pri eksperimentalnem delu magistrske naloge smo uporabljali reagente in topila proizvajalcev Acros Organics, Apollo Scientific, Fluka, Merck, Sigma-Aldrich, Alfa Aesar in TCI.

3.2 Kromatografske metode

3.2.1 Tankoplastna kromatografija – TLC

Potek reakcij smo spremljali s tankoplastno kromatografijo (TLC oz. ang. thin layer chromatography), prav tako pa smo z njo iskali ustrezno mobilno fazo za čiščenje spojin s kolonsko kromatografijo. Mobilno fazo za TLC smo pripravili iz različnih organskih topil v različnih razmerjih, ki so navedena v sinteznih postopkih posameznih spojin. Za stacionarno fazo smo uporabljali plošče Merck DC Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu. Za detekcijo smo uporabljali UV lučko z valovno dolžino 254 nm in 366 nm ter različne orositvene reagente.

3.2.2 "Flash" kolonska kromatografija

Za čiščenje nekaterih spojin smo uporabili "flash" kolonsko kromatografijo, pri kateri pretok mobilne faze pospešujemo z uvajanjem zračnega nadtlaka. Od količine nečistega vzorca je bila odvisna izbira ustrezne steklene kolone, ki so se med seboj razlikovale po volumnu. Mobilno fazo smo pripravili iz različnih organskih topil v različnih razmerjih, ki so navedena v sinteznih postopkih posameznih spojin. Za stacionarno fazo smo uporabljali silikagel, proizvajalca Merck, z velikostjo delcev med 0,040 – 0,063 mm. Elucijo iz kolone smo spremljali s TLC, pri čemer smo za detekcijo uporabljali UV lučko z valovno dolžino 254 nm in 366 nm ter različne orositvene reagente.

3.3 Spektroskopske metode

3.3.1 Jedrska magnetna resonanca (NMR)

¹H NMR in ¹³C NMR spektre smo na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani, posneli na spektrometru Bruker Avance III 400 pri 400 MHz (¹H NMR) oz. 100 MHz (¹³C NMR). Vzorce smo raztopili v devteriranem dimetilsulfoksidu (DMSO-*d*₆) ali devteriranem kloroformu (CDCl₃). Kot interni standard smo uporabili tetrametilsilan (TMS). Za

ugotavljanje nekaterih protonov, ki se lahko izmenjajo, smo uporabili devterirano vodo (D_2O).

3.3.2 Masna spektrometrija

Masne spektre nekaterih preostalih spojin so posneli zaposleni na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani, na spektrometru Advion expression CMSL z ESI tehniko. Analize HR-MS (masna spektrometrija visoke ločljivosti) so opravili na masnem spektrometru visoke ločljivosti Exactive™ Plus Orbitrap Mass Spectrometer na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

3.4 Določanje talilnega intervala

Talilni interval spojin smo določili na Kofflerjevem mikroskopu z ogrevalno mizico Leica.

3.5 Računalniška oprema

3.5.1 Nomenklatura in risanje spojin

Program ChemBioDraw Ultra 16.0, podjetja CambridgeSoft, smo uporabili za risanje strukturnih formul spojin, reakcijskih shem in za poimenovanje spojin po nomenklaturi IUPAC.

3.5.2 Virtualno reševanje in sidranje spojin

Molekulska sidranje je bilo opravljeno na računalniku na Fakulteti za farmacijo: 4 × 8 core AMD Opteron Magny-Cours CPUs, 3 TB HDD, 32 GB RAM, Matrox G200ew, operacijski sistem Ubuntu 64-bit in na osebni računalniku s specifikacijami: Intel Core i7-3610QM CPU 2.30 GHz, 8 GB RAM-a, 1 TB trdega diska z operacijskim sistemom Windows 10 Enterprise 64-bit.

Za pripravljanje in sidranje knjižnic spojin smo uporabljali programe OMEGA 2.5.1.4, OEDocking 3.2.0.2., VIDA 4.3.0.4., paketa OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM in program Schrödinger, Schrödinger, LLC.

3.5.3 Ostalo

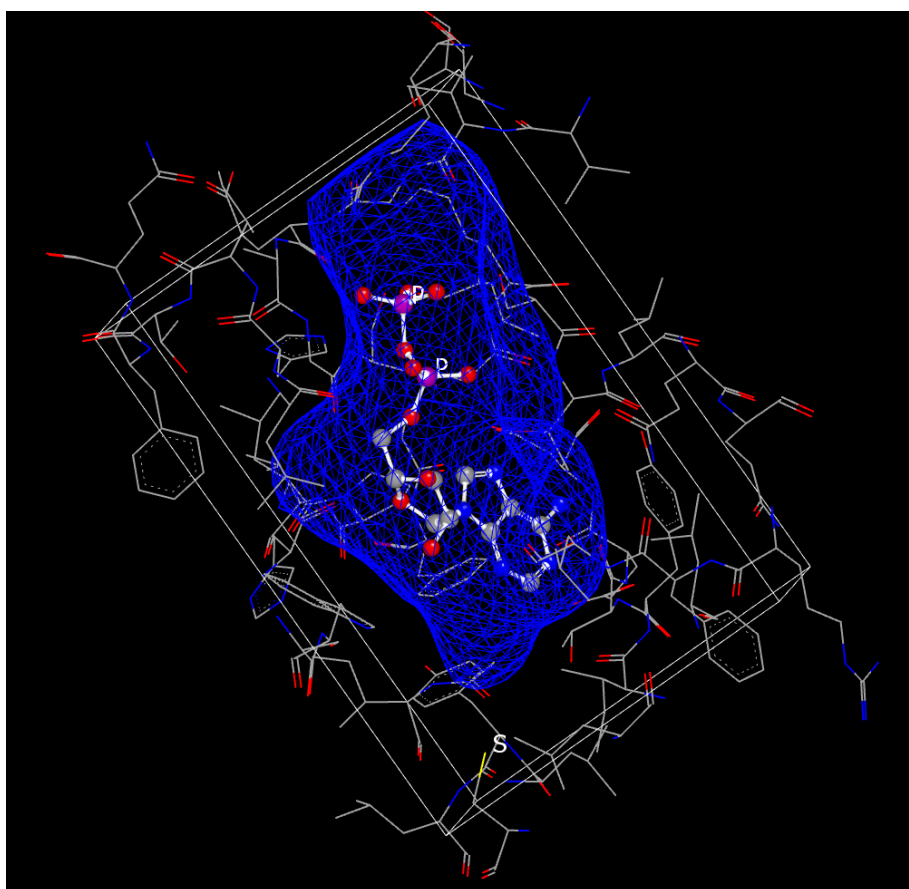
Za procesiranje NMR spektrov smo uporabljali računalniška programa MestReNova v6.0.2-5475 in MestReC 4.8.6.0, proizvajalca Mestrelab Research S.L.

3.6 Računalniško načrtovanje NOD2 inhibitorjev

Pri iskanju inhibitorjev receptorja NOD2 smo začeli na samem začetku. Želeli smo odkriti in pripraviti popolnoma nov strukturni razred spojin, zato smo se zatekli k iskanju spojin *in*

silico s procesom virtualnega rešetanja. Tako smo lahko na podlagi računalniških algoritmov, ki ocenijo vezavno energijo, iz množice spojin izbrali tiste, ki se bodo z večjo verjetnostjo vezale v tarčni receptor.

Za virtualno rešetanje smo pripravili knjižnico spojin iz različnih prosto dostopnih knjižnic na spletu. Uporabili smo raznolike knjižnice fragmentov od ponudnikov ChemBridge, Enamine, Life Chemicals, Asinex, Maybridge, ChemDiv, KeyOrganics, Pharmeks in VitasM. Najprej smo knjižnice fragmentov združili, pri čemer je nastala knjižnica z nekaj



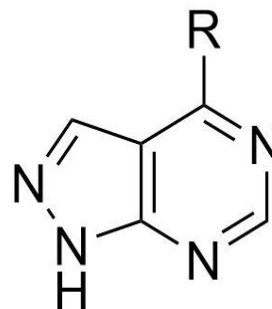
Slika 12: Priprava vezavnega mesta s funkcijo `Make_receptor`, programa OEDocking. Modra mrežasta struktura ponazarja generiran vezavni žep, znotraj vnaprej določenega vezavnega mesta.

manj kot 250.000 spojinami. Nato je sledila predpriprava knjižnice s programom Schrödinger (www.schrodinger.com), s katerim smo odstranili prisotne soli ter ustvarili pravilno protonacijo kislin in baz. Pravilna protonacija je pomembna za rezultate sidranja, saj se spojine *in vivo* vežejo v tarčno mesto pri fiziološkem pH, zato moramo ustrezno protonacijo pri sidranju tudi upoštevati. Iz oblike zapisa spojin SDF, ki vsebuje podatke o tridimenzionalni strukturi spojin, smo pripravili knjižnico različnih konformacij spojin. Ko

smo imeli pripravljeno knjižnico spojin, smo morali pripraviti še vezavno mesto, kamor smo nameravali te spojine sidrati. V bazi proteinskih struktur PDB (www.rcsb.org) smo poiskali kristalno strukturo receptorja NOD2. Izbrali smo kristalno strukturo 5IRN, ki je zajči NOD2 z vezano molekulo ADP v vezavnem mestu. Ločljivost strukture je 2.34 Å. Receptor smo pripravili s funkcijo Make_receptor, programa OEDocking (Slika 12). Velikost prostora za pripravo vezavnega mesta je bila 21,33 Å × 14,33 Å × 17,33 Å in z volumnom 5300 Å³. Program je izdelal obliko vezavnega žepa z volumnom 1043 Å³. Izbrali smo še, da naj spojine tvorijo interakcije z aminokislinskim ostankom Thr233, v obliki ene donorske in ene akceptorske vodikove vezi, s čimer smo želeli oponašati vezavo adeninskega obroča ATP.

Sidranje vseh konformacij spojin smo izvedli na zelo zmogljivih večjedrnih računalnikih Fakultete za farmacijo, Univerze v Ljubljani, z algoritmom FRED (Fast Exhaustive Docking), programa OEDocking (OpenEye, www.eyesopen.com).

Prvih 100 najboljših rezultatov sidranja smo pregledali s programom VIDA (OpenEye, www.eyesopen.com) in se na podlagi cenilne funkcije Chemgauss4 in sintezne kompleksnosti odločili kakšna struktura molekul nas zanima. Izbrali smo si derivate 1*H*-pirazol[3,4-*d*]pirimidina (Slika 13), saj so bili le-ti najvišje ocenjeni med ligandi sidrane knjižnice fragmentov. Na podlagi reagentov na Katedri za farmacevtsko kemijo smo pripravili načrt 30-ih spojin, ki bi jih lahko sintetizirali. Te spojine smo narisali s programom ChemDraw 16 in jih pretvorili v zapis SMILES. Iz tega zapisa smo s pomočjo programa OMEGA (OpenEye, www.eyesopen.com) pripravili ciljano knjižnico spojin, v kateri so imele spojine povprečno 140 konformacij. Receptor smo izbrali enak kot pri sidranju knjižnice fragmentov. Sledilo je sidranje ciljane knjižnice s pomočjo funkcije FRED, programa OEDocking. Z rezultati smo si pomagali zožiti nabor spojin za sintezni načrt.

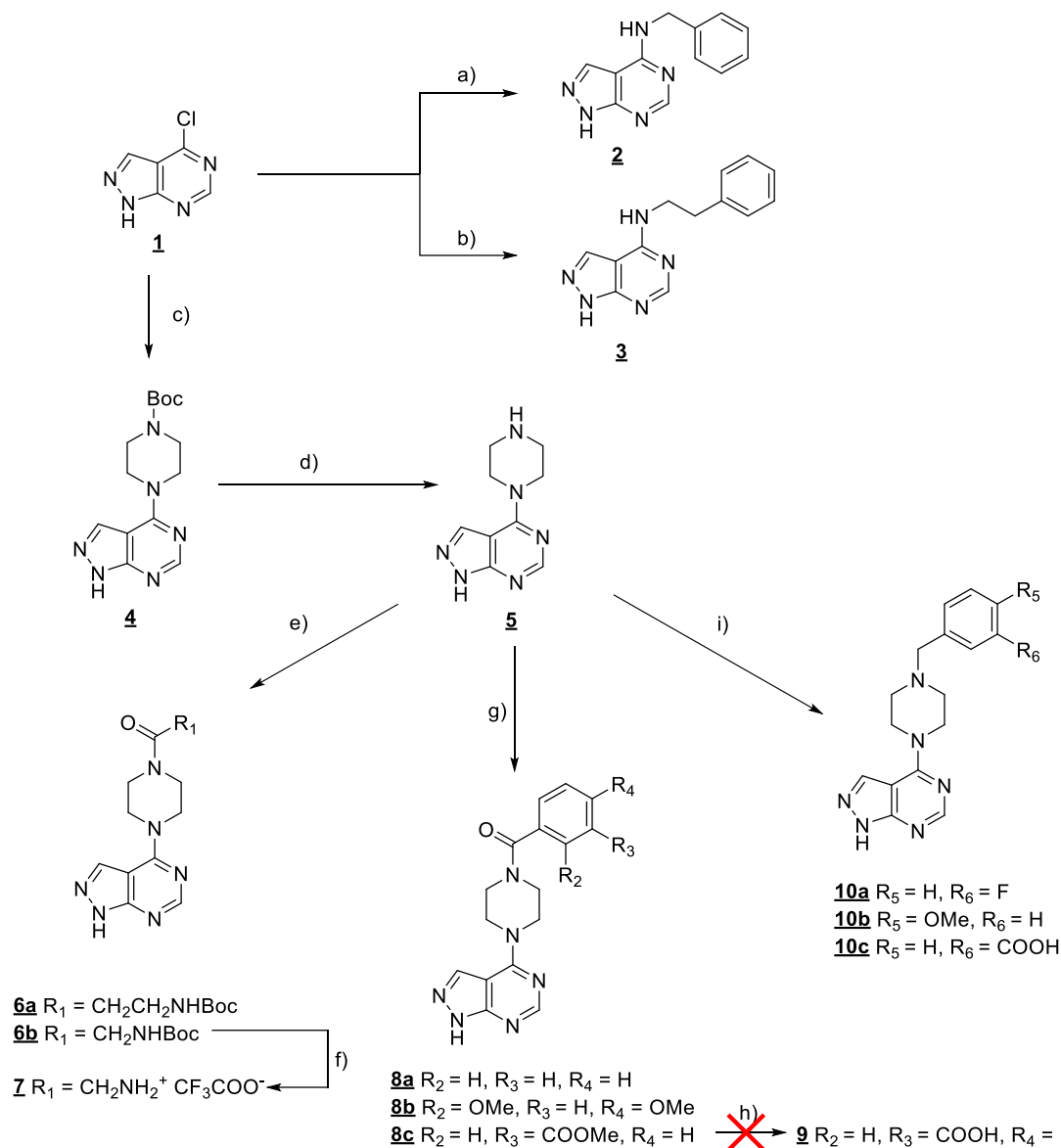


Slika 13: Strukturni skelet 1*H*-pirazol[3,4-*d*]pirimidinskih analogov

4. Eksperimentalni del

4.1 Reakcijska shema inhibitorjev NOD2

Na shemi 2 je ponazorjen potek vseh sintez potencialnih inhibitorjev receptorja NOD2. Z enostopenjsko sintezo ob prisotnosti baze (Et_3N) smo sintetizirali **2** in njegov analog **3** z dodatno CH_2 skupino med aminom in benzenom. Za sintezo 4-(piperazin-1-il)-1*H*-pirazol[3,4-*d*]pirimidinskih analogov smo si pripravili spojino **5** tako, da smo uvedli na **1** Boc zaščiten piperazin in nato zaščitno skupino odstranili z acidolizo s trifluoroocetno kislino (TFA). Za tvorbo amidov (**6a**, **6b**, **8a**, **8b** in **8c**) smo uporabili tehniko s sklopitvenim reagentom EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid), HOBt (1-hidroksibenzotriazol) in NMM (*N*-metilmorfolin). Pri spojini **6b** smo odstranili še zaščitno skupino Boc s TFA. Pri poskusu hidrolize metilnega estra spojine **8c** z natrijevim hidroksidom je prišlo do hidrolize amida. Benzilaminske analoge (**10a**, **10b**, **10c**) smo tvorili iz aldehydov z redukativnim aminiranjem v prisotnosti $\text{Na}(\text{CH}_3\text{COO})_3\text{BH}$ ali NaCNBH_3 in baze (Et_3N).

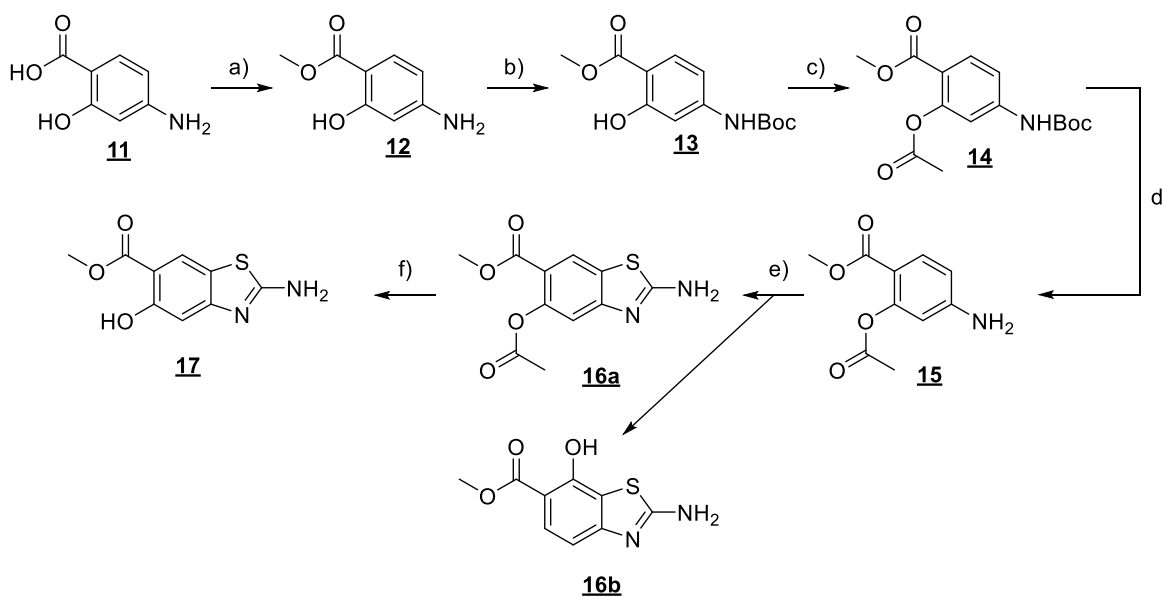


Shema 2: Reakcijska shema sinteznih postopkov potencialnih inhibitorjev receptorja NOD2. Reagenti in pogoji: a) benzilamin, 1,4-dioksan, Et_3N , 80°C , 2 h; b) 2-feniletan-1-amin, 1,4-dioksan, Et_3N , 80°C , 1,5 h; c) *tert*-butil piperazin-1-karboksilat, 1,4-dioksan, Et_3N , 80°C , 2,5 h; d) TFA, DKM, sobna T, ~15 h; e) za **6a**: 3-((*tert*-butoksikarbonil)amino)propanojska kislina, HOBt, NMM, EDC, DMF, 0°C → sobna T, 72 h, **6b**: (*tert*-butoksikarbonil)glicin, HOBt, NMM, EDC, DMF, 0°C → sobna T, 72 h; f) TFA, DKM, sobna T, ~15 h; g) **8a**: benzojska kislina, HOBt, NMM, EDC, DMF, 0°C → sobna T, ~15 h, **8b**: 2,4-dimetoksibenzojska kislina, HOBt, NMM, EDC, DMF, 0°C → sobna T, ~15 h, **8c**: 3-(metoksikarbonil)benzojska kislina, HOBt, NMM, EDC, DMF, 0°C → sobna T, ~15 h; h) NaOH, MeOH, sobna T, 48 h; i) **10a**: 3-fluorobenzaldehid, $\text{Na}(\text{CH}_3\text{COO})_3\text{BH}$, Et_3N , THF, sobna T, 48 h, **10b**: 4-metoksibenzaldehid, NaCNBH_3 , Et_3N ,

MeOH, sobna T, 72 h; **10c**: 3-formilbenzojska kislina, NaCNBH₃, Et₃N, MeOH, sobna T, 48 h.

4.2 Reakcijske sheme inhibitorjev DNA-giraze

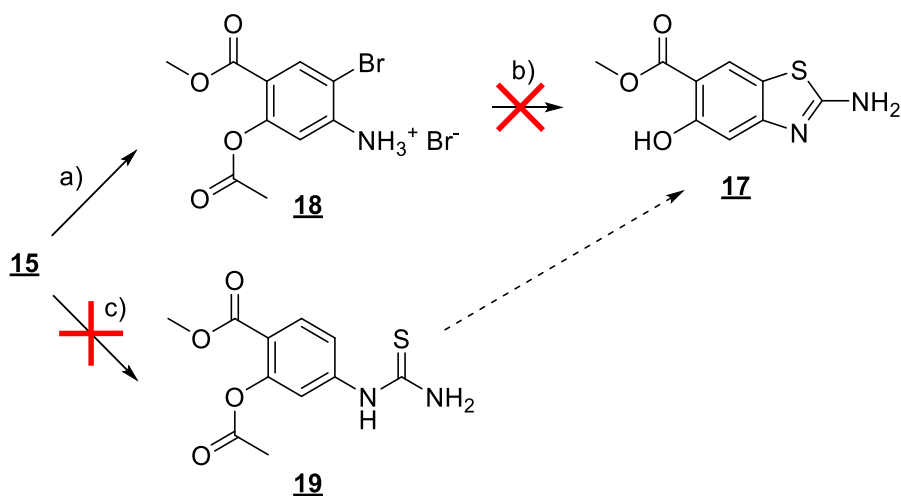
Sintetizirali smo metil 2-amino-5-hidroksibenzo[*d*]tiazol-6-karboksilat (**17**) po že znanem postopku (Shema 2), da smo dobili vmesne produkte, iz katerih smo lahko izhajali za izboljšave ciklizacije. Spojini **11** smo zaščitili karboksilno kislino s kislino katalizirano tvorbo metilnega estra **12**, nato smo zaščitili še aminske skupine v obliki *tert*-butilkarbamata z Boc₂O **13**. To nam je omogočilo selektivno zaščito hidroksilne skupine z acetanhidridom **14**. Sledila je odstranitev zaščitne skupine na aminu z acidolizo **15** in ciklizacija **16a**, pri kateri je nastal tudi stranski produkt **16b**. Spojini **16a** smo na koncu še z natrijevim hidroksidom hidrolizirali acetilno zaščito hidroksilne skupine.



Shema 3: Sinteza metil 2-amino-5-hidroksibenzo[*d*]tiazol-6-karboksilat (**17**) po znanem postopku. Reagenti in pogoji: a) H₂SO₄, MeOH, 70 °C, ~15 h; b) Boc₂O, THF, 70 °C, 48 h; c) acetanhidrid, piridin, CH₃CN, 70 °C, 72 h; d) HCl, 1,4-dioksan, sobna T, 72 h; e) Br₂, KSCN, CH₃COOH, 12 °C → sobna T, ~15 h; f) NaOH, MeOH, sobna T, 1,5 h.

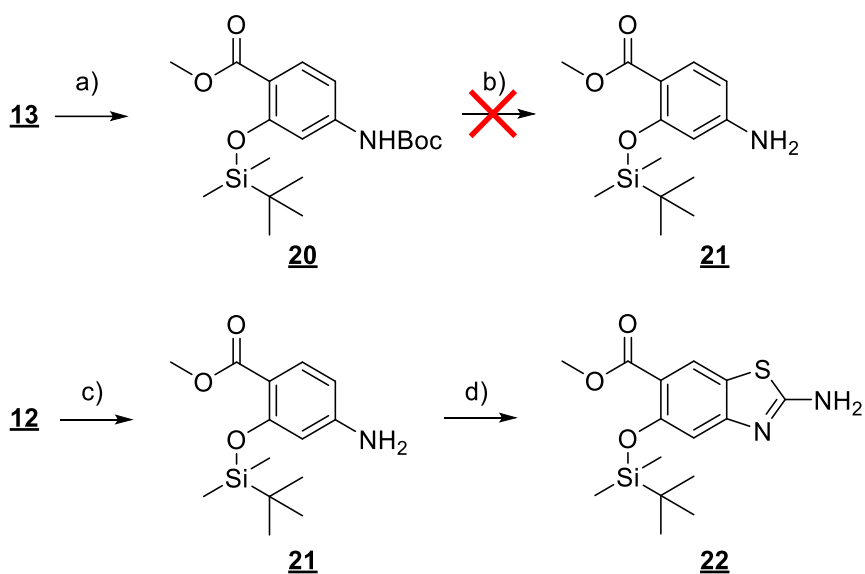
Ker je bil izkoristek ciklizacije v spojino **16a** zelo nizek in v reakciji nastane veliko stranskih produktov, smo poskusili s stopenjsko ciklizacijo prikazano na Shemi 4. Spojino **15** smo najprej poskusili samo bromirati **18**, kar je tudi uspelo. Reakcija s KSCN v cikliziran produkt

16a ali **17** pa ni potekla. Poskusili smo tudi v obratnem vrstnem redu tako, da bi najprej pripravili tiosečnino **19** in bi potem po sledečem bromiranju potekla ciklizacija do želenega produkta, vendar nam ni uspelo pripraviti vmesne stopnje s tiosečnino **19**.



Shema 4: Poskus optimizacije ciklizacije do aminobenzotiazola s stopenjsko ciklizacijo. Reagenti in pogoji: a) Br₂, CH₃COOH, 12 °C → sobna T, ~15 h; b) KSCN, NMM, CH₃COOH, sobna T → 100 °C, 6 dni; c) KSCN, HCl, 1,4-dioksan, sobna T → 100 °C, ~15 h.

Shema 5 prikazuje ciklizacijo s pomočjo zaščitne skupine TBDMS na hidroksilni skupini spojine **12**. Najprej smo poskusili z uvedbo zaščitne skupine TBDMS na zaščiten amin **20**. Težava je bila, da je pri odstranitvi zaščitne skupine Boc prišlo tudi do neželene cepitve zaščitne skupine TBDMS. Nato smo poizkusili zaščititi hidroksilno skupino spojine **12**, brez da bi zaščitili tudi amin. Ugotovili smo, da pride do selektivne zaščite hidroksilne skupine, amin pa ostane prost **21**. Sledila je ciklizacija spojine **21**, ki je uspela, prav tako je na hidroksilni skupini ostala tudi zaščitna skupina TBDMS **22**.



Shema 5: Ciklizacija aminobenzotiazola z zaščitno skupino TBDMS na OH. Reagenti in pogoji: a) *tert*-butilklorodimetilsilan, piridin, sobna T → 80 °C, 6 dni; b) HCl, 1,4-dioksan, sobna T, 3 dni; c) *tert*-butilklorodimetilsilan, 4-metilimidazol, DKM, sobna T, 4 dni; d) Br₂, KSCN, CH₃COOH, 12 °C → sobna T, ~15 h.

4.3 Sintezni postopki

***N*-Benzil-1*H*-pirazol[3,4-*d*]pirimidin-4-amin (**2**).** Spojino **1** (100 mg, 0,647 mmol) smo raztopili v 1,4-dioksanu (3 mL). Nato smo dodali Et₃N (0,108 mL, 0,776 mmol) in benzilamin (0,071 mL, 0,647 mmol) in segrevali na oljni kopeli pri 80 °C. Potek reakcije smo spremljali s TLC in jo po 2 h ustavili. Pri znižanem tlaku smo odstranili topilo, preostanek v bučki raztopili v EtOAc in spirali z 1% raztopino citronske kisline (2 × 10 mL). Organsko fazo smo sušili nad Na₂SO₄, filtrirali in odstranili EtOAc pri znižanem tlaku. Izkoristek reakcije: 85,8 %; rumenkasto beli kristali (125 mg); tališče: 186-192 °C; R_f (diklorometan/metanol = 9/1): 0,34; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13,43 (s, 1H, NH), 8,71 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H, NHCH₂), 8,24 (s, 1H, Ar-H), 8,16 (s, 1H, Ar-H), 7,40 – 7,31 (m, 4H, 4 × Ar-H), 7,29 – 7,22 (m, 1H, Ar-H), 4,75 (d, *J* = 5,9 Hz, 2H, CH₂) ppm; ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 43.08, 66.32, 99.88, 126.89, 127.39, 128.35, 132.26, 139.33, 154.41, 155.62, 156.24, 171.26 ppm.

***N*-Feniletil-1*H*-pirazol[3,4-*d*]pirimidin-4-amin (**3**).** Spojino **1** (100 mg, 0,647 mmol) smo raztopili v 1,4-dioksanu (3 mL). Nato smo dodali Et₃N (0,108 mL, 0,776 mmol) in 2-feniletan-1-amin (0,082 mL, 0,647 mmol) in segrevali na oljni kopeli pri 80 °C. Potek reakcije smo spremljali s TLC in jo po 90 min ustavili. Pri znižanem tlaku smo odstranili topilo in preostanek raztopili v EtOAc ter organsko fazo spirali z 1% raztopino citronske kisline (2 × 10 mL). Organsko fazo smo sušili nad Na₂SO₄, filtrirali in odstranili EtOAc pri znižanem tlaku. Izkoristek reakcije: 96,9 %; rumenkasto beli kristali (150 mg); tališče: 138-146 °C; R_f (diklorometan/metanol = 9/1): 0,35; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13,39 (s, 1H, NH), 8,31 (s, 1H, NHCH₂), 8,25 (s, 1H, Ar-H), 8,10 (s, 1H, Ar-H), 7,35 – 7,24 (m, 4H, 4 × Ar-H), 7,24 – 7,18 (m, 1H, Ar-H), 3,72 (dd, *J*₁ = 14,0 Hz, *J*₂ = 6,3 Hz, 2H, NHCH₂CH₂), 2,94 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, NHCH₂CH₂) ppm; ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 34.87, 41.47, 66.32, 99.91, 126.11, 128.34, 128.67, 132.18, 139.44, 155.65, 156.23, 171.26 ppm.

***Terc*-butil 4-(1*H*-pirazol[3,4-*d*]pirimidin-4-il)piperazin-1-karboksilat (**4**).** V bučki z magnetnim mešalom smo raztopili **1** (2,996 g, 19,4 mmol) v 1,4-dioksanu (50 mL). Nato smo dodali Et₃N (3,22 mL, 23,3 mmol) in *terc*-butil piperazin-1-karboksilat (4,333 g, 23,3 mmol) in 2,5 h mešali na olji kopeli pri 80 °C. Reakcijski zmesi smo odstranili topilo pri znižanem tlaku, preostanku dodali EtOAc (200 mL) in raztopino 1% citronske kisline (2 × 100 mL). Pri tem je na medfazi izpadla bela oborina, ki smo jo odfiltrirali z odsesavanjem. Vodno fazo smo sprali še enkrat z EtOAc (50 mL). Oborino in organsko fazo smo sušili pri

znižanem tlaku. Izkoristek reakcije: 92,1 %; rumenkasto beli kristali (5,433 g); tališče: 206-213 °C; R_f (diklorometan/metanol = 9/1): 0,40; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8,48 (s, 1H, Ar-H), 8,06 (s, 1H, Ar-H), 4,09 – 4,04 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 3,68 (s, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 1,52 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$) ppm; ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 28.42, 67.09, 80.52, 100.24, 133.49, 154.65, 154.82, 155.54, 157.12 ppm; MS (ESI+) $m/z = 305,2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

4-(1H-Pirazol[3,4-d]pirimidin-4-il)piperazin (5). Spojino **4** (3,417 g, 11,2 mmol) smo raztopili v DKM (40 mL) in nato dodali TFA (8,65 mL, 112 mmol). Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Pri znižanem tlaku smo odstranili topilo in dobili oljnato oranžno tekočino. Prelili smo jo z dietiletrom ter jo s pomočjo palčke in ultrazvoka poskusili čimbolj raztopiti. Dietileter smo odstranili pri znižanem tlaku ter vse skupaj še dvakrat ponovili. Nato smo nevtralizirali produkt z 1 M NaOH do pH = 8 in poskusili ekstrahirati z EtOAc (3×100 mL). S pomočjo TLC smo ugotovili, da je večina produkta ostala v vodi fazi. S hibridno vakuumsko črpalko ($p < 1$ mbar) in visoko temperaturo (70 °C) smo vodni fazi odstranili vodo in TFA. Dobljeno rumeno oborino smo suspendirali v EtOAc (100 mL) in odfiltrirali z odsesavanjem ter spirali z dodatnim EtOAc (50 mL). Pri tem se je oborina obarvala zelo rahlo rumenkasto belo. Izkoristek reakcije: 84,9 %; rumenkasto beli kristali (3,033 g); tališče: 162-170 °C; R_f (diklorometan/metanol = 9/1): 0,05; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 13,53 (s, 1H, NH), 8,27 (s, 1H, Ar-H), 8,22 (s, 1H, Ar-H), 3,90 – 3,79 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 2,87 – 2,78 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$) ppm; signala za skupino NH ne vidimo v NMR spektru; MS (ESI+) $m/z = 205,1$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

***tert*-Butil**

(3-(4-(1H-pirazol[3,4-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-3-

oksopropil)karbamat (6a). 3-((*tert*-Butoksikarbonil)amino)propanojsko kislino (100 mg, 0,529 mmol) smo raztopili v DMF (3 mL) in raztopino na ledeni kopeli ohladili na 0 °C. Nato smo dodali HOBt (93 mg, 0,688 mmol), EDC (99 mg, 0,635 mmol) in NMM (0,115 mL, 1,06 mmol) ter mešali 30 min preden smo dodali še **5** (168 mg, 0,529 mmol) in pustili reakcijo potekati 3 dni pri sobni temperaturi. Reakcijski zmesi smo odstranili topilo pri znižanem tlaku in surov produkt čistili s kolonsko kromatografijo (MF: diklorometan/metanol = 20/1). Ločba na koloni ni bila popolnoma uspešna, zato smo dodali EtOAc (20 mL). Polovico smo spirali z nasičeno raztopino NaHCO_3 (5 mL), preostalo polovico pa smo dali v hladilnik čez noč. Iz raztopine EtOAc v hladilniku je izpadla oborina, ki smo jo odfiltrirali z odsesavanjem in spirali z EtOAc (5 mL). Produkt kristalizacije smo sušili do konstante mase. Organski fazi ekstrakcije smo odstranili topilo pri znižanem tlaku.

Izkoristek reakcije: 27,7 %; beli kristali (55 mg); tališče: 185-189 °C; R_f (diklorometan/metanol = 9/1): 0,40; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 13,58 (s, 1H, NH), 8,26 (s, 1H, Ar-H), 8,26 (s, 1H, Ar-H), 6,75 (s, 1H, CH_2NHCO), 4,06 – 3,89 (m, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3,64 (d, $J = 4,4$ Hz, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 3,17 (dd, $J_1 = 12,9$ Hz, $J_2 = 6,9$ Hz, 2H, CH_2), 1,44 – 1,31 (m, 9H, $3 \times \text{CH}_3$) ppm, signal za eno od CH_2 skupin se prekriva s signalom za DMSO- d_5 ; MS (ESI-) $m/z = 374,2$ ($[\text{M}-\text{H}]^-$).

terc-Butil (2-(4-(1H-pirazol[3,4-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-2-oksoetil)karbamat (6b). (*terc*-Butoksikarbonil)glicin (100 mg, 0,571 mmol) smo raztopili v DMF (3 mL) in raztopino na ledeni kopeli ohladili na 0 °C. Nato smo dodali HOBt (100 mg, 0,742 mmol), EDC (106 mg, 0,685 mmol) in NMM (0,124 mL, 1,14 mmol) ter mešali 30 min preden smo dodali še **5** (182 mg, 0,571 mmol) in pustili reakcijo potekati 3 dni pri sobni temperaturi. Reakcijski zmesi smo dodali EtOAc (20 mL), pri tem je izpadla oborina, ki smo jo odfiltrirali z odsesavanjem ter sprali z EtOAc (20 mL) in nasičeno raztopino NaHCO_3 (20 mL). Produkt smo sušili do konstante mase. Izkoristek reakcije: 33,9 %; rumenkasto beli kristali (70 mg); tališče: 223-225 °C; R_f (diklorometan/metanol = 9/1): 0,35; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 13,59 (s, 1H, NH), 8,28 (d, $J = 5,7$ Hz, 2H, $2 \times \text{Ar-H}$), 6,82 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H, CH_2NHCO), 3,99 ($2 \times$ s, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 3,86 (d, $J = 5,8$ Hz, 2H, CH_2NHCO), 3,65 (s, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 1,40 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$) ppm; MS (ESI+) $m/z = 384,2$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

2-(4-(1H-Pirazol[3,4-d]pirimidin-4-il)-2-oksoetan-1-amino trifluoroacetat (7). Spojino **6b** (62 mg, 0,172 mmol) smo suspendirali v DKM (4 mL) in nato dodali TFA (0,066 mL, 0,860 mmol), pri čemer se je suspenzija zbistrila. Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi čez noč. Naslednji dan smo na podlagi TLC ugotovili, da reakcija ni potekla do konca, zato smo dodali še dodatno količino TFA (100 mL, 1,30 mmol) in pustili mešati do naslednjega dne. Reakcijski zmesi smo s pomočjo hibridne vakuumske črpalke pri znižanem tlaku ($p < 1$ mbar) odstranili topilo. Izkoristek reakcije: 7,8 %; rumenkasti kristali (5 mg); tališče: 165-174 °C; R_f (diklorometan/metanol = 9/1): 0,00; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8,47 (s, 1H, Ar-H), 8,39 (s, 1H, Ar-H), 8,11 (s, 3H, NH_3^+), 4,09 (s, 2H, CH_2), 4,06 – 3,92 (m, 6H, $2 \times \text{CH}_2$, CH_2NH_3^+), 3,75 (s, 2H, CH_2) ppm.

(4-(1H-Pirazol[3,4-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)(fenil)metanon (8a). Benzojsko kislino (41 mg, 0,332 mmol) smo raztopili v DMF (4 mL) in raztopino na ledeni kopeli ohladili na 0 °C. Nato smo dodali HOBt (58 mg, 0,432 mmol), EDC (62 mg, 0,398 mmol) in NMM (0,072 mL, 0,664 mmol) ter mešali 30 min preden smo dodali še amin **5** (80 mg,

0,332 mmol) in pustili reakcijo teči čez noč pri sobni temperaturi. Reakcijski zmesi smo odstranili topilo pri znižanem tlaku, nato smo produkt raztopili v EtOAc (30 mL) in spirali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (15 mL). Vodno fazo smo ekstrahirali z EtOAc (2 × 15 mL), združili organske faze in odstranili EtOAc pri znižanem tlaku. Produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF: diklorometan/metanol = 20/1). Izkoristek reakcije: 23,4 %; beli kristali (24 mg); tališče: 230-238 °C; R_f (diklorometan/metanol = 9/1): 0,39; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13,59 (s, 1H, NH), 8,30 (s, 1H, Ar-H), 8,28 (s, 1H, Ar-H), 7,54-7,45 (m, 5H, Ar-H), 4,08 (s, 2H, CH₂), 3,97 (s, 2H, CH₂), 3,80 (s, 2H, CH₂), 3,56 (s, 2H, CH₂) ppm.

(4-(1*H*-Pirazol[3,4-*d*]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)(2,4-dimetoksifenil)metanon (8b).

2,4-Dimetoksibenzojsko kislino (100 mg, 0,549 mmol) smo raztopili v DMF (3 mL) in raztopino na ledeni kopeli ohladili na 0 °C. Nato smo dodali HOBt (96 mg, 0,714 mmol), EDC (102 mg, 0,659 mmol) in NMM (0,179 mL, 1,65 mmol) ter mešali 30 min preden smo dodali še **5** (175 mg, 0,549 mmol) in pustili reakcijo potekati čez noč pri sobni temperaturi. Reakcijski zmesi smo dodali EtOAc (40 mL) ter spirali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (20 mL) in 1% raztopino citronske kisline (10 mL). Organsko fazo smo sušili nad Na₂SO₄, filtrirali in odstranili EtOAc pri znižanem tlaku. Produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF: diklorometan/metanol = 20/1). Izkoristek reakcije: 10,9 %; rumenkasto beli kristali (22 mg); tališče: 107-109 °C; R_f (diklorometan/metanol = 9/1): 0,25; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 13,69 (s, 1H, NH), 8,48 (s, 1H, Ar-H), 8,05 (s, 1H, Ar-H), 7,29 (s, 1H, Ar-H), 6,57 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, Ar-H), 6,50 (s, 1H, Ar-H), 4,15 (s, 2H, CH₂), 4,02 (d, *J* = 2,8 Hz, 4H, 2 × CH₂), 3,85 (2 × s, 6H, 2 × CH₃), 3,55 (s, 2H, CH₂), 3,50 (s, 2H, CH₂) ppm.

Metil 3-(4-(1*H*-pirazol[3,4-*d*]pirimidin-4-il)piperazin-1-karbonil)benzoat (8c).

3-(Metoksikarbonil)benzojsko kislino (100 mg, 0,555 mmol) smo raztopili v DMF (3 mL) in raztopino na ledeni kopeli ohladili na 0 °C. Nato smo dodali HOBt (98 mg, 0,722 mmol), EDC (103 mg, 0,666 mmol) in NMM (0,121 mL, 1,11 mmol) ter mešali 30 min preden smo dodali še **5** (177 mg, 0,555 mmol) in pustili reakcijo teči čez noč pri sobni temperaturi. Reakcijski zmesi smo dodali EtOAc (20 mL) in spirali z 1% raztopino citronske kisline (2 × 10 mL). Organski fazi smo odstranili EtOAc pri znižanem tlaku in surov produkt čistili s kolonsko kromatografijo (MF: diklorometan/metanol = 15/1). Ločba na koloni ni bila popolnoma uspešna, zato smo dodali EtOAc (20 mL) in spirali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 × 5 mL). Organski fazi smo odstranili EtOAc pri znižanem tlaku in ponovno dobljeni produkt čistili s kolonsko kromatografijo (MF: diklorometan/metanol = 20/1).

Izkoristek reakcije: 24,6 %; beli kristali (50 mg); tališče: 225-228 °C; R_f (diklorometan/metanol = 11/1): 0,58; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 13,60 (s, 1H, NH), 8,27 (s, 2H, 2 \times Ar-H), 8,11 – 8,05 (m, 1H, Ar-H), 8,05 – 8,00 (m, 1H, Ar-H), 7,77 (dd, $J_1 = 5,4$ Hz, $J_2 = 3,8$ Hz, 1H, Ar-H), 7,66 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H, Ar-H), 4,10 (s, 2H, CH_2), 3,96 (s, 2H, CH_2), 3,89 (s, 3H, CH_3), 3,82 (s, 2H, CH_2), 3,55 (s, 2H, CH_2) ppm; MS (ESI-) $m/z = 365,2$ ($[\text{M-H}]^-$).

3-(4-(1H-Pirazol[3,4-*d*]pirimidin-4-il)piperazin-1-karbonil)benzojska kislina (9). Spojino **8c** (30 mg, 0,0820 mmol) smo raztopili v MeOH (5 mL) in nato dodali 1 M NaOH (0,082 mL, 0,0820 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali čez noč pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo na podlagi TLC dodali še NaOH (6,56 mg, 0,164 mmol) in pustili mešati do naslednjega dne. Reakcijski zmesi smo odstranili topilo pri znižanem tlaku ter dodali EtOAc (20 mL) in 5% raztopino NaHCO_3 (10 mL). Fazi smo ločili, nato smo vodno fazo nakisali do pH = 2 s 1 M HCl in dodali EtOAc (40 mL). Vodni fazi smo odstranili vodo pri znižanem tlaku in dodali aceton (5 mL). Nastalo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem in matičnici odstranili topilo. NMR je pokazal, da je prišlo do hidrolize amida in želenega produkta nismo uspeli izolirati.

4-(4-(3-Fluorobenzil)piperazin-1-il)-1H-pirazol[3,4-*d*]pirimidin (10a). Spojino **5** (300 mg, 0,943 mmol) smo raztopili v THF (30 mL) ter dodali trietilamin (0,131 mL, 0,943 mmol), 3-fluorobenzaldehid (0,102 mL, 0,943 mmol) in $\text{Na}(\text{CH}_3\text{COO})_3\text{BH}$ (260 mg, 1,23 mmol). Reakcijsko zmes smo pustili mešati na sobni temperaturi čez noč. Ker reakcija ni potekla do konca, smo z dodatkom trietilamina (0,262 mL, 1,89 mmol) dvignili pH na 8 in pustili, da reakcija teče do naslednjega dneva. Reakcijski zmesi smo odstranili topilo pri znižanem tlaku in produkt čistili s kolonsko kromatografijo (MF: diklorometan/metanol = 20/1). Izkoristek reakcije: 17,0 %; rumenkasto beli kristali (50 mg); tališče: 218-222 °C; R_f (diklorometan/metanol = 20/1): 0,38; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 13,57 (s, 1H, NH), 8,29 (s, 1H, Ar-H), 8,25 (s, 1H, Ar-H), 7,42 (dd, $J_1 = 14,1$ Hz, $J_2 = 7,9$ Hz, 1H, Ar-H), 7,22 (d, $J = 7,7$ Hz, 2H, Ar-H), 7,14 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H, Ar-H), 3,95 (s, 4H, 2 \times CH_2), 3,64 (s, 2H, CH_2), 2,58 (s, 4H, 2 \times CH_2) ppm.

4-(4-(4-Metoksibenzil)piperazin-1-il)-1H-pirazol[3,4-*d*]pirimidin (10b). Spojino **5** (300 mg, 0,943 mmol) smo raztopili v MeOH (15 mL) in dodali trietilamin (0,131 mL, 0,943 mmol), 4-metoksibenzaldehid (0,115 mL, 0,943 mmol) in NaCNBH_3 (81 mg, 1,287 mmol) ter pustili mešati na sobni temperaturi 3 dni (pH reakcijske zmesi je bil 9). Reakcijski zmesi

smo odstranili topilo pri znižanem tlaku in produkt čistili s kolonsko kromatografijo (MF: diklorometan/metanol = 20/1). Produkt ni bil popolnoma čist, zato smo ga suspendirali v EtOAc (10 mL), segreli in vročega filtrirali z odsesavanjem. Oborino smo sušili v sušilniku do konstantne mase. Izkoristek reakcije: 5,9 %; beli kristali (50 mg); tališče: 150-158 °C; R_f (diklorometan/metanol = 9/1): 0,51; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 13,73 (s, 1H, NH), 8,35 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H, $2 \times \text{Ar-H}$), 7,45 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, $2 \times \text{Ar-H}$), 7,07 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, $2 \times \text{Ar-H}$), 4,84 (s, 2H, CH_2), 4,35 (s, 2H, CH_2), 3,80 (s, 3H, CH_3), 3,47 ($2 \times$ s, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 3,19 (s, 2H, CH_2) ppm.

3-((4-(1H-Pirazol[3,4-*d*]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)metil)benzojska kislina (10c).

Spojino 5 (153 mg, 0,480 mmol) smo raztopili v MeOH (15 mL) in dodali trietilamin (0,066 mL, 0,480 mmol), 3-formilbenzojsko kislino (0,072 mg, 0,480 mmol) in NaCNBH₃ (41 mg, 0,655 mmol) ter pustili mešati na sobni temperaturi 2 dni. Reakcijska zmes je bila suspenzija, zato smo oborino (izhodna spojina) filtrirali z odsesavanjem, matičnici pa smo odstranili topilo pri znižanem tlaku ter jo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: diklorometan/metanol/ocetna kislina = 9/1/0,1). Produktu iz kolone smo dodali še dietileter (2×20 mL) in ga odstranili pri znižanem tlaku, s čim smo odstranili še preostalo ocetno kislino. Izkoristek reakcije: 3,1 %; rumenkasto beli kristali (5 mg); tališče: 190-195 °C; R_f (diklorometan/metanol/ocetna kislina = 9/1/0,1): 0,18; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 13,55 (s, 1H, NH), 8,28 (s, 1H, Ar-H), 8,23 (s, 1H, Ar-H), 7,93 (s, 1H, Ar-H), 7,86 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, Ar-H), 7,56 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, Ar-H), 7,46 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H, Ar-H), 3,99 – 3,86 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{CH}_2$), 3,60 (s, 2H, CH_2CH_2), 1,91 (s, 2H NCH₂C) ppm, signal za eno od CH_2CH_2 skupin se prekriva s signalom za DMSO- d_5 .

Metil 4-amino-2-hidroksibenzoat (12). 4-Amino-2-hidroksibenzojsko kislino 11 (10,15 g, 66,3 mmol) smo raztopili v MeOH (150 mL) in segrevali na oljni kopeli pri 70 °C. V to raztopino smo po kapljicah dodajali 96% H₂SO₄ (15,20 mL, 285 mmol). Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč. MeOH smo odstranili pri znižanem tlaku in oljnat ostanek nevtralizirali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (300 mL) in 2 M NaOH (30 mL) do pH=7. Vodno raztopino smo ekstrahirali z EtOAc (3×80 mL). Organske faze smo združili in spirali z nasičeno raztopino NaCl in sušili nad Na₂SO₄, filtrirali in EtOAc odstranili pri znižanem tlaku. Naredili smo prekristalizacijo iz EtOAc in sušili nastale kristale do konstante mase. Izkoristek reakcije: 83,9%; črno sivi kristali (9,290 g); tališče: 91-94 °C; R_f (diklorometan/metanol = 9/1): 0,84.

Metil 4-((*tert*-butiloksidkarbonil)amino)-2-hidroksibenzoat (13). Spojino **12** (9,265 g, 55,4 mmol) smo raztopili v THF (10 mL) in dodali di-*tert*-butiloksidkarbonat (19,354 g, 88,7 mmol). Reakcija je potekala 2 dni na oljni kopeli pri 70°C. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom in dobili oljnato rjavo tekočino, ki smo jo raztopili v EtOAc (100 mL). Organsko fazo smo spirali z vodo (40 mL), 1 M HCl (4 × 40 mL) in nasičeno raztopino NaCl (2 × 40 mL). Organsko fazo smo uparili pod znižanim tlakom in prekrystalizirali iz mešanice EtOAc/heksan = 1/6. Izpadle kristale (7,270 g posušene čiste spojine) smo filtrirali z odsesavanjem, preostalo matičnico pa smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: etilacetat/heksan = 1/6, 3,215 g). Izkoristek reakcije: 70,8%; beli kristali (10,485 g); tališče: 89-92 °C; R_f (etilacetat/heksan = 1/7): 0,22; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10,63 (s, 1H, OH), 9,78 (s, 1H, NH), 7,68 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, Ar-H), 7,17 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H, Ar-H), 7,02 (dd, *J*₁ = 8,8 Hz, *J*₂ = 2,1 Hz, 1H, Ar-H), 3,86 (s, 3H, OCH₃), 1,48 (d, *J* = 4,7 Hz, 9H, 3 × CH₃) ppm.

Metil 2-acetoksi-4-((*tert*-butilkarbonil)amino)benzoat (14). Spojino **13** (4,000 g, 15,0 mmol) smo raztopili v acetonitrilu (50 mL). Med mešanjem na oljni kopeli (70 °C) smo dodali piridin (2,170 mL, 26,9 mmol) in acetanhidrid (3,253 mL, 34,4 mmol). Reakcijo smo spremljali s TLC. Po 3 dneh smo pri znižanem tlaku odstranili topilo in del piridina. Oljnat produkt smo raztopili v EtOAc (60 mL) ter spirali z 10% citronsko kislino (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 × 10 mL). Organsko fazo smo sušili nad Na₂SO₄, filtrirali in pod znižanim tlakom odstranili EtOAc. Oljnatemu ostanku smo dodali dietileter (50 mL) in postavili bučko v ultrazvočno kadičko, pri čemer je izpadla rjavo bela oborina. Oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem, matičnico uparili pod znižanim tlakom in ponovili obarjanje. Združeni oborini smo sušili v sušilniku do konstantne mase (3,018 g). Izkoristek reakcije: 65,2%; rjavkasto beli kristali; tališče: 108-112 °C; R_f (etilacetat/heksan = 1/1): 0,52; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9,96 (s, 1H, NH), 7,86 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H, Ar-H), 7,43 – 7,34 (m, 2H, 2 × Ar-H), 3,76 (s, 3H, COOCH₃), 2,27 (s, 3H, COCH₃), 1,48 (s, 9H, 3 × CH₃) ppm; MS (ESI) *m/z* = 332,2 ([M+Na]⁺).

Metil 2-acetoksi-4-aminobenzoat (15). Spojino **14** (1,990 g, 6,43 mmol) smo raztopili v 1,4-dioksanu (20 mL), v bučko dodali magnetno mešalo in jo zaprli s septumom. Počasi smo dodali 4 M HCl v 1,4-dioksanu (16,082 mL, 64,3 mmol) in pustili mešati 3 dni pri sobni temperaturi. Izpadlo belo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem in posušili, nato pa smo jo nevtralizirali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (do pH = 7) in ekstrahirali z EtOAc (50 mL).

Organsko fazo smo sušili nad Na_2SO_4 , filtrirali in odstranili EtOAc pri znižanem tlaku (beli kristali, 0,950 g). Matičnici od reakcije smo odstranili topilo pri znižanem tlaku in produkt raztopili v EtOAc (30 mL). Organsko fazo smo nevtralizirali z nasičeno raztopino NaHCO_3 (do $\text{pH} = 7$) in sušili nad Na_2SO_4 , filtrirali in EtOAc odstranili pri znižanem tlaku. Produkt smo raztopili v MF (etilacetat/heksan = 1/1) in ga čistili s kolonsko kromatografijo (0,230 g). Izkoristek reakcije: 87,7%; beli kristali (1,180 g); tališče: 72-80 °C; R_f (etilacetat/heksan = 1/1): 0,34; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 7,65 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, Ar-H), 6,46 (dd, $J_1 = 8,7$ Hz, $J_2 = 2,2$ Hz, 1H, Ar-H), 6,31 – 6,12 (m, 3H, Ar-H, NH_2), 3,69 (s, 3H, COOCH_3), 2,23 (s, 3H, COCH_3) ppm; MS (ESI-) $m/z = 208,0$ ($[\text{M}-\text{H}]^-$).

Metil 2-amino-5-hidroksibenzo[*d*]tiazol-6-karboksilat (17). Spojino **15** (1,180 g, 5,64 mmol) smo raztopili v očetni kislini (10 mL) in ohladili na 10 °C na ledeni kopeli. Dodali smo KSCN (2,193 g, 22,6 mmol) in mešali dokler se le-ta ni popolnoma raztopil. V kapalnik smo odmerili očetno kislino (5 mL) in v njej raztopili brom (0,58 mL, 11,3 mmol) ter vse skupaj počasi dokapavali v reakcijsko zmes. Reakcijo smo pustili teči čez noč pri sobni temperaturi. Reakcijsko zmes smo nevtralizirali z nasičeno raztopino NaHCO_3 (do $\text{pH} = 8$), pri čemer je izpadla oborina, ki smo jo odfiltrirali z odsesavanjem. Glede na standard smo s TLC ugotovili, da je produkt v oborini, zato smo jo raztopili v MeOH, vse skupaj segreli in z odsesavanjem odfiltrirali oranžno oborino. Produkt je prešel v matičnico. Naredili smo suh nanos na silikagel in produkt čistili s kolonsko kromatografijo (MF: diklorometan/metanol = 20/1). Ker ločba ni bila popolnoma učinkovita, smo naredili še eno kolonsko kromatografijo (MF: etilacetat/heksan = 1/2) s suhim nanosom z MeOH. Dobili smo frakcijo z **16b** in **16a** (94 mg) in frakcijo z mešanico **16a** in **17** (100 mg), ki smo jima odstranili MF pri znižanem tlaku. Mešano frakcijo produktov **16a** in **17** (100 mg) smo suspendirali v MeOH (15 mL) in dodali 1 M NaOH (6 mL). Reakcijo smo na sobni temperaturi 1,5 h spremljali s TLC in nato odstranili topilo pri znižanem tlaku. Produkt smo nakisali z 1 M HCl (na $\text{pH} = 1$), pri čemer so izpadli sivkasto beli kristali. Oborino smo filtrirali in sušili do konstantne mase (60 mg). **17**: Izkoristek reakcije: 4,7 %; beli kristali (60 mg); tališče: 243-250 °C; R_f (diklorometan/metanol = 20/1): 0,19; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 10,65 (s, 1H, OH), 8,08 (s, 1H, Ar-H), 8,00 (s, 2H, NH_2), 6,81 (s, 1H, Ar-H), 3,88 (s, 3H, CH_3) ppm; MS (ESI+) $m/z = 225,0$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

5-Acetoksi-2-bromo-4-(metoksikarbonil)benzenamonijev bromid (18). V bučko smo natehtali **15** (170 mg, 0,813 mmol) in dodali očetno kislino (5 mL). V kapalnik smo odmerili

oetno kislino (2 mL) in vanjo odmerili brom (0,046 mL, 0,894 mmol) ter to raztopino počasi dokapavali v bučko. Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi čez noč. Pri tem je nastala bela oborina, ki smo jo odfiltrirali z odsesavanjem in posušili do konstantne mase. Izkoristek reakcije: 56,7%; beli kristali (170 mg); tališče: 121-130 °C; R_f (etilacetat/heksan = 1/1): 0,38; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 7,91 (s, 1H, Ar-H), 6,48 (s, 1H, Ar-H), 3,72 (s, 3H, COOCH_3), 2,25 (s, 3H, COCH_3) ppm, signal od NH_3^+ se prekriva s signalom od vode; MS (ESI+) $m/z = 310,0$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

Metil 5-acetoksi-2-aminobenzo[*d*]tiazol-6-karboksilat (17). Spojino **18** (160 mg, 0,434 mmol) smo suspendirali v očetni kislini (5 mL) in dodali KSCN (84 mg, 0,868 mmol). Pri tem se je del suspenzije raztopil in raztopina se je obarvala rožnato. Reakcijsko zmes smo mešali čez noč pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo ugotovili s TLC, da naš produkt ne nastaja, zato smo dodali NMM (0,094 mL, 0,868 mmol). Počakali smo do naslednjega dne in ker našega produkta še kar ni bilo videti na TLC, smo dvignili temperaturo na 100 °C in pustili mešati 5 dni. Reakcijo smo spremljali s TLC, a nismo zasledili, da bi nastal naš produkt, je pa nastalo veliko različnih stranskih produktov, zato reakcijske zmesi nismo dodatno čistili.

Metil 2-acetoksi-4-tioureidobenzoat (19). V bučko smo natehtali **15** (220 mg, 1,05 mmol) ter dodali 1,4-dioksan (5 mL), KSCN (111 mg, 1,26 mmol) in 4 M HCl v 1,4-dioksanu (0,285 mL, 1,26 mmol). Pol ure smo mešali pri sobni temperaturi, potem pa smo bučko predstavili na oljno kopel in pri 100 °C mešali čez noč. Naslednji dan smo odstranili topilo pri znižanem tlaku in čistili produkt s kolonsko kromatografijo (MF: etilacetat/heksan = 1/1). Izkazalo se je, da reakcija ni potekla, saj smo dobili nazaj spojino **12** (odščitena OH in prost amin).

Metil 4-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-2-((*tert*-butildimetilsilil)oksi)benzoat (20). Spojino **13** (1,000g 3,74 mmol) smo raztopili v piridinu (10 mL) in dodali *tert*-butilklorodimetilsilan (789 mg, 5,24 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi 5 dni. Na podlagi TLC smo se odločili reakcijsko zmes segrevati na oljni kopeli (80 °C). Po 24-ih urah smo reakcijski zmesi dodali EtOAc (60 mL) in spirali z 10 % raztopino citronske kisline (6 × 20 mL). Organsko fazo smo sušili nad Na_2SO_4 , filtrirali in odstranili EtOAc pri znižanem tlaku. Produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF: etilacetat/heksan = 1/6). Izkoristek reakcije: 30,8%; beli kristali (440 mg); R_f (etilacetat/heksan = 1/2): 0,62; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 9,67 (s, 1H, NH), 7,63 (d,

$J = 8,7$ Hz, 1H, Ar-H), 7,20 (dd, $J_1 = 8,7$ Hz, $J_2 = 2,0$ Hz, 1H, Ar-H), 7,16 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, Ar-H), 3,73 (s, 3H, CH₃), 1,48 (s, 9H, COO(CH₃)₃), 0,98 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0,21 (s, 6H, 2 × SiCH₃) ppm.

Metil 4-amino-2-((*tert*-butildimetilsilil)oksi)benzoat (21). Spojino **20** (440 mg, 1,15 mmol) smo raztopili v 1,4-dioksanu (10 mL), zaprli s septumom in dodali 4 M HCl v 1,4-dioksanu (2,883 mL, 11,5 mmol). Reakcijsko zmes smo pustili mešati 3 dni pri sobni temperaturi. Izpadla je bela oborina, ki smo jo odfiltrirali z odsesavanjem in sušili do konstantne mase. NMR spekter je pokazal, da je prišlo tako do odstranitve zaščitne skupine Boc, kakor tudi do odstranitve zaščitne skupine TBDMS, pri čemer smo dobili spojino **12**.

Metil 4-amino-2-((*tert*-butildimetilsilil)oksi)benzoat (21). Spojino **12** (9,793 g, 58,6 mmol) smo raztopili v DKM (150 mL), nato pa smo dodali *tert*-butilklorodimetilsilan (17,661 g, 117 mmol) in 4-metilimidazol (9,621 g, 117 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali 4 dni pri sobni temperaturi. Po 4-ih dneh smo jo sprali z vodo (2 × 20 mL), nato smo organsko fazo sušili nad Na₂SO₄, filtrirali in odstranili topilo pri znižanem tlaku. Produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF: etilacetat/heksan = 1/4). Izkoristek reakcije: 74,7%; rožnato rjavi kristali (12,309 g); tališče: 64–66 °C; R_f (etilacetat/heksan = 1/2): 0,44; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7,48 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, Ar-H), 6,18 (dd, $J_1 = 8,6$ Hz, $J_2 = 2,1$ Hz, 1H, Ar-H), 6,10 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, Ar-H), 5,86 (s, 2H, NH₂), 3,66 (s, 3H, CH₃), 0,97 (s, 9H, 3 × CCH₃), 0,17 (s, 6H, 2 × SiCH₃) ppm; MS (ESI+) $m/z = 282,2$ ([M+H]⁺).

Metil 2-amino-5-((*tert*-butildimetilsilil)oksi)benzo[*d*]tiazol-6-karboksilat (22). Spojino **21** (780 mg, 2,77 mmol) smo raztopili v očetni kislini (7 mL) in raztopino ohladili na ledeni kopeli na 10 °C. Sledil je dodatek KSCN (539 mg, 5,54 mmol), pri katerem smo počakali, da se je med mešanjem raztopil (približno 30 min). Šele nato smo po kapljicah dodali brom (0,143 mL, 2,77 mmol), ki smo ga raztopili v očetni kislini (3 mL). Po dodatku broma smo počakali še 15 min preden smo odstranili ledeno kopel in reakcijsko zmes pustili mešati pri sobni temperaturi čez noč. Reakcijsko zmes smo nevtralizirali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (400 mL), dodali EtOAc (2 × 50 mL) in naredili ekstrakcijo. Organsko fazo smo sušili nad Na₂SO₄, filtrirali in odstranili EtOAc pri znižanem tlaku. Produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo (suh nanos v EtOAc, MF: etilacetat/heksan = 1/6). Izkoristek reakcije: 15,5 %; kristali (145 mg); tališče: 119–123 °C; R_f (etilacetat/heksan = 1/2): 0,16; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,01 (s, 1H, Ar-H), 7,85 (s, 2H, NH₂), 6,79 (s, 1H, Ar-H), 3,76 (s, 3H, CH₃), 0,99 (s, 9H, 3 × CCH₃), 0,19 (s, 6H, 2 × SiCH₃) ppm; MS (ESI) $m/z = 339,2$ ([M+H]⁺).

5. Rezultati in razprava

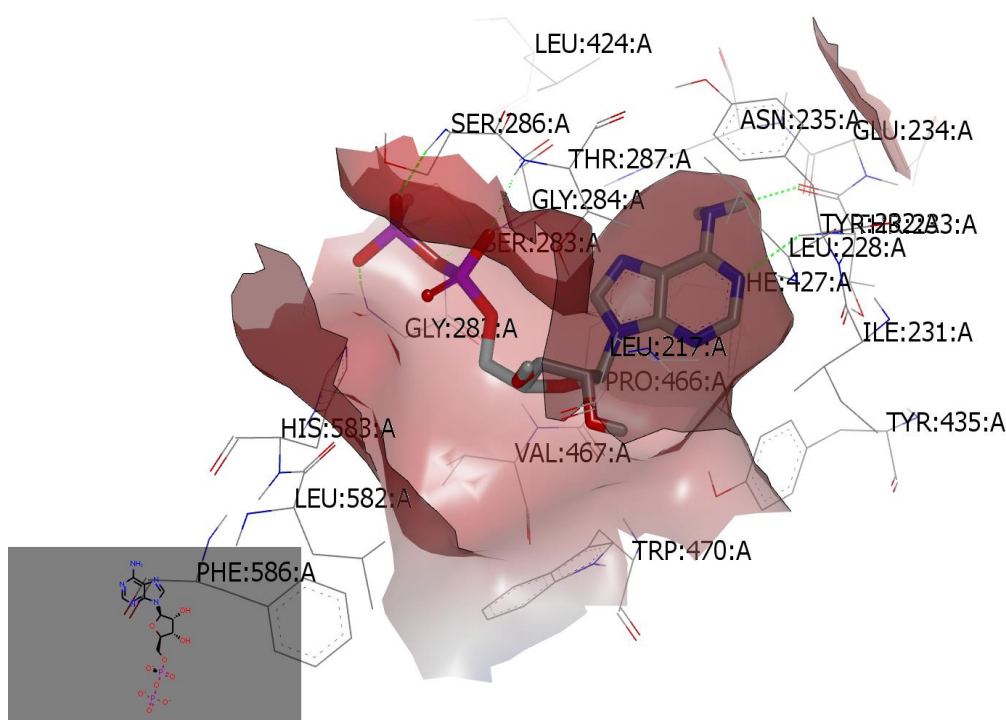
5.1 Komentar molekulskega modeliranja inhibitorjev NOD2

Pri vrednotenju molekulskega sidranja smo uporabili cenilno funkcijo Chemgauss4. Ta vrednoti položaj liganda v vezavnem mestu, vodikove vezi med ligandom in proteinom, vpliv topila na vodikove vezi in interakcije s kovinskimi molekulami proteina ter kelatorskimi skupinami v ligandu. Za naše molekule sta bili najpomembnejši oblika in tvorba vodikovih vezi. Najbolj negativne vrednosti cenilne funkcije Chemgauss4 predstavljajo predvideno najboljšo vezavo.

Vizualni pregled vezave ligandov v vezavno mesto receptorja NOD2 smo naredili s programom VIDA 4.3.0.4. Nekaj vezav iz posameznih knjižnic smo prikazali v preglednicah v nadaljevanju.

5.1.1 Knjižnica fragmentov

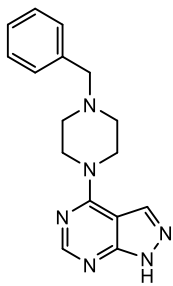
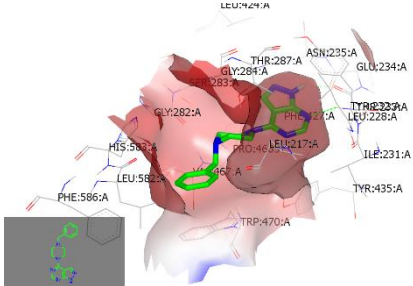
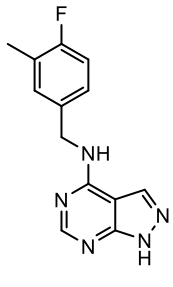
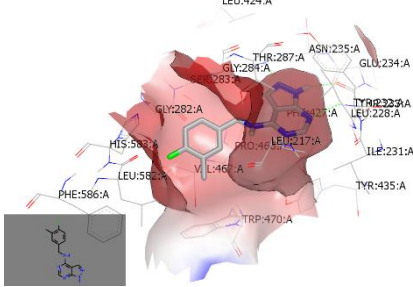
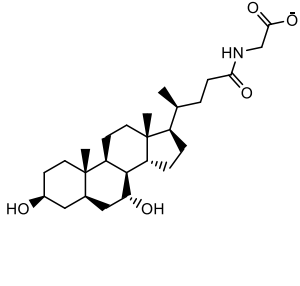
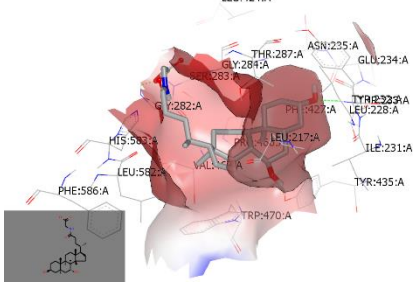
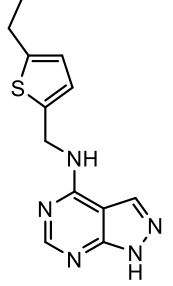
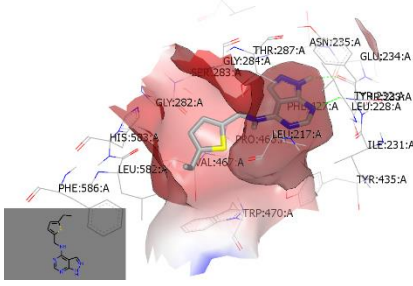
Pri sidranju knjižnice fragmentov smo pregledali prvih 100 spojin (Preglednica I). Hitro smo ugotovili, da se je med rezultati znašlo kar nekaj struktur s steroidnim skeletom. Takšen skelet nas ni zanimal, saj je malo verjetno, da bi spojina s steroidnim skeletom posnemala

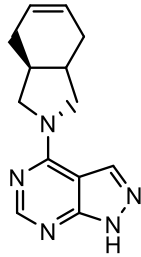
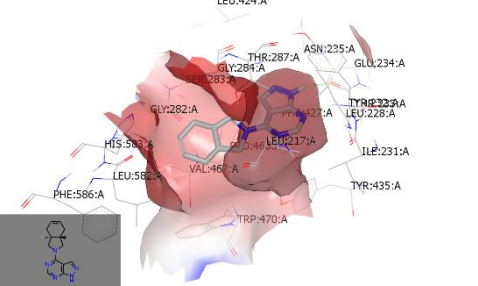
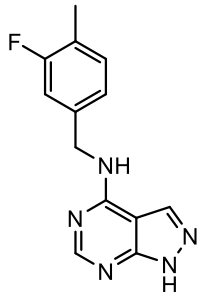
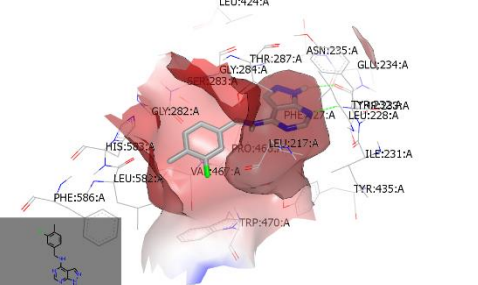
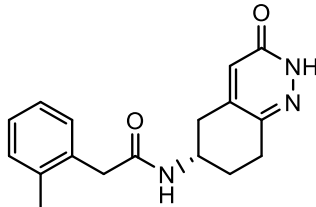
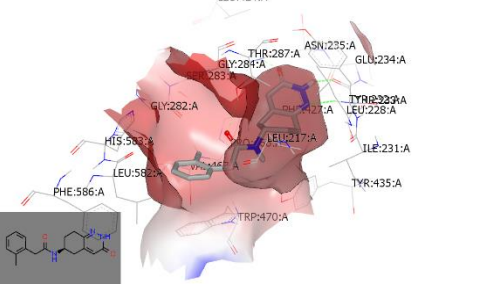
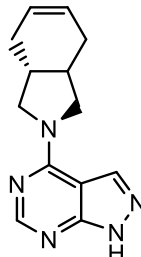
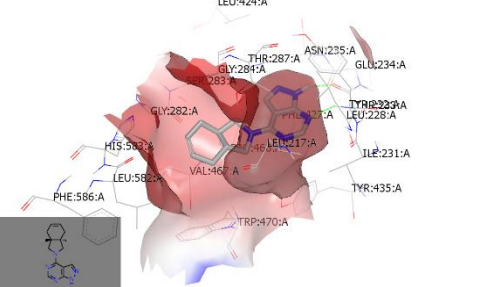
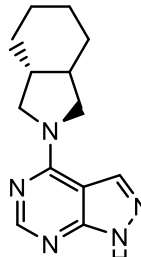
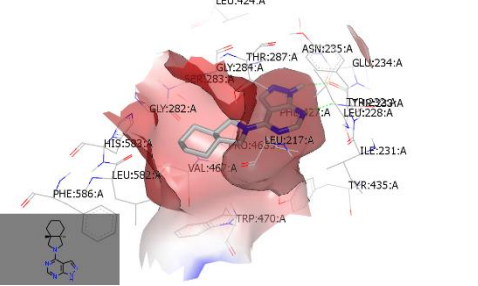


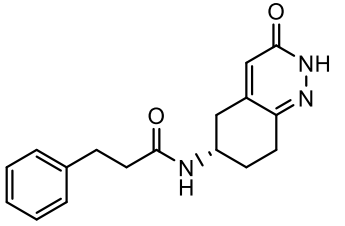
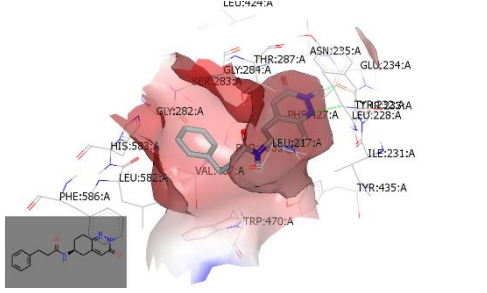
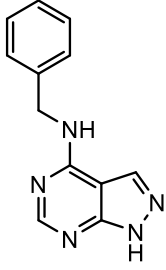
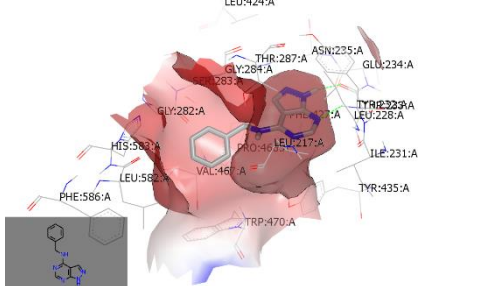
Slika 14: Slika vezave ATP v vezavnem mestu receptorja NOD2. Zeleni črtkani črti v adeninskem delu ATP prikazujeta tvorbo vodikovih vezi z aminokislinskim ostankom Thr233.

vezavo molekule ATP (Slika 14). Zaradi večjega števila visoko rangiranih spojin s 1*H*-pirazol[3,4-*d*]pirimidinskim skeletom (Slika 13) smo se odločili, da bomo pripravili ciljno knjižnico s tem strukturnim skeletom kot osnovo.

Preglednica I: Prikaz 11 najboljših rangiranih spojin sidranja knjižnice fragmentov.

Rang	Struktura	FRED Chemgau ss4 score	Slika vezave molekule v vezavnem mestu
1		-18,1103	
2		-17,2925	
3		-17,0317	
4		-16,9744	

5		-16,9729	
6		-16,6624	
7		-16,5752	
8		-16,5156	
9		-16,4730	

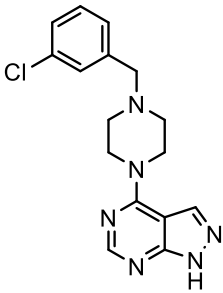
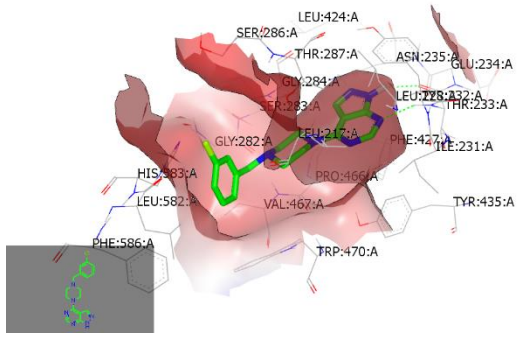
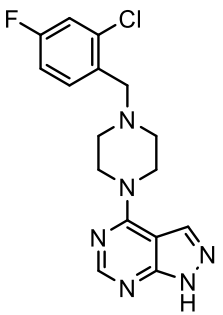
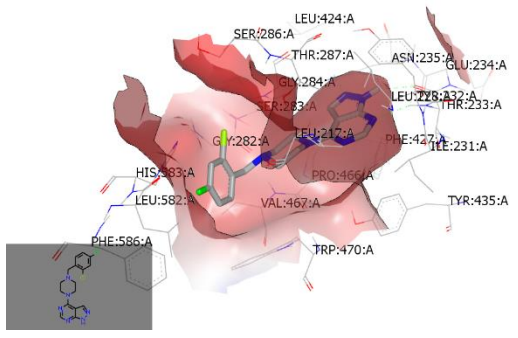
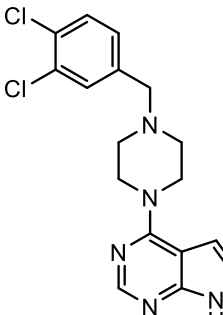
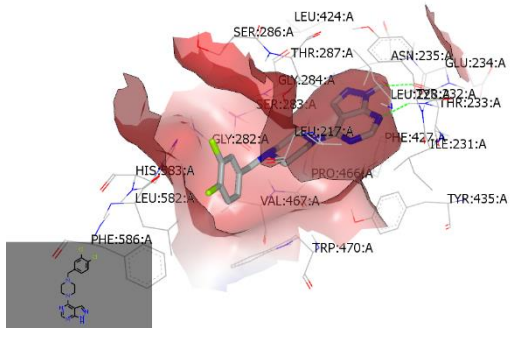
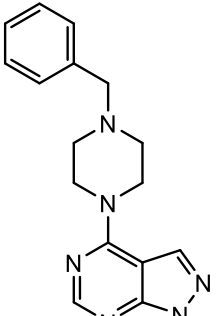
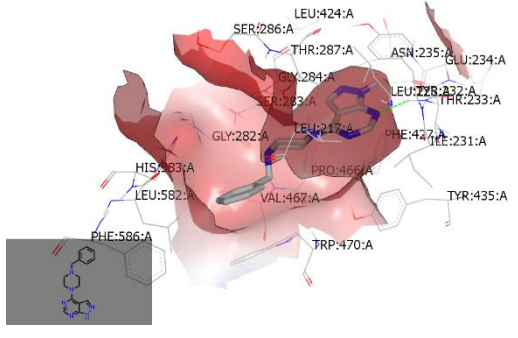
10		-16,4695	
11		-16,2661	

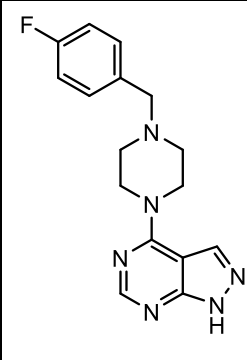
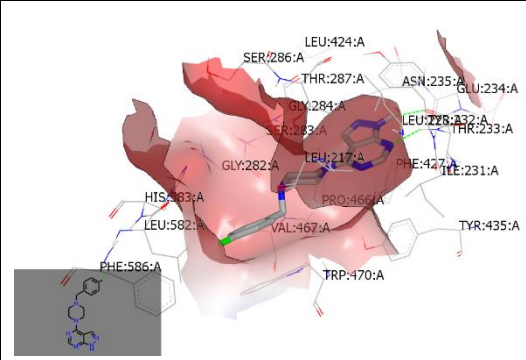
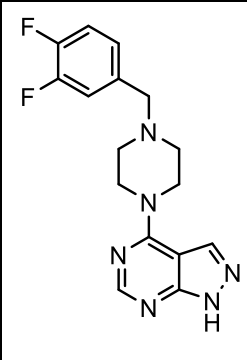
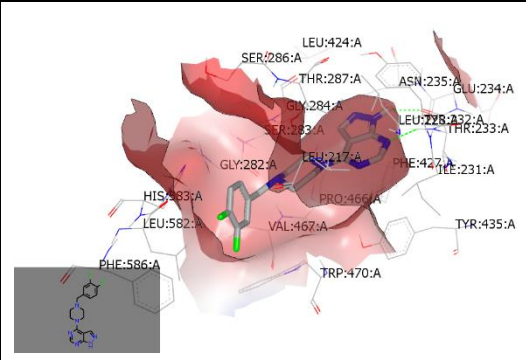
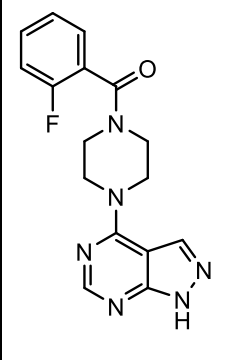
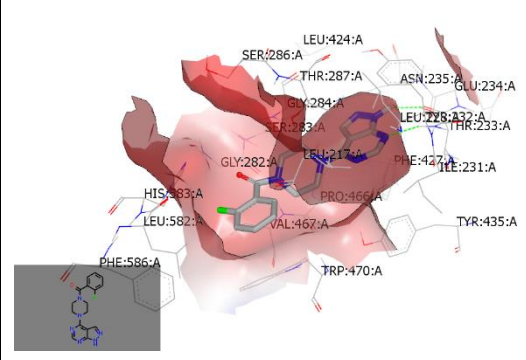
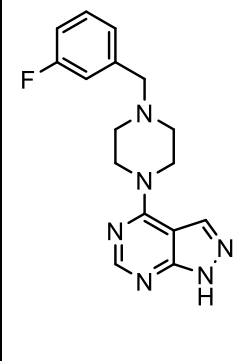
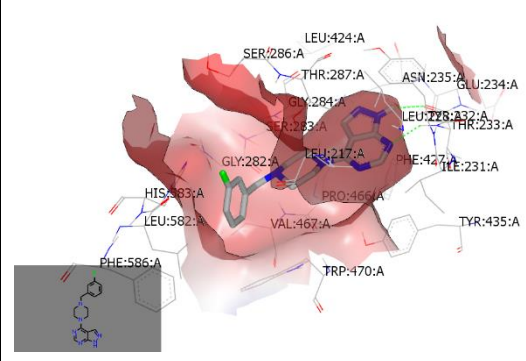
5.1.2 Ciljana knjižnica

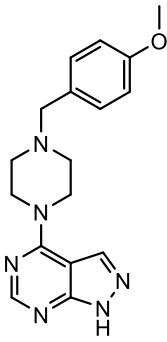
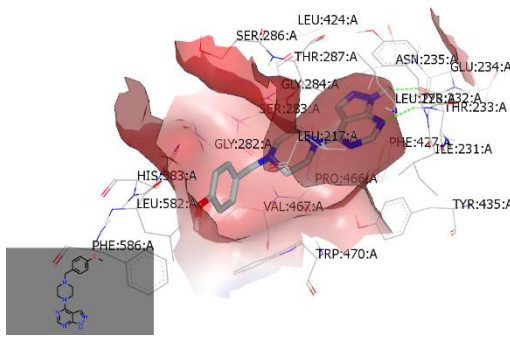
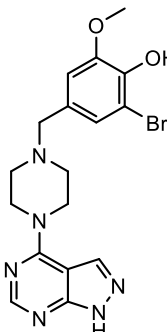
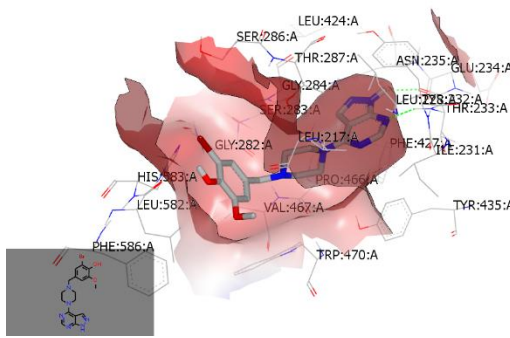
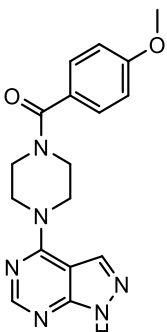
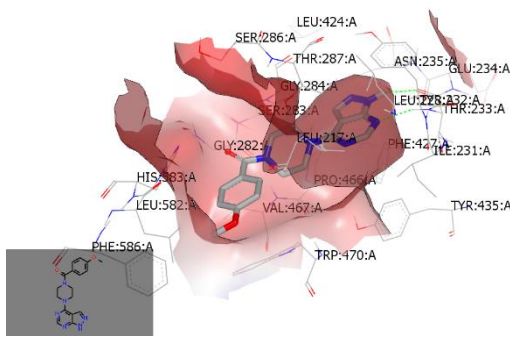
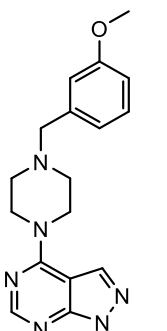
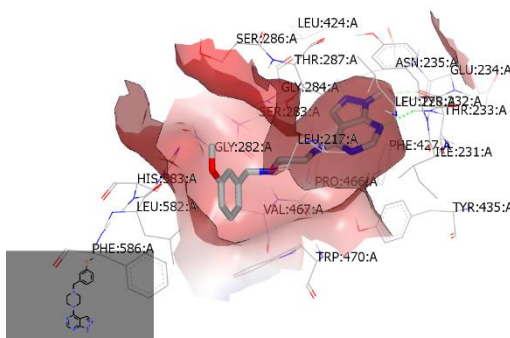
Na podlagi 1*H*-pirazol[3,4-*d*]pirimidinskega skeleta (Slika 13) smo sestavili ciljano knjižnico spojin, ki bi jih lahko sintetizirali (Preglednica II). Ta skelet se nam je zdel dobra izbira, saj tvori tri vodikove vezi z proteinom v adeninskem žepu (žep v katerega se veže adeninski del molekule ATP). Z aminokislinskim ostankom Thr233 tvori eno donorsko in eno akceptorsko vodikovo vez, z ostankom Asn235 pa tvori akceptorsko vodikovo vez. Najbolj so nas zanimala strukture, ki bi bile podobne najvišje rangirani spojini sidranja knjižnice fragmentov. Za 1-benzilpiperazilni fragment smo se odločili, da je dobra iztočnica za pripravo različni struktur. Ker pa nismo želeli ostati samo pri eni večji strukturi, smo za nadaljnje sidranje dodali še nekaj spojin, ki niso vsebovale tega strukturnega fragmenta. Iz tabele vseh reagentov, ki so na zalogi Fakultete za farmacijo v Ljubljani, smo izbrali takšne fragmente, ki bi nam omogočili sintezo izbranih spojin.

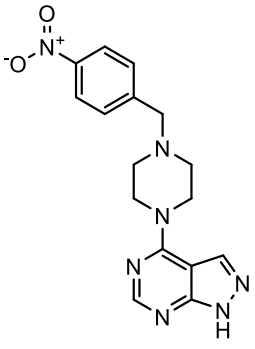
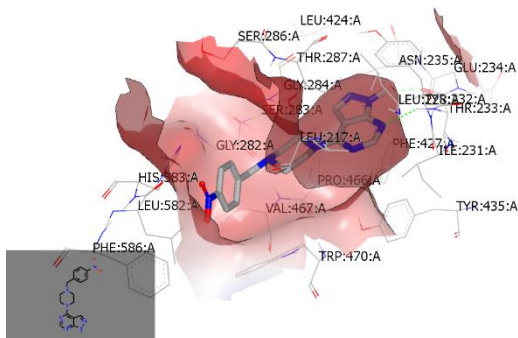
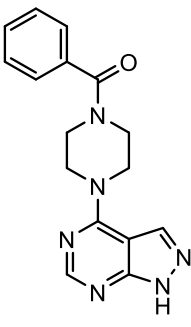
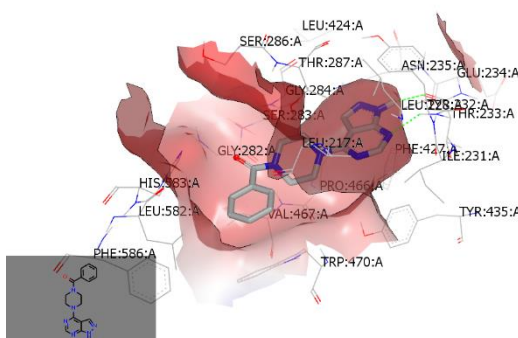
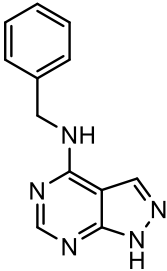
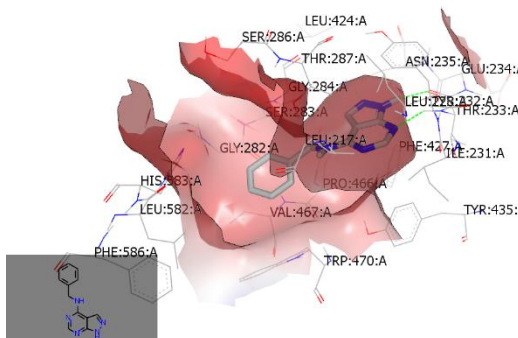
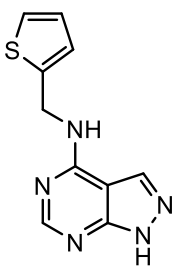
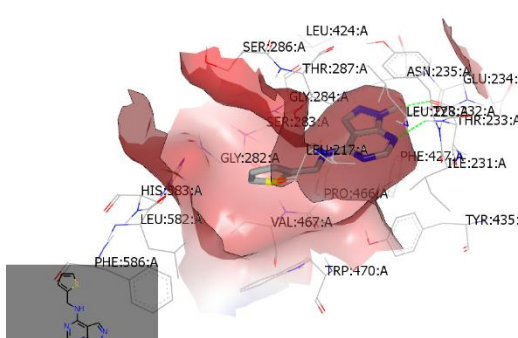
Iz rezultatov sidranja ciljane knjižnice vidimo, da je piperazinski del molekule dober distančnik za fenilni obroč. Ta se postavi na drugo stran v žep, ki ga tvorijo aminokislinski ostanki Val467, Trp470, Leu582, His583 in Phe586. V tem žepu pride predvsem do hidrofobnih interakcij in možne π - π interakcije med fenilnim obročem potencialnega zaviralca in aromatskim obročem Trp470.

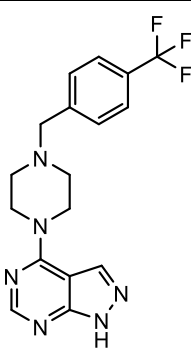
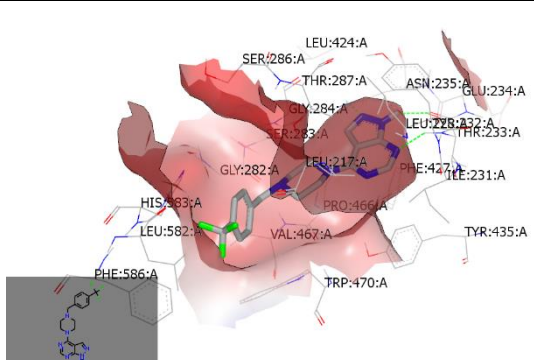
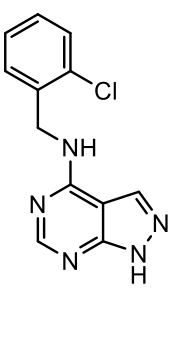
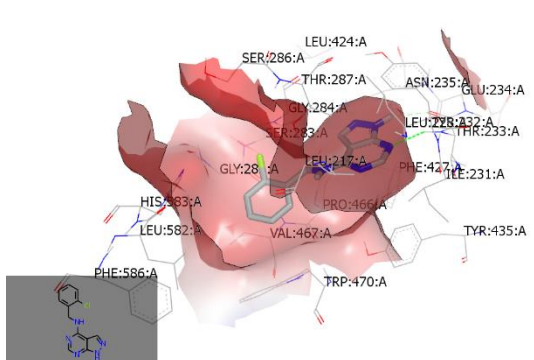
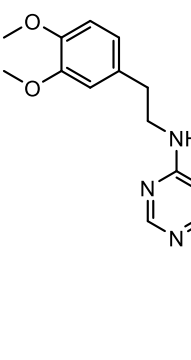
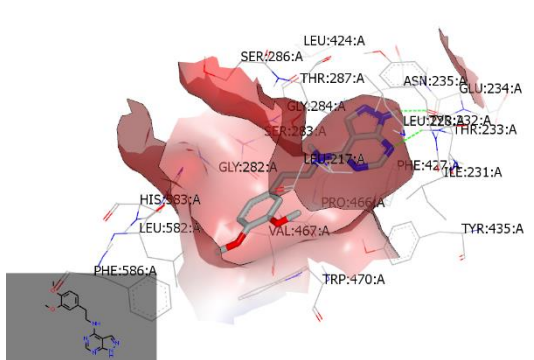
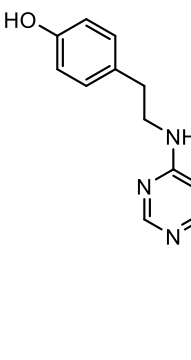
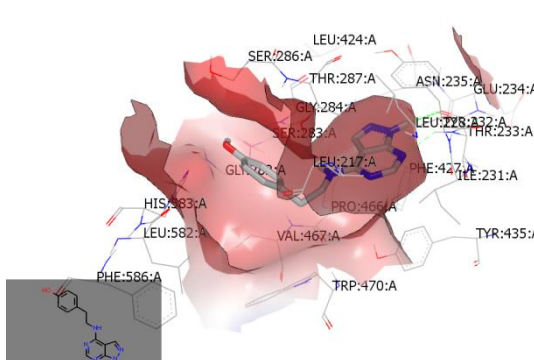
Preglednica II: Ciljana knjižnica spojin.

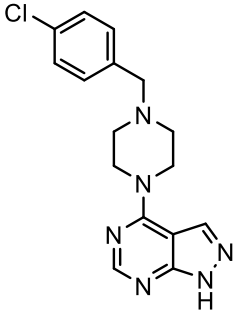
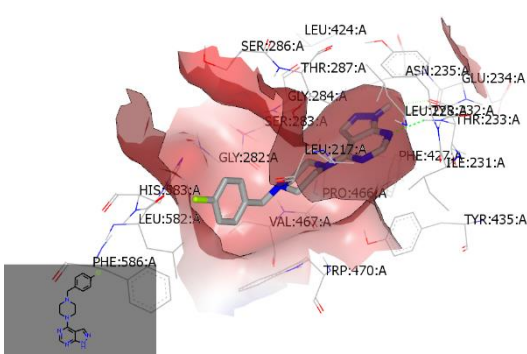
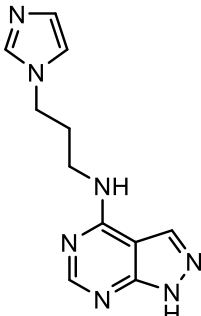
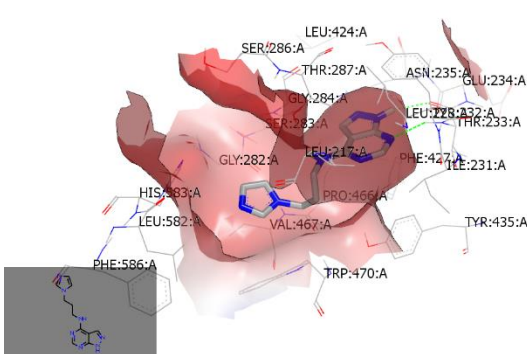
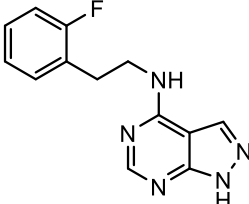
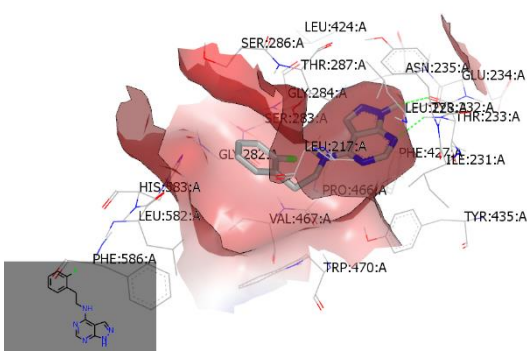
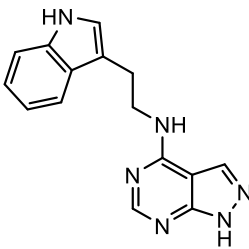
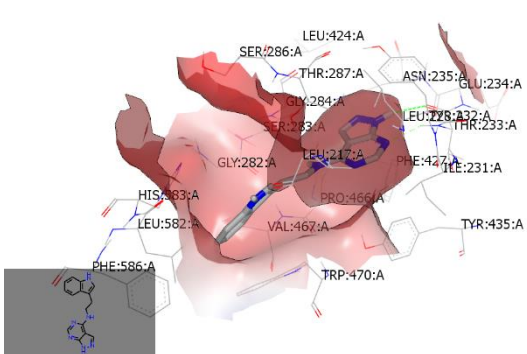
Rang	Struktura	FRED Chemgauss 4 score	Slika vezave molekule v vezavnem mestu
1		-18,3928	
2		-18,1554	
3		-18,1128	
4		-18,1102	

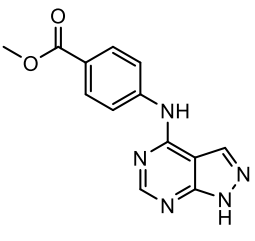
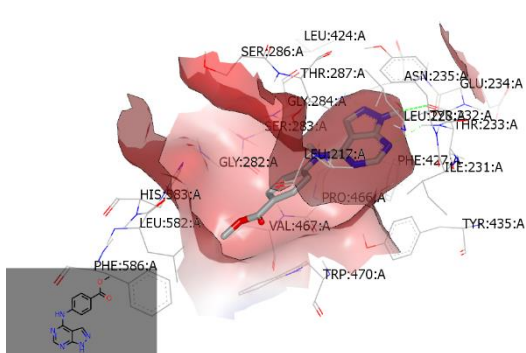
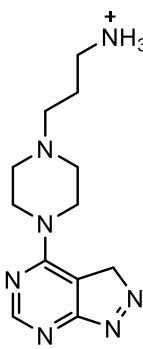
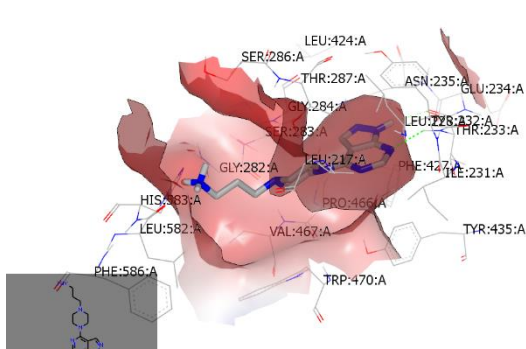
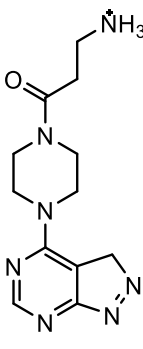
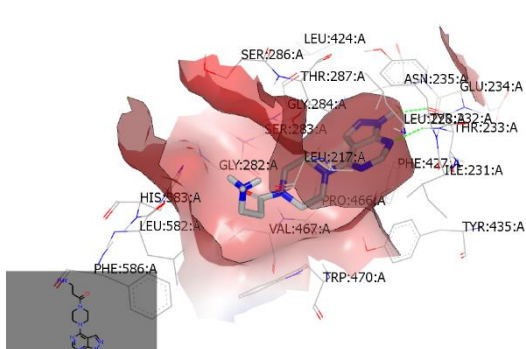
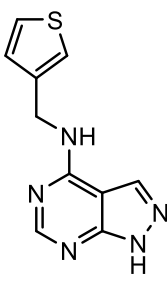
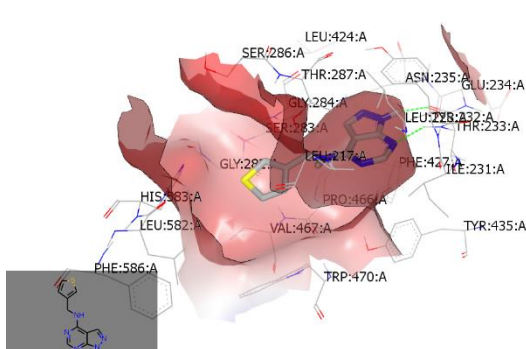
5	 <chem>Fc1ccc(cc1)CN2CCN(C2)c3nc4c(ncn4)nc3</chem>	-18,0618	
6	 <chem>Fc1cc(F)ccc1CN2CCN(C2)c3nc4c(ncn4)nc3</chem>	-17,9921	
7	 <chem>Fc1ccccc1C(=O)N2CCN(C2)c3nc4c(ncn4)nc3</chem>	-17,5517	
8	 <chem>Fc1cccc(c1)CN2CCN(C2)c3nc4c(ncn4)nc3</chem>	-17,3315	

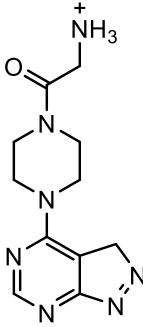
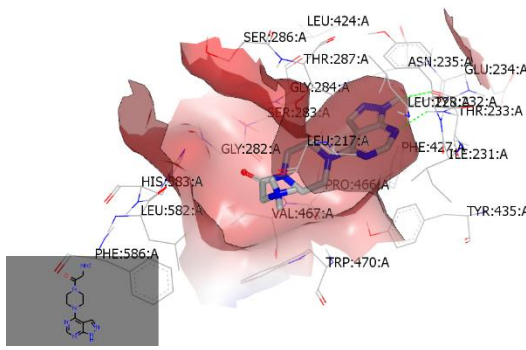
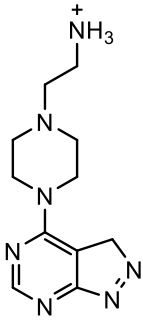
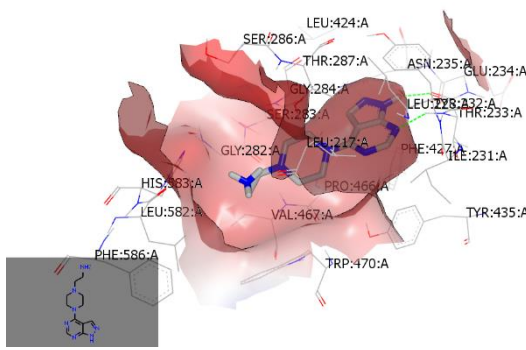
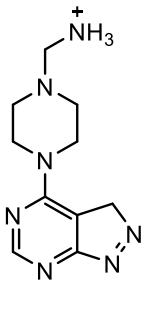
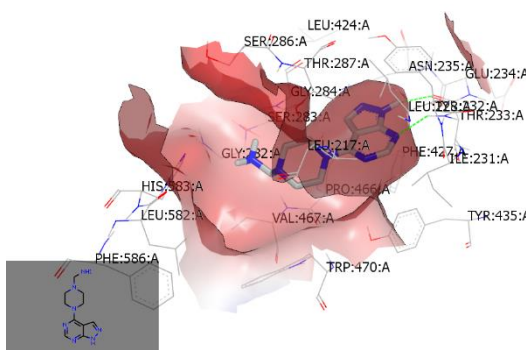
9		-17,3068	
10		-16,6865	
11		-16,5551	
12		-16,4887	

13	 <chem>O=[N+]([O-])c1ccc(cc1)CN2CCN(CC2)c3cnc4c[nH]43</chem>	-16,4248	
14	 <chem>O=C(c1ccccc1)N2CCN(CC2)c3cnc4c[nH]43</chem>	-16,3878	
15	 <chem>Nc1cnc2c[nH]2c1Cc3ccccc3</chem>	-16,2661	
16	 <chem>Nc1cnc2c[nH]2c1Cc3ccsc3</chem>	-16,2225	

17	 <chem>FC(F)(F)c1ccc(cc1)CN2CCNCC2</chem>	-16,0237	
18	 <chem>Clc1ccccc1CNc2nc3ncnc3n2</chem>	-15,9869	
19	 <chem>COc1ccc(OC)cc1CNc2nc3ncnc3n2</chem>	-15,9647	
20	 <chem>Oc1ccc(cc1)CNc2nc3ncnc3n2</chem>	-15,9439	

21	 <chem>Clc1ccc(cc1)CN2CCNCC2c3nc4c(ncn4)nc3</chem>	-15,8915	
22	 <chem>Cc1ccc(cc1N)cn2cncn2</chem>	-15,8080	
23	 <chem>Fc1ccccc1CNCC</chem>	-15,6866	
24	 <chem>Cc1ccc2c(c1)c(c[nH]2)CCCN</chem>	-15,6365	

25	 <chem>COc1ccc(Nc2nc3ncnc3n2)cc1</chem>	-15,5566	
26	 <chem>[NH3+]CCN1CCN(C1c2nc3ncnc3n2)CC</chem>	-15,5406	
27	 <chem>CC(=O)CN1CCN(C1c2nc3ncnc3n2)CC</chem>	-15,2364	
28	 <chem>C1=CC=C(S1)CNc2nc3ncnc3n2</chem>	-14,8052	

29		-14,7531	
30		-14,2902	
31		-13,5942	

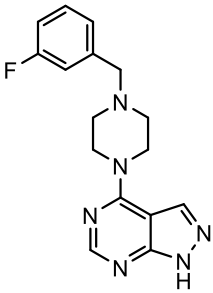
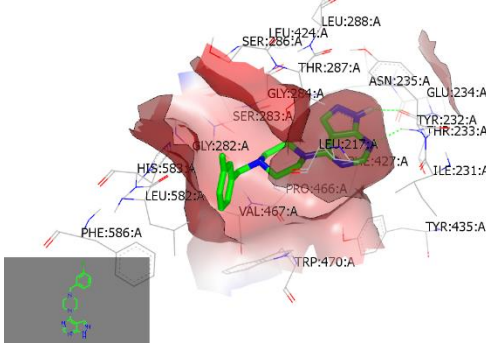
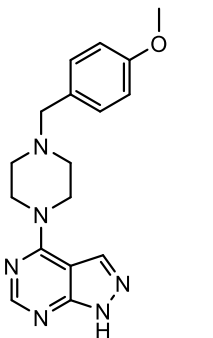
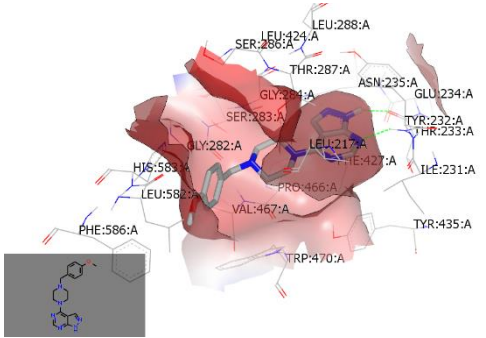
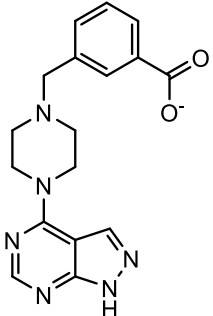
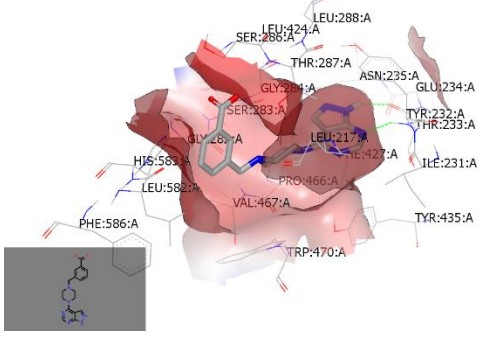
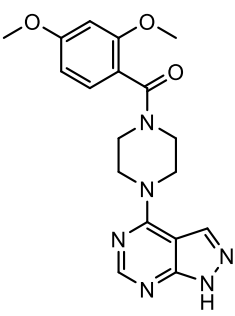
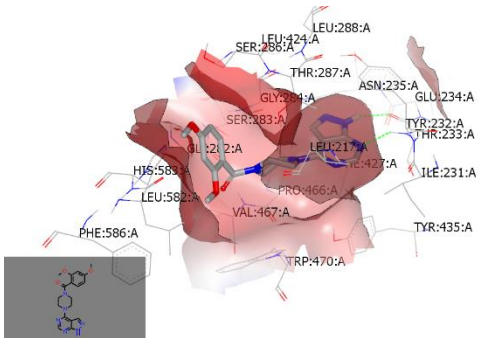
5.1.3 Sintetizirane spojine

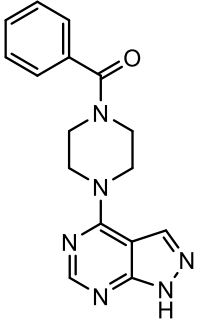
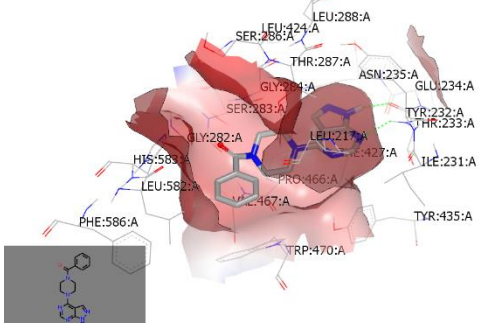
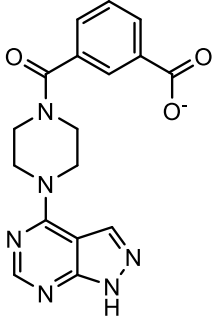
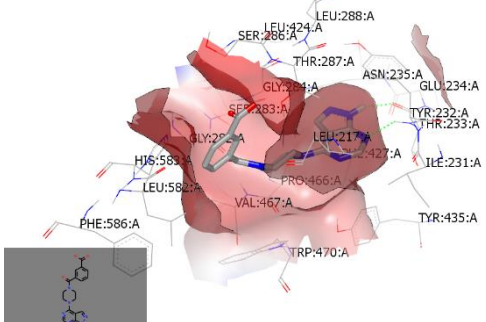
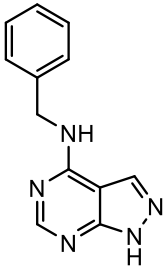
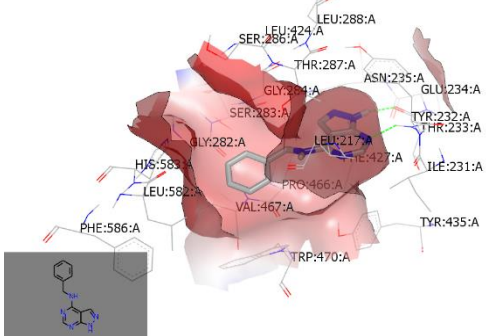
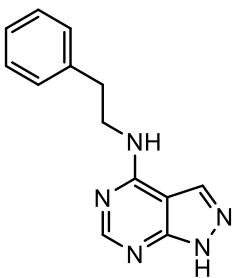
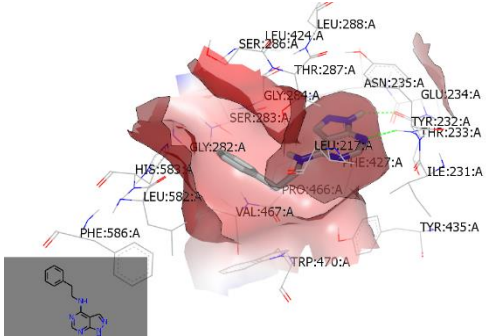
Spojine, ki smo jih sintetizirali, se razlikujejo od spojin v ciljani knjižnici (Preglednica III). Do tega je prišlo, ker smo želeli sintezno pripraviti spojine različnih strukturnih tipov. Rezultati *in silico* namreč niso vedno skladni z rezultati *in vitro*.

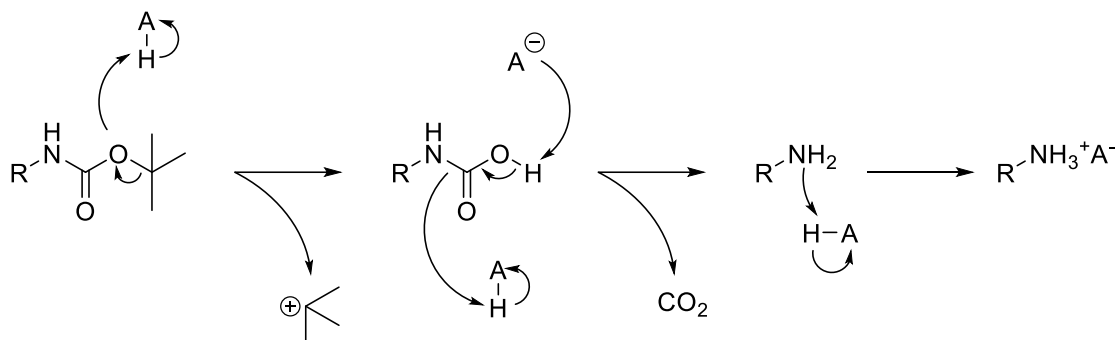
Za sintezo spojin **7**, **9** in **10c** smo se odločili, ker nas je zanimalo, kakšen je vpliv kisle ali bazične funkcionalne skupine na vezavo.

Spojina **2** je bila zadetek že pri prvem sidranju knjižnice fragmentov. Enaki rezultati Chemgauss 4 pri vseh treh sidranjih spojine **2** nam povejo, da algoritem programa deluje zanesljivo in se lahko zanesemo na ponovljivost rezultatov.

Preglednica III: Sidranja molekul, ki smo jih sintetizirali.

Rang	Številka spojine	Struktura	FRED Chemgau ss4 score	Slika vezave molekule v vezavnem mestu
1	10a		-17,3315	
2	10b		-17,3068	
3	10c		-17,0104	
4	8b		-16,6448	

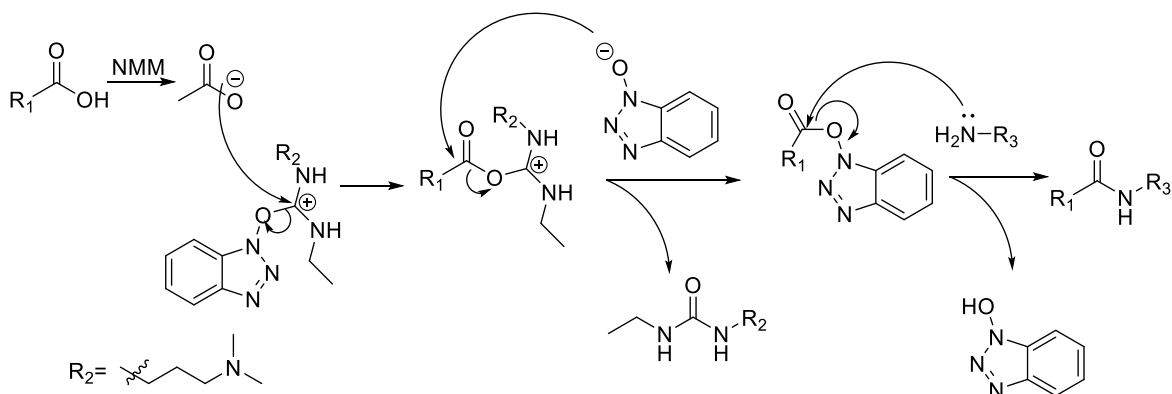
5	<u>8a</u>		-16,3878	
6	<u>9</u>		-16,3256	
7	<u>2</u>		-16,2661	
8	<u>3</u>		-15,4372	



Shema 7: Mehanizem odstranitve zaščitne skupine Boc, pri čemer A predstavlja kislino (v našem primeru TFA in HCl). Prirejeno po (43).

5.2.3 Tvorba amida s sklopitvenim reagentom

Za tvorbo amidne vezi potrebujemo karboksilno kislino in amin. Da reakcija poteče hitreje in pri sobni temperaturi, smo uporabili sklopitveni reagent, ki pretvori OH skupino karboksilne kisline v boljše izstopajočo skupino oziroma poveča elektrofilnost skupine COOH. Pri tvorbi amidnih vezi spojin **6a**, **6b**, **8a**, **8b** in **8c** smo uporabili sklopitvena reagenta EDC in HOBT ter bazo NMM, ki kot baza odtegne proton od kisline ter jo pretvori v ionsko obliko (Shema 8). Ionizirana karboksilna kislina nato z EDC tvori aktiviran ester, ki ga napade HOBT. Pri tem se EDC pretvori v derivat uree, ki ga kasneje odstranimo pri ekstrakciji s kislno vodno raztopino. S HOBT aktiviran ester napade amin, ki ga dodamo v reakcijsko zmes z zakasnitvijo. Pri tem pride do nastanka amida in regeneracije HOBT, ki ima pri reakciji sklopitve vlogo pomožnega nukleofila, ki pospeši potek reakcije (45).

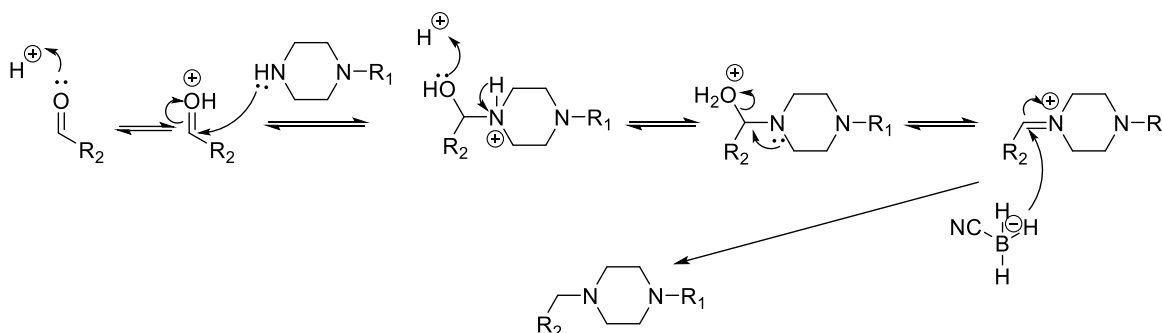


Shema 8: Mehanizem tvorbe amida s sklopitvenima reagentoma EDC in HOBT ob prisotnosti baze NMM. Prirejeno po (44, 45).

5.2.4 Reduktivno aminiranje

Za pripravo spojin **10a**, **10b** in **10c** smo izvedli reduktivno aminiranje (Shema 9). To je reakcija amina z aldehydom, pri kateri nastane imin, ki ga z dodatkom reducenta reduciramo do amina. Kot reducenta smo uporabljali NaCNBH_3 in $\text{Na}(\text{CH}_3\text{COO})_3\text{BH}$. Slednja sta za razliko od NaBH_4 šibkejša reducenta, kar je za reduktivno aminiranje zaželeno, zato da ne pride do redukcije aldehida preden bi le-ta tvoril imin.

Pri reakciji najprej poteče reverzibilna nukleofilna adicija, pri kateri se tvori imin. Imini so pogosto nestabilni, zato že v začetku dodamo reducent, s katerim pride do ireverzibilne redukcije imina do amina. Pri eksperimentalnem delu smo pri reakcijah reduktivnega aminiranja dodali tudi Et_3N , zato da smo pretvorili protonirano obliko piperazina v prosto obliko, ki je lahko napadla elektrofilni karbonilni ogljik aldehida (46, 47).



Shema 9: Mehanizem reduktivnega aminiranja z NaCNBH_3 . Prirejeno po (48,49).

5.2.5 Ciklizacija metil 2-amino-5-hidroksibenzo[*d*]tiazol-6-karboksilata

Pri ciklizaciji benzotiazolnega skeleta smo uporabili znani postopek (Shema 3), ki so ga do sedaj uporabljali na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. V ohlajeno reakcijsko zmes smo najprej dodali KSCN in mešali, da se je raztopil. To je trajalo približno 30 min, odvisno od količine topila in količine KSCN . Bučko smo vsake toliko časa vzeli iz ledene kopeli, saj očetna kislina zmrzne pri $16,7^\circ\text{C}$. Šele, ko je bil KSCN popolnoma raztopljen, smo začeli po kapljicah dodajati raztopino broma v očetni kislini. Z mehanizmom elektrofilne aromatske substitucije se brom veže na mesto 5 spojine **15** (Shema 10). Iz stranskega produkta **16b** reakcije pa smo ugotovili, da reakcija poteče tudi na mesto 3. Pri tem mehanizmu reakcije aminska skupina nukleofilno napade elektrofilni ogljikov atom KSCN . Očetna kislina, kot polarno protično topilo, poveča elektrofilnost tiocianata. Tiolna skupina nato napade aromatski ogljik, ki ima vezan brom (50).

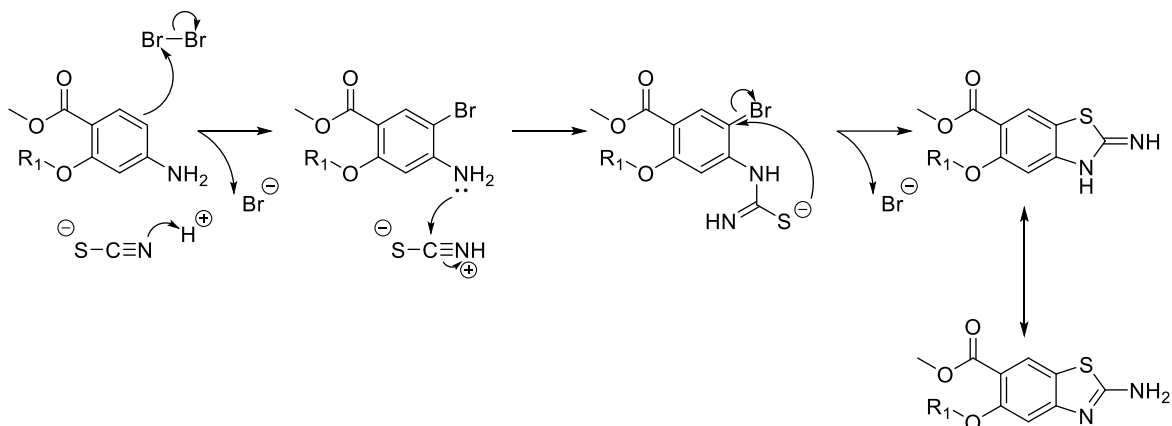
Pri reakciji ciklizacije spojine **16a** nastane veliko stranskih produktov. S čiščenjem na koloni smo uspeli odstraniti večji del nečistot, ostal je le stranski produkt **16b** in spojina **17** z že odstranjeno acetilno zaščitno skupino na skupini OH. Zaradi podobnih fizikalno-kemijskih lastnosti spojin **16a**, **16b** in **17** nam ni uspelo popolnoma očistiti produkta. Zanimivo je, da nečistočo **16b** vidimo pod UV pri 254 nm in 366 nm za razliko od spojin **16a** in **17**. Sklepamo, da položaj OH na mestu 7 pri spojini **16b** omogoči tvorbo dodatne tautomerne oblike, ki je vidna pri 366 nm.

Zaradi zelo slabega izkoristka ciklizacije smo poskusili stopenjsko ciklizacijo. Najprej smo želeli pripraviti bromiran produkt spojine **15**. Pri tej reakciji smo uspešno izolirali spojino **18**, pri kateri je bil brom vezan na ustreznem mestu za nadaljnjo ciklizacijo. To mesto bi preprečilo nastanek spojine **16b**, ki nam je oteževala čiščenje. Žal pa pri naslednji stopnji reakcije, ko smo dodali KSCN, ni prišlo do ciklizacije (Shema 4).

Nato smo poizkusili reakcijo peljati v drugem vrstnem redu. Najprej bi tvorili derivat tiouree in nato dodali brom, da bi prišlo do ciklizacije. Pri tem sinteznem načrtu pa nam že prva reakcija ni potekla (Shema 4).

Iz poizkusa stopenjske sinteze sklepamo, da je pomembna prisotnost obeh reagentov (brom in KSCN) hkrati, da pride do ciklizacije.

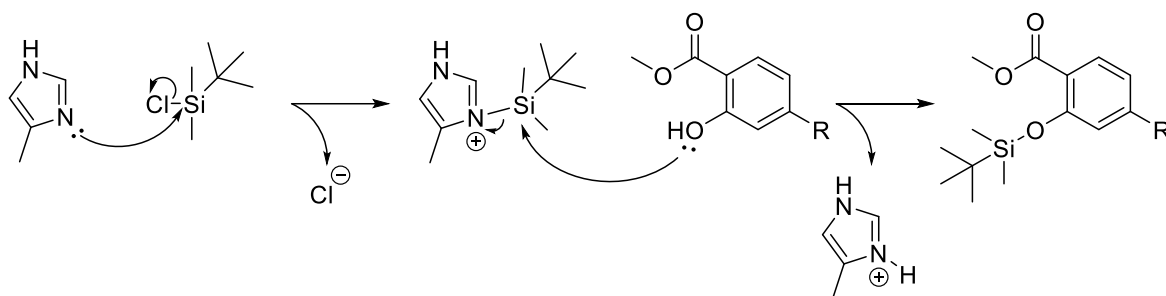
Iz znanih poizkusov ciklizacije na hidroksibenzotiazolnih skeletih, na Katedri za farmacevtsko kemijo, Fakultete za farmacijo v Ljubljani, vemo, da mora biti pri ciklizaciji hidroksilna skupina zaščitena, drugače ciklizacija ne poteče. Zato smo uporabili zaščitno skupino TBDMS za zaščito skupine OH, ki jo pri ciklizaciji metil 2-amino-5-hidroksibenzo[*d*]tiazol-6-karboksilata še niso preizkusili. Ciklizacijo smo izvedli z enakim postopkom in pod enakimi pogoji kot ciklizacijo iz spojine **15**, le da smo razpolovili količini broma in KSCN. Pri reakciji je vseeno nastalo kar nekaj nečistoč, ki pa smo jih s kolonsko kromatografijo uspešno odstranili (Shema 5). Zanimivo je tudi, da tokrat nismo dobili stranskega produkta ciklizacije, pri katerem bi bila hidroksilna skupina na mestu 7 benzotiazola. Sklepamo, da do tega ni prišlo, ker je bilo mesto 5 spojine **21** sterično ovirano s strani zaščitne skupine TBDMS. To se ne zgodi pri ciklizaciji iz spojine **15**, saj je acetilna zaščitna skupina bistveno manjša kot TBDMS.



Shema 10: Mehanizem ciklizacije benzotiazolov. R_1 = acetil ali TBDMS. Prirejeno po (50).

5.2.6 Uvedba *tert*-butildimetilsililne zaščitne skupine (TBDMS)

Kot nov način zaščite hidroksilne skupine smo torej izbrali TBDMS. Ta zaščitna skupina je primerna za uporabo zaradi dobre stabilnosti. Njena odstranitev pa poteka v bazičnem ali kislem (pH=1, sobna T) okolju. Za uvedbo zaščitne skupine smo uporabili *tert*-butilklorodimetilsilan in dodatek 4-metilimidazola, ki je v reakciji deloval kot aktivator zaščitne skupine TBDMS (Shema 11). Brez aktivatorja in presežka *tert*-butilklorodimetilsilana reakcija poteka zelo počasi in s slabšimi izkoristki. Pri aktivaciji pride do napada nukleofilnega dušika 4-metilimidazola na *tert*-butilklorodimetilsilan in do nastanka reaktivnega *N-tert*-butildimetilsilil-4-*1H*-metilimidazola (51). Sledi tvorba etra z nukleofilno hidroksilno skupino.

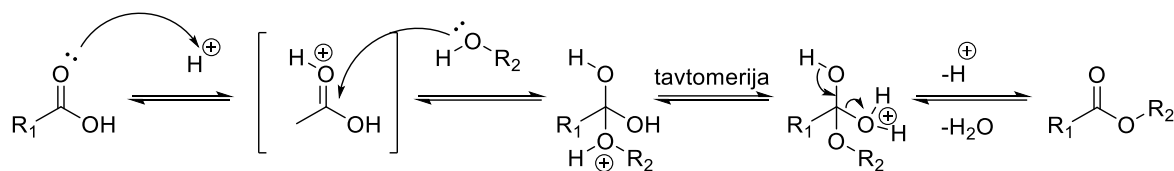


Shema 11: Mehanizem tvorbe zaščitne skupine TBDMS, uporabljene pri tvorbi spojin **20** in **21**. Prirejeno po (51).

5.2.7 Fischer-jeva esterifikacija (tvorba metilnega estra)

Tvorba estrov je mogoča na več načinov. Med pogosto uporabljene načine sodijo kislinsko katalizirana tvorba estra, tvorba estra s sklopitvenim reagentom in tvorba estra s kislinskim kloridom ali anhidridi. Pri našem eksperimentalnem delu smo metilni ester spojine **12** tvorili

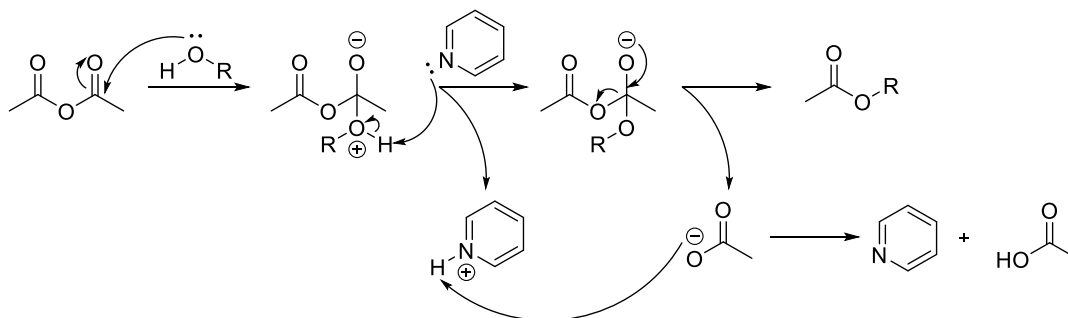
s kislinso katalizirano reakcijo oz. Fischer-jevo esterifikacijo, pri kateri smo kot kislinso uporabili koncentrirano žveplovo(VI) kislino (H_2SO_4). Kislina poveča elektrofilnost karbonilnega ogljika, na katerega sledi napad nukleofilnega alkohola. V naši reakciji je bilo topilo hkrati tudi alkohol, ki vstopa v reakcijo. Mehanizem reakcije prikazuje Shema 12.



Shema 12: Mehanizem Fischer-jeve esterifikacije. Prirejeno po (52).

5.2.8 Uvedba acetilne zaščitne skupine

Uvedba acetilne zaščitne skupine na hidroksilno skupino spojine **13** je potrebna za uspešno ciklizacijo. To je reakcija tvorbe estra, ki smo ga v tem primeru tvorili iz acetanhidrida. Pri reakciji sodeluje še piridin, ki deprotonira nastali produkt nukleofilnega napada alkohola. Protoniran piridin na koncu odda proton nastali očetni kislini. Mehanizem reakcije je prikazan na Shemi 13.

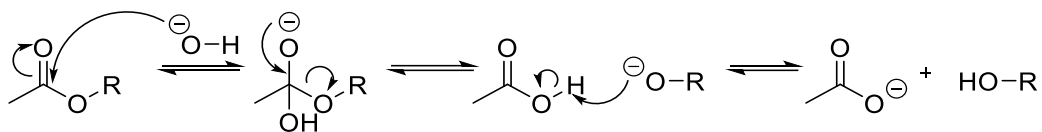


Shema 13: Mehanizem tvorbe estra preko acetanhidrida. Prirejeno po (53).

5.2.9 Hidroliza estra

Hidroliza estra lahko poteče pri kislinski ali bazični pogoji. Pri sintezi spojine **17** smo se odločili za bazično hidrolizo acetilnega estra, ki jo imenujemo saponifikacija (Shema 14). Pri sintezi spojine **16a** (ciklizacija), je prišlo do delne hidrolize produkta **16a** v **17**. S kolonsko kromatografijo nismo uspeli ločiti te zmesi, zato smo izvedli bazično hidrolizo ($\text{pH}=12$) kar na zmesi. Reakcijske zmesi pri tem nismo segrevali, ker nismo želeli, da bi prišlo do dodatne hidrolize metilnega estra. Metilni aromatski ester je za razliko od acetilnega estra, ki smo ga želeli cepiti, bistveno bolj stabilen pri višjem pH. Za cepitev

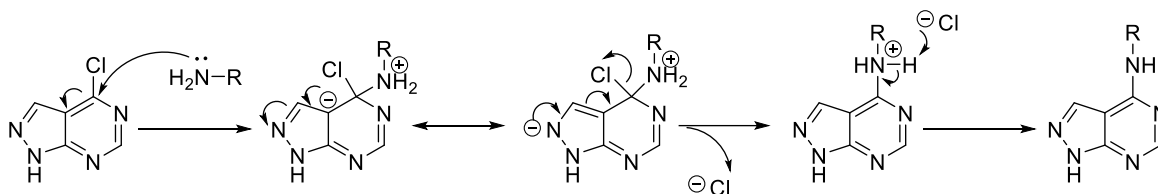
metilnega aromatskega estra zato pogosto uporabimo pH višji od 12 in segrevanje pri povišani temperaturi.



Shema 14: Mehanizem saponifikacije. Prirejeno po (54).

5.2.10 Tvorba aril aminov

Sintezni reakciji spojin **2** in **3** potekata po mehanizmu nukleofilne aromatske substitucije (Shema 15). V prvem delu pride do nukleofilne adicije amina na aromatski ogljik, ki ima vezan klor. Sledi resonančna stabilizacija v pirazolni obroč. Na koncu pa pride do eliminacije klora, ki odcepi proton iz amina in tako nastane klorovodikova kislina.



Shema 15: Predlagan mehanizem tvorbe aril aminov. Prirejeno po (54).

6. Sklep

V okviru magistrske naloge smo se lotili dveh različnih področij. Na imunološkem področju, vezanem na receptorje NOD2, smo z računalniško podprtim načrtovanjem poiskali nove potencialne spojine, ki se vežejo v ATP vezavno mesto tega receptorja. Sintezno smo pripravili šest končnih spojin. Drugo področje so predstavljali inhibitorji DNA-giraze. V tem delu smo optimizirali postopek sinteze pomembnega vmesnega produkta **17**, ki se bo uporabljal za sintezo različnih inhibitorjev GyrB.

Z virtualnim reševanjem smo sidrali knjižnico skoraj 250.000 fragmentov in iz rezultatov ugotovili, da imajo spojine z 1*H*-pirazol[3,4-*d*]pirimidinskim skeletom dobro vezavo v adeninski žep receptorja NOD2, saj v njem tvorijo tri vodikove vezi z receptorjem. Iz spojin s takšnim strukturnim delom smo pripravili ciljno knjižnico, s pomočjo katere smo se odločili za sintezo določenih spojin. Za nadaljnje vrednotenje spojin bi bilo smiselno izvesti celične teste, da bi ugotovili katere spojine inhibirajo NOD2 in bi zato bile primerne za nadaljnjo optimizacijo. S temi testi bi dobili tudi povratno informacijo o tem ali rezultati molekulskega sidranja korelirajo z *in vitro* celičnim testom. Tako bi opredelili smiselnost nadaljnjega računalniškega modeliranja spojin za omenjeno vezavno mesto.

Pri optimizaciji ciklizacije vmesnega produkta inhibitorja DNA-giraze nam je postopek uspelo izboljšati s spremembo hidroksilne zaščitne skupine. Namesto acetilne zaščitne skupine smo uporabili zaščitno skupino TBDMS. Izkoristek same ciklizacije smo s tem dvignili iz 4,7 % na 15,5 %. Celokupni izkoristek sintezne poti iz začetne spojine **11** in do cikliziranega produkta z odščitenjo hidroksilno skupino **17** pa smo povečali iz 1,6 % na 9,7 % (pri predpostavki, da poteka odščitenje TBDMS brez izgub). Prav tako smo skrajšali čas poteka sintez iz 11 dni na 6 dni in število reakcij, potrebnih za sintezo ciklizirane spojine, iz 6 na 3 (brez upoštevanja odščitenja TBDMS zaščite). Odščitenje TBDMS zaščitne skupine nismo izvedli, saj je naslednja stopnja tvorba amida z derivati pirola na aaminski skupini spojine **17**, zato prosta hidroksilna skupina ni potrebna. Naša sinteza se je pred stopnjo tvorbe amida z derivati pirola zaključila. Če bi nadaljevali s to stopnjo, bi eno izmed končnih spojin lahko dobili z dvojno cepitvijo zaščitne skupine TBDMS in metilnega estra, z bazično hidrolizo pri povišani temperaturi. Z različnimi derivati spojine **17** upamo, da bomo odkrili inhibitor DNA-giraze z zelo dobrim protibakterijskim delovanjem proti po Gramu negativnim in/ali pozitivnim bakterijam.

7. Literatura

- (1) Flaherty D: Immunology for pharmacy, Mobsy, St. Louis, 2012: 15-22.
- (2) Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S: Cellular and Molecular Immunology, Saunders, Philadelphia, 2015: 1-12, 51-86.
- (3) Proell M, Riedl, SJ, Fritz JH, Rojas AM, Schwarzenbacher R: The Nod-like receptor (NLR) family: a tale of similarities and differences. PLoS One 2008; 3, 2119.
- (4) https://openi.nlm.nih.gov/imgs/512/152/4095565/PMC4095565_fimmu-05-00327-g001.png (28.7.2018).
- (5) Geddes K, Magalhães JG, Girardin SE: Unleashing the therapeutic potential of NOD-like receptors. Nat Rev Drug Discov. 2009; 8(6): 465-79.
- (6) Franchi L, Warner N, Viani K, Nuñez G: Function of NOD-like receptors in microbial recognition and host defense. Immunol Rev. 2009; 227: 106-28.
- (7) Kutikhin AG: Role of NOD1/CARD4 and NOD2/CARD15 gene polymorphisms in cancer etiology. Hum Immunol. 2011; 72: 955-68.
- (8) Khan PM, Correa RG, Divlianska DB, Peddibhotla S, Hampton Sessions E, Magnuson G, Brown B, Suyama E, Yuan H, Mangravita-Novo A, Vicchiarelli M, Su Y, Vasile S, Smith LH, Diaz PW, Reed JC, Roth GP: Identification of inhibitors of NOD1-induced nuclear factor- κ B activation. ACS Med Chem Lett. 2011; 2: 780-785.
- (9) Sukhithasri V, Nisha N, Biswas L, Kumar VA in Biswas R: Innate immune recognition of microbial cell wall components and microbial strategies to evade such recognitions. Microbiol Res. 2013; 168(7): 396-406.
- (10) Tanabe T, Chamaillard M, Ogura Y, Zhu L, Qiu S, Masumoto J, Ghosh P, Moran A, Predergast MM, Tromp G, Williams CJ, Inohara N, Nuñez G: Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. EMBO J. 2004; 23: 1587-97.
- (11) Mayor A, Martinon F, De Smedt T, Pétrilli V, Tschopp J: A crucial function for SGT1 and Hsp90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses. Nat. Immunol. 2007; 8: 497-503.
- (12) Zurek B, Proell M, Wagner RN, Schwarzenbacher R, Kufer TA: Mutational analysis of human NOD1 and NOD2 NACHT domains reveals different modes of activation. Innate Immun. 2012; 18: 100-11.

- (13) Hasegawa M, Fujimoto Y, Lucas PC, Nakano H, Fukase K, Núñez G, Inohara N: A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF-kappaB activation. *EMBO J.* 2008; 27(2): 373-83.
- (14) Jakopin Ž: Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) inhibitors: A rational approach toward inhibition of NOD signaling pathway. *J Med Chem.* 2014; 57, 6897-918.
- (15) Negoni A, Pierdomenico M, Cucchiara S, Stronati L: NOD2 and inflammation: current insights. *J Inflamm Res.* 2018; 11: 49-60.
- (16) Kanneganti TD, Lamkanfi M, Núñez G: Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity.* 2007; 27(4): 549-59.
- (17) Henckaerts L, Vermeire S: NOD2/CARD15 disease associations other than Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2007; 13: 235-41.
- (18) De Jager PL, Graham R, Farwell L, Sawcer S, Richardson A, Behrens TW, Compston A, Hafler DA, Kere J, Vyse TJ, Rioux JD: The role of inflammatory bowel disease loci in multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Genes Immun.* 2006; 7: 327-34.
- (19) Joosten LA, Heinhuis B, Abdollahi-Roodsaz S, Ferwerda G, Lebourhis L, Philpott DJ, Nahori MA, Popa C, Morre SA, van der Meer JW, Girardin SE, Netea MG, van der Berg WB: Differential function of the NACHT-LRR (NLR) members Nod1 and Nod2 in arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105: 9017-22.
- (20) da Silva Correia J, Miranda Y, Leonard N, Hsu J, Ulevitch RJ: Regulation of Nod1-mediated signaling pathways. *Cell Death Differ.* 2007; 14: 830-9.
- (21) da Silva Correia J, Miranda Y, Austin-Brown N, Hsu J, Mathison J, Xiang R, Zhou H, Li Q, Han J, Ulevitch RJ: Nod1-dependent control of tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(6): 1840-45.
- (22) Kang MJ, Heo SK, Song EJ, Kim DJ, Han SY, Ham JH, Kim BY, Park JH: Activation of NOD1 and NOD2 induces innate immune responses of prostate epithelial cells. *Prostate.* 2012; 72: 1351- 58.
- (23) Rickard DJ, Sehon CA, Kasparcova V, Kallal LA, Haile PA, Zeng X, Montoute MN, Poore DD, Li H, Wu Z, Eidam PM, Emery JG, Marquis RW, Gough PJ, Bertin J: Identification of selective small molecule inhibitors of the Nucleotide-binding Oligomerization Domain 1 (NOD1) signaling pathway. *PLoS One.* 2014; 9(5): 1-12.

- (24) Rebane A, Zimmermann M, Aab A, Baurecht H, Koreck A, Karelson M, Abram K, Metsalu T, Pihlap M, Meyer N, Fölster-Holst R, Nagy N, Kemeny L, Kingo K, Vilo J, Illig T, Akdis M, Franke A, Novak N, Weidinger S, Akdis CA: Mechanisms of IFN- γ - induced apoptosis of human skin keratinocytes in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2012; 129: 1297-306.
- (25) Correa RG, Milutinovic S, Reed JC: Roles of NOD1 (NLRC1) and NOD2 (NLRC2) in innate immunity and inflammatory diseases. *Biosci Rep*. 2012; 608: 597-608.
- (26) Maekawa S, Ohto U, Shibata T, Miyake K, Shimizu T: Crystal structure of NOD2 and its implications in human disease. *Nat Commun*. 2016; 7(5): 1-11
- (27) Durcik M, Lovison D, Skok Ž, Durante Cruz C, Tammela P, Tomašič T, Benedetto Tiz D, Draskovits G, Nyerges, Á, Pál C, Ilaš, J, Peterlin Mašič L, Kikelj D, Zidar N: New N-phenylpyrrolamide DNA gyrase B inhibitors: Optimization of efficacy and antibacterial activity. *Eur J Med Chem*. 2018; 154: 117-32.
- (28) Butler MS, Blaskovich MAT, Cooper MA: Antibiotics in the clinical pipeline at the end of 2015. *J Antibiot (Tokyo)*. 2017; 70: 3-24.
- (29) Williams DA, Lemke TL: Foye's Principles of Medicinal Chemistry 7th ed, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2013: 1078-84.
- (30) Levy SB, Marshall B: Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med*. 2004; 10(12): 122-29.
- (31) Santajit S, Indrawattana N: Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Biomed Res Int*. 2016; 2475067.
- (32) Boyer R: Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana 2005: 244-82.
- (33) http://csls-text3.c.u-tokyo.ac.jp/large_fig/c_fig06_04.html (28.7.2018)
- (34) Schoeffler AJ, Berge JM: DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. *Q Rev Biophys*. 2008; 41(1): 41-101.
- (35) Khana T, Sankheb K, Suvarna V, Sherjea A, Patela K, Dravyakar B: DNA gyrase inhibitors: Progress and synthesis of potent compounds as antibacterial agents. *Biomed Pharmacother*. 2018; 103: 923-38.
- (36) Bush NG, Evans-Roberts K, Maxwell A: DNA Topoisomerases. *EcoSal Plus*. 2015; 0010-2014.
- (37) Tomašič T, Peterlin Mašič L: Prospects for Developing New Antibacterials Targeting Bacterial Type IIA Topoisomerases. *Curr Top Med Chem*. 2014; 14(1), 130-51.

- (38) Gubaev A, Klostermeier D: DNA-induced narrowing of the gyrase N-gate coordinates T-segment capture and strand passage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(34): 14058-90.
- (39) Oblak M, Kotnik M, Solmajer T: Discovery and Development of ATPase Inhibitors of DNA Gyrase as Antibacterial Agents. *Curr Med Chem*. 2007; 14(19), 2033-47.
- (40) Gjorgjieva M, Tomašič T, Barančokova M, Katsamakos S, Ilaš J, Tammela P, Peterlin Mašič L, Kikelj D: Discovery of Benzothiazole Scaffold-Based DNA Gyrase B Inhibitors. *J Med Chem*. 2016; 59(19): 8941-54.
- (41) Vilaivan T: A rate enhancement of tert-butoxycarbonylation of aromatic amines with Boc₂O in alcoholic solvents. *Tetrahedron Lett*. 2006; 47: 6739-42.
- (42) http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_Mech.htm (dostopano 29.7.2018).
- (43) http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_TFA_Mech.htm (dostopano 29.7.2018).
- (44) Balalaie S, Mahdidoust M, Eshaghi-Najafabadi R.: 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Tetrafluoroborate as an Efficient Coupling Reagent for the Amidation and Phenylhydrazation of Carboxylic Acids at Room Temperature. *J Iran Chem Soc*. 2007; 4(3): 364-9.
- (45) http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Amine_to_Amide_Coupling/Amine_to_Amide_Coupling_HOBT_EDC_Mech.htm (dostopano 29.7.2018).
- (46) 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. *J Org Chem*. 1996; 61: 3849-62.
- (47) Brown WH, Iverson BL, Anslyn A, Foote CS: *Organic Chemistry*, 7 ed. Cengage Learning, ZDA, 2013: 401-50.
- (48) <https://www.masterorganicchemistry.com/2010/05/24/imines-and-enamines/> (dostopano 29.7.2018).
- (49) http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Reductive_Amination/Reductive%20Amination_NaCNBH3_Mech.htm (dostopano 30.7.2018).
- (50) Tišler M. *Organska kemija*, 2. Izdaja, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, 2013: 303–5.

- (51) <https://www.organic-chemistry.org/protectivegroups/hydroxyl/tbdms-ethers.htm>
(dostopano 30.7.2018).
- (52) <https://www.organic-chemistry.org/namedreactions/fischer-esterification.shtm>
(dostopano 30.7.2018).
- (53) [https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Organic_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Organic_Chemistry\)/Anhydrides/Reactivity_of_Anhydrides/Acid_Anhydrides_react_with_alcohols_to_form_esters](https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Organic_Chemistry/Supplemental_Modules_(Organic_Chemistry)/Anhydrides/Reactivity_of_Anhydrides/Acid_Anhydrides_react_with_alcohols_to_form_esters) (dostopano 30.7.2018).
- (54) Clayden J, Greeves N, Warren S: Organic chemistry 2 ed., Oxford University Press, New York, 2012: 262, 515.