

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



ASJA FRANK

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA NOVIH ANTAGONISTOV
RECEPTORJEV NOD2 Z BENZIMIDAZOLNIM SKELETOM**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF NOVEL NOD2 ANTAGONISTS
BASED ON A BENZIMIDAZOLE SCAFFOLD**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

LJUBLJANA, 2016

Magistrsko delo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Žige Jakopina. Analize spojin so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo in na Inštitutu Jožefa Stefana v Ljubljani.

ZAHVALA

Iskreno bi se rada zahvalila mentorju doc. dr. Žigi Jakopinu za vso pomoč, potrpežljivost, nasvete in predloge med delom v laboratoriju in pri pisanju magistrske naloge. Rada bi se zahvalila tudi zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo, kjer so bila izvedena vsa biološka testiranja. Zahvaljujem se tudi svoji družini in fantu za vso podporo in spodbudo, ki so mi jo izkazovali tekom študija. Hvala vam.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Žige Jakopina, mag. farm.

Ljubljana, 2016

Asja Frank

Predsednik komisije: prof. dr. Albin Kristl, mag. farm.

Član komisije: asist. dr. Meta Kokalj Ladan, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	I
POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
KLJUČNE BESEDE.....	VII
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
UVOD	1
1.1 IMUNSKI SISTEM	1
1.2 RECEPTORJI ZA PREPOZNAVO VZORCEV (PRR)	4
1.2.1 NOD-u podobni receptorji (NLR)	4
1.3 RECEPTORJA NOD1/2	5
1.3.1 Bakterijska celična stena	5
1.3.2 Struktura NOD2.....	6
1.3.3 Muramil dipeptid	6
1.3.4 Signalna pot.....	7
1.3.5 Regulacija signalne poti receptorjev NOD2.....	8
1.3.6 Fiziološki pomen receptorjev NOD.....	8
1.3.7 Povezava proteinov NOD z boleznimi	8
1.3.8 Terapevtski potencial	9
1.4 ZNANI LIGANDI NOD2	9
1.4.1 Agonisti.....	9
1.4.2 Antagonisti	10
NAMEN DELA	15
MATERIALI IN METODE	16
EKSPERIMENTALNI DEL	19

1.5	Reakcijska shema 1:.....	19
1.5.1	Sinteza terc-butil (S)-(1-((2-amino fenil)amino)-1-oksopropan-2-il)karbamata (1)	20
1.5.2	Sinteza terc-butil (S)-(1-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)etil) karbamata (2)	21
1.5.3	Sinteza etil (S)-2-(2-(1-((terc-butoksikarbonil)amino)etil)-1H-benzoimidazol-1-il)acetata (3).....	22
1.5.4	Sinteza etil (S)-2-(2-(1-benzoamidoetil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetata (4)	24
1.5.5	Sinteza (S)-N-(1-(1-(2-((2,3-dihidro-1H-inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etil)benzamida (5)	25
1.6	Reakcijska shema 2:.....	27
1.6.1	Sinteza 4-((terc-butoksikarbonil)amino)butanojske kisline (6)	28
1.6.2	Sinteza terc-butil (4-((2-amino fenil)amino)-4-oksobutil)karbamata (7)	29
1.6.3	Sinteza terc-butil (3-(1H-benz[d]imidazol-2-il)propil)karbamata (8)	30
1.6.4	Sinteza etil 2-(2-(3-((terc-butoksikarbonil)amino)propil)-1H-benzoimidazol-1-il)acetata (9).....	31
1.6.5	Sinteza etil 2-(2-(3-benzamidopropil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetata (10)	32
1.6.6	Sinteza N-(3-(1-(2-((2,3-dihidro-1H-inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)propil)benzamida (11)	34
1.7	Reakcijska shema 3:.....	36
1.7.1	Sinteza (terc-butoksikarbonil)glicina (13)	37
1.7.2	Sinteza terc-butil (2-((2-amino fenil)amino)-2-oksoetil)karbamata (13)	38
1.7.3	Sinteza terc-butil ((1H-benz[d]imidazol-2-il)metil)karbamata (14).....	39
1.7.4	Sinteza etil 2-(2-(((terc-butoksikarbonil)amino)metil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetata (15).....	40
1.7.5	Sinteza etil 2-(2-(benzamidometil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetata (16)..	41

1.7.6	Sinteza N-((1-(2-((1H-inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)benzamida (17).....	42
1.8	Reakcijska shema 4:.....	44
1.8.1	Sinteza etil 2-(2-(2-((terc-butoksikarbonil)amino)etil)-1H-benz[d]imidazol-1-il)acetata (18).....	45
1.8.2	Sinteza etil 2-(2-(2-benzamidoetil)-1H-benzoimidazo-1-il)acetata (19).....	46
1.8.3	Sinteza N-(2-(1-(2-((2,3-dihidro-1H-inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1H-benzoimidazol-2-il)etil) benzamida (20).....	47
1.9	Reakcijska shema 5:.....	49
1.9.1	Sinteza (terc-butoksikarbonil)-D-alanina (21)	50
1.9.2	Sinteza terc-butil (R)-(1-((2-aminofenil)amino)-1-oksopropan-2-il)karbamata (22)	51
1.9.3	Sinteza terc-butil (R)-(1-(1H-benz[d]imidazol-2-il)etil)karbamata (23).....	52
1.9.4	Sinteza etil (R)-2-(2-(1-((terc-butoksikarbonil)amino)etil)-1H-benz[d]imidazol-1-il)acetata (24)	53
1.9.5	Neuspešen poskus sinteze spojine 25, sinteza (S)-1-metil-1,2-dihidrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a]pirazin-3(4H)-ona (25).....	54
1.9.6	Sinteza etil (R)-2-(2-(1-benzamidoetil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetata (26)	56
1.9.7	Sinteza (R)-N-(1-(1-(2-((2,3-dihidro-1H-inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etil)benzamida (27)	57
1.10	Reakcijska shema 6:	59
1.10.1	Sinteza 4-okso-4-(fenilamino)butanojske kisline (28)	60
1.10.2	Sinteza N1-(2-aminofenil)-N4-fenilsukcinamida (29)	61
1.10.3	Sinteza 3-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)-N-fenilpropanamida (30).....	62
1.10.4	Sinteza etil 2-(2-(3-okso-3-(fenilamino)propil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetata (31).....	63

1.10.5	Sinteza	3-(1-(2-((2,3-dihidro-1H-inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-N-fenilpropanamida (32).....	64
REZULTATI IN RAZPRAVA			66
1.11	Uvajanje boc-zaščite.....		66
1.12	Aciliranje 1,2-diaminobenzena		67
1.13	Ciklizacija		68
1.14	Odstranitev boc zaščite in aciliranje prostega amina		69
1.15	Alkiliranje obročnega dušika		70
1.16	Alkalna hidroliza estra.....		72
1.17	Tvorba amidne vezi		72
1.18	Biološko testiranje.....		74
1.18.1	Test citotoksičnosti		74
1.18.2	Preizkus antagonistične aktivnosti in selektivnosti na receptorjih NOD1 in NOD2		76
SKLEPI			80
LITERATURA			81

POVZETEK

Imunski sistem je prva obrambna linija telesa. Delimo ga na prirojenega in pridobljenega. Prirojeni imunski sistem je tisti, ki prepozna okužbe z mikroorganizmi. Za to so pomembni tudi receptorji za prepoznavo vzorcev (PRR), ki prepoznajo mikrobne komponente »pathogen-associated microbial patterns« (PAMP). Proteini NLR so ena izmed glavnih poddružin proteinov prirojenega imunskega sistema in kot znotrajcelični PRR-ji zaznavajo v citoplazmi prisotne PAMP. Mednje spadata receptorja NOD1 in NOD2, ki igrata pomembno vlogo pri imunskem odgovoru gostitelja, saj prepoznavata komponente bakterijskega peptidoglikana, kar vodi do aktivacije signalnih poti NF- κ B, MAPK in vnetnega odgovora.

Po drugi strani pa polimorfizmi posameznih nukleotidov in mutacije v genu, ki kodira protein NOD2, vodijo do kroničnih vnetnih nepravilnosti, avtoimunskih bolezni in rakavih obolenj.

V okviru magistrske naloge smo sintetizirali 6 antagonistov receptorja NOD2. Načrtovanje in sintezo le-teh smo izvedli na osnovi spojine vodnice: *N*-(2-(1-(2,3-dihidro-1*H*-inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1*H*-benzo[d]imidazol-2-il)metil)benzamid, pri čemer smo variirali dolžino distančnika med benzimidazolnim obročem in benzamidom, pripravili pa smo tudi retroamidni analog spojine vodnice.

Spojine smo dali testirati na citotoksičnost, nakar smo jim dali določiti tudi antagonistično aktivnost na receptor NOD2. Ugotovili smo, da so biološko najbolj aktivne spojine **11**, **20** in **32**, ki pri necitotoksični koncentraciji izkazujejo dobro antagonistično aktivnost na receptor NOD2. Te spojine pa izkazujejo tudi selektivnost za receptor NOD2 saj imajo za faktor 3-4 boljšo antagonistično aktivnost kot na receptor NOD1.

Z načrtovanjem na osnovi liganda smo tako uspeli malenkostno izboljšati antagonistično aktivnost spojine vodnice, hkrati pa smo dobili tudi nekaj koristnih podatkov o odnosu med strukturo in delovanjem tega tipa spojin.

ABSTRACT

Immune system is the first defense line of the body. It can be subdivided into innate and adaptive immune system. Innate immune system often recognizes microbial infections by using pattern recognition receptors (PRR) that sense pathogen-associated microbial patterns (PAMP). NLR proteins are one of the most important protein subgroups of the innate immune system and as intracellular PRRs identify PAMPs within the cytoplasm. NOD1 and NOD2 belong to the group of NLR proteins. They play a significant role in host immune response by recognizing components of a bacterial peptidoglycan which leads to activation of NF- κ B signaling pathway, MAPK pathway and inflammatory response. However, single nucleotide polymorphisms and gene mutations that code NOD2 also lead to chronic inflammation irregularities, autoimmune diseases and cancer.

In this master's thesis, six NOD2 receptor antagonists were synthesized. The design and synthesis were based on the structure of lead compound: N-(2-(1-(2,3-dihydro-1H-inden-5-yl)amino)-2-oxo-ethyl)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)methyl)benzamide. Within the scope of this thesis, the bond length between benzimidazole ring and benzamide was varied and a retro-amide analog of the lead compound was constructed.

The synthesized compounds underwent cytotoxicity tests and a subsequent screening for NOD2 antagonistic activity. The findings show that the most active compounds are **11**, **20** and **32** that show good antagonistic activity against NOD2 receptor at a non-cytotoxic concentration. They are also selective for receptor NOD2, as they display 3-4 times weaker antagonistic activity for receptor NOD1.

Using ligand-based design, the antagonistic activity of lead compound was slightly improved and results provide some useful information about the structure/activity relationship of this type of compounds.

KLJUČNE BESEDE

Prirojen imunski sistem, receptor NOD2, antagonist NOD2, imunomodulatorji

SEZNAM OKRAJŠAV

ATP	angl. adenosine triphosphate; adenozin trifosfat
APC	antigen predstavitvene celice
BOC	angl. N-tert-butoxycarbonyl; <i>tert</i> -butiloksikarbonil
CARD	angl. caspase activation and recruitment domain; domena kaspazne aktivacije
CDCl₃	devteriran kloroform
COMU	(1-ciano-2-etoksi-2-oksoetilidenaminooksi)dimetilamino- morfolino-karbenium heksafluorofosfat
DCC	<i>N,N'</i> -dicikloheksilkarbodiimid
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropilkarbodiimid
DMAP	4-dimetilaminopiridin
DMSO-d₆	devteriran dimetilsulfoksid
DNA	angl. deoxyribonucleic acid; deoksiribonukleinska kislina
eq	ekvivalent
EDCxHCl	1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilkarbodiimid hidroklorid
HATU	(1-[Bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5- b]piridinium 3-oksid heksafluorofosfat)
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronium heksafluorofosfat
HOAt	1-hidroksi-7-azabenzotriazol
HOBt	1-hidroksibenzotriazol
HPLC	angl. high performance liquid chromatography; tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

HR-MS	angl. high resolution mass spectrometry; masna spektrometrija visoke ločljivosti
IC₅₀	predstavlja koncentracijo učinkovine, ki je potrebna za 50% inhibicijo <i>in vitro</i>
IFN	interferon
IL	interlevkin
IR	infrardeča spektroskopija
IRF3	<i>angl. interferon regulatory factor 3</i> ; faktor regulacije interferona 3
LRR	angl. leucine-rich repeat; domena, bogata z levcinom
MAPK	angl. mitogen-activated protein kinases z miogeni aktivirane proteinske kinaze
MDP	muramil dipeptid
MHC	angl. major histocompatibility complex; poglavitni kompleks tkivne skladnosti
MF	mobilna faza
Mr	relativna molekulska masa
MS	masna spektrometrija
MurNAc	N-acetilmuraminska kislina
NACHT	angl. NAIP-neuronal apoptosis inhibitory protein; centralno locirana domena, ki veže nukleotide
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (hidridni ion)
NF-κB	angl. nuclear factor κB; jedrni faktor κB
NLR	angl. NOD-like receptor; NOD-u podoben receptor
NMM	N-metil morfolin
NMR	angl. nuclear magnetic resonance; jedrska magnetna resonanca
NOD	angl. nucleotide-binding oligomerization domain; nukleotid-vezoča oligomerizacijska domena

PGN	peptidoglikan
PMA	angl. phorbol-12-myristate-13-acetate; forbol-12-miristat-13-acetat
PRR	angl. pattern recognition receptors; receptorji za prepoznavo molekulskih vzorcev
Rf	retencijski faktor
RIP-2	angl. receptor-interacting protein-2; protein-2, ki interagira z receptorjem
RLR	angl. Rig-I-like receptors Rig-I podobni receptorji
RNA	angl. ribonucleic acid; ribonukleinska kislina
t_R	retencijski čas
THF	tetrahidrofuran
TIR domena	Toll /IL-1 receptorska domena
TLC	angl. thin layer chromatography; tankoplastna kromatografija
TLR	angl. Toll-like receptor; Toll-u podoben receptor
TNF-α	tumor nekrotizirajoči faktor alfa

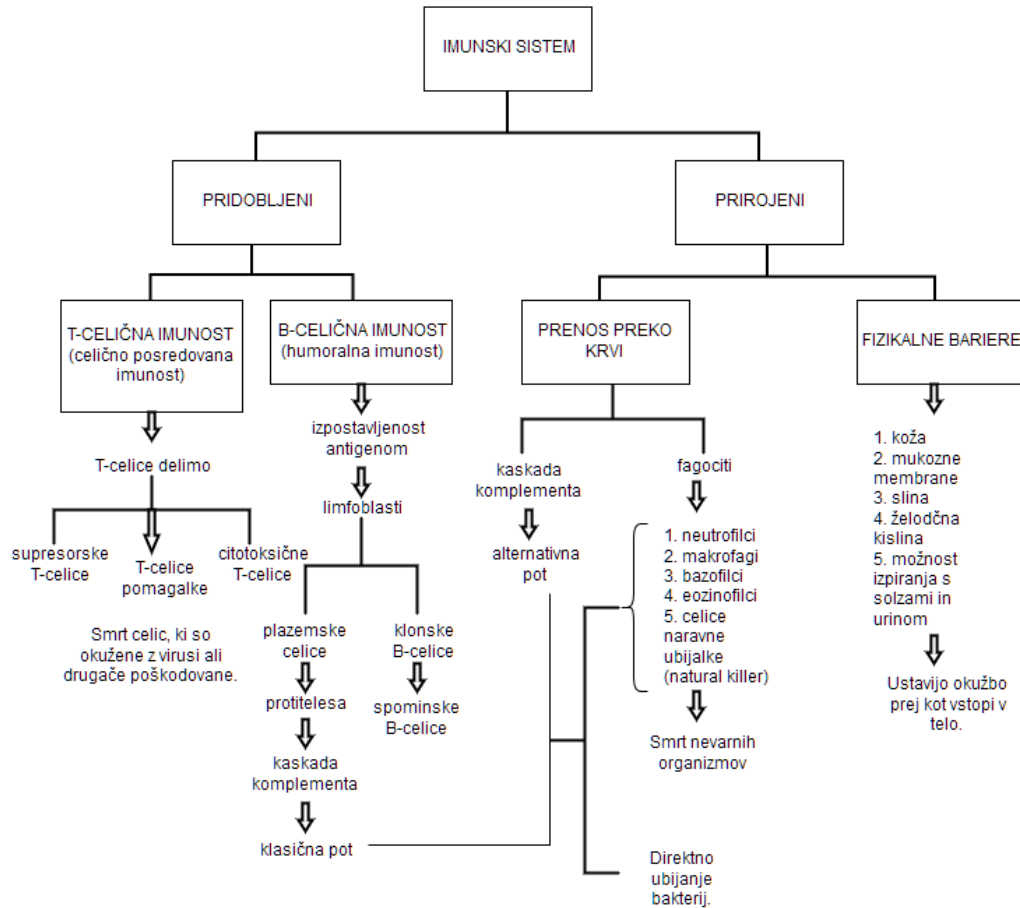
UVOD

1.1 IMUNSKI SISTEM

Imunski sistem je sestavljen iz velikega števila različnih celic, tkiv, celičnih mediatorjev in molekul, ki ščitijo telo tako pred patogeni, mikrobi, toksini iz okolja kot tudi pred tumorskimi celicami. Delimo ga na prirojeno (naravno, nespecifično) in pridobljeno (specifično) imunost. Oba tipa sta enako pomembna za celosten imunski odgovor telesa. Razlikujeta se le v hitrosti in dolžini imunskega odgovora ter v tipu celic, ki pri odzivu sodelujejo. (1)

Nespecifični ali prirojeni imunski sistem je podedovan in je sestavljen iz celic in proteinov, ki so vedno normalno prisotni v organizmu ter vedno pripravljene na boj z mikrobi. Mehanizmi naravne imunosti začnejo delovati proti tujkom takoj, ne glede na to, če so le-ti že kdaj stopili v stik z njimi ali ne. Glavne komponente prirojenega imunskega sistema so makromolekule komplementa, makrofagi, nevtrofilci, naravne celice ubijalke, dendritične celice, anatomske in mehanične ovire, nespecifične baktericidne snovi telesnih tekočin, fagocitoza in znotrajcelično uničenje mikroorganizmov. (Slika 1) (1-3)

Pridobljen imunski sistem začne delovati v primeru, če se patogeni izognejo prirojenemu imunskemu sistemu in je usmerjen samo proti tistemu povzročitelju, ki je povzročil aktivacijo sistema. Takrat se aktivirajo komponente, ki se prilagodijo povzročitelju bolezni in tako ustvarijo močan ter kompleksen mehanizem za nevtralizacijo in eliminacijo le-tega. Pridobljena imunost je lahko kratkotrajna, večletna ali doživljenjska, saj ima naš imunski sistem tudi sposobnost imunskega spomina. Molekule, ki so sposobne spodbuditi specifičen imunski odgovor, imenujemo antigeni. Celice, ki so odgovorne za ključne procese pridobljene imunosti, so limfociti B (humoralna ali protitelesna imunost), limfociti T (celična imunost) in antigen predstavitvene celice (APC). Komunikacija med njimi poteka s citokini, ki se sprostijo ob stiku z antigeni. (1)



Slika 1: Delitev imunskega sistema (42)

Citokini so proteinske ali glikoproteinske molekule, ki so potrebne za komunikacijo med celicami pri imunskem odzivu. Glavni vir citokinov so aktivirani makrofagi in limfociti T_H . Ker se na receptorje vežejo z visoko afiniteto, je za učinek potrebna dokaj nizka koncentracija (10^{-9} mol/L). Delujejo avtokrino, parakrino, redko endokrino in izkazujejo pleiotropnost (različni efekti v različnih celicah). Delimo jih na interferone (IFN), interlevkine (IL) in dejavnike tumorske nekroze (TNF). (2, 4) V Preglednica I je na kratko predstavljen izvor in delovanje citokinov prirojene imuniteti.

Preglednica I: Izvor citokinov in njihova funkcija (4)

CITOKINI PRIROJENE IMUNOSTI	IZVORNA CELICA	UČINKI/TARČE
IL-1	monociti, makrofagi, endotelijske, epiteljske celice	ožilje (vnetje), hipotalamus (vročina), jetra (indukcija sinteze proteinov akutne faze vnetja)
IL-6	makrofagi, endotelijske celice	jetra (indukcija sinteze proteinov akutne faze vnetja), vpliva na mehanizme pridobljene imunosti (proliferacija in izločanje protiteles B limfocitne linije)
IL-12	makrofagi, dendritične celice	NK celice, vpliv na mehanizme pridobljene imunosti (promocija diferenciacije do podvrste T _{h1})
IFN- α	makrofagi	povečanje ekspresije MHC I, aktivacija celic NK
IFN- β	fibroblasti	povečanje ekspresije MHC I, aktivacija celic NK
TNF- α	makrofagi	ožilje (vnetje), jetra (indukcija sinteze proteinov akutne faze vnetja), izguba mišične mase ter telesne maščobe, indukcija apoptoze v različnih celičnih vrstah, aktivacija nevtrofilcev
IL-2	T celice	proliferacija T celic, aktivacija in proliferacija NK celic, proliferacija B celic
IL-4	T _{h2} celice, mastociti	promocija diferenciacije T _{h2} , spremembe izotipa imunoglobulinov do IgE
IL-5	T _{h2} celice	aktivacija in nastanek eozinofilcev
IL-25	neznano	indukcija izločanja profila citokinov T _{h2}
IFN- γ	T _{h1} celice, CD8 ⁺ celice, NK celice	aktivacija makrofagov, povečanje izražanja MHC I/II, povečanje antigen- predstavitvene sposobnosti
TGF- β	T celice, makrofagi	inhibicija proliferacije T celic in efektorskih nalog, inhibicija proliferacije B celic, inhibicija makrofagov

1.2 RECEPTORJI ZA PREPOZNAVO VZORCEV (PRR)

Prirojeni imunski sistem prepozna okužbo z mikroorganizmi tudi preko receptorjev za prepoznavo vzorcev (PRR), ki zaznajo mikrobne komponente imenovane »pathogen-associated microbial patterns« - PAMP (molekulski vzorci povezani z mikrobi). PAMP predstavljajo komponente, ki so pomembne za preživetje bakterij in virusov, kot so nekateri lipopolisaharidi, peptidoglikan, sladkorji in deli nukleinskih kislin, ki niso normalno prisotni v človeškem organizmu. PRR so prisotni v citosolu ali pa so vezani na celične membrane. Med PRR-je sodijo Toll-u podobni receptorji (TLR), NOD-u podobni receptorji (NLR) in RIG-u podobni receptorji (RLR). Med prosto cirkulirajoče receptorje PRR sodijo C-reaktivni protein (CRP), lipopolisaharidni vezoči protein (LBP), manozo-vezoči protein (MBL), sistem komplementa in surfaktantni proten A. (3-6)

Določeni PRR-ji pa niso udeleženi samo pri zaznavi mikroorganizmov ampak tudi endogenih nemikrobnih signalov za nevarnost (poškodbe tkiv). Aktivacija PRR-jev z mikrobnimi ali endogenimi stimulusi sproži aktivacijo večjega števila signalnih poti, med drugimi aktivacijo jedrnega faktorja κB (NF- κB), z mitogeni aktivirane proteinske kinaze (MAPK) in odziv interferon tipa I (IFN), kar vodi do indukcije protivnetnega in protimikrobnega odziva. (5, 7)

1.2.1 NOD-u podobni receptorji (NLR)

Proteini NLR so ena izmed glavnih poddružin proteinov prirojenega imunskega sistema, ki kot znotrajcelični PRR-ji zaznavajo v citoplazmi prisotne PAMP in endogene produkte poškodovanih tkiv. Prepoznavanje signalov aktivira različne obrambne poti gostitelja z aktivacijo NF- κB , stresnih kinaz, IRF-jev (interferon regulatory factors - faktorjev, ki regulirajo interferon), vnetnih kaspaz in avtofagije. Proteine NLR sestavljajo trije bistveni strukturni segmenti: centralno locirana domena NACHT, C-terminalna domena, bogata z levcinom (LRR) in N-terminalna efektorska domena. Domena NACHT pripada veliki naddružini NTP-aznih domen, ki hidrolizirajo ATP ali GTP. Kot ostale NTP-azne domene je tudi domena NACHT po aktivaciji v prisotnosti ATP podvržena oligomerizaciji, kar omogoči nadaljnjo signalizacijo. (8, 9)

N-terminalna efektorska domena se poveže z drugo efektorsko molekulo in aktivira protein NLR, kar je pomembno za transdukcijo signala. Družino proteinov NLR lahko razdelimo v

podružine glede na tip N-terminalne efektorske domene. Poznamo 3 glavne podružine, in sicer CARD (caspase recruitment domains), PYD (pirinsko domeno) in druge domene (kot npr. BIR-i – »baculovirus IAP« (inhibitor apoptoznih proteinov) ponavljajoča domena). (8-10) Človeški genom kodira vsaj pet NLR-jev, ki vsebujejo N-terminalno domeno CARD: NOD1, NOD2, NLRP1, NLRC4 in NLRA. (9)

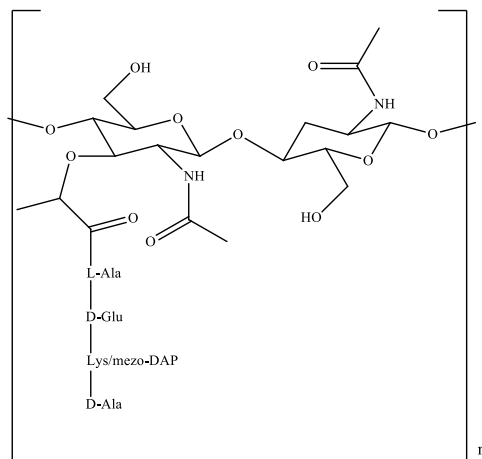
1.3 RECEPTORJA NOD1/2

Receptorja NOD1 in NOD2 spadata v nodosomsko (»nodosome«) podskupino receptorjev NLR in igrata pomembno vlogo pri imunskem odgovoru gostitelja, saj prepoznata komponente bakterijskega peptidoglikana, kar vodi do aktivacije NF- κ B, MAPK in vnetnega odgovora. (10, 11) Bakterijski peptidoglikan sicer prepoznavajo tudi nekateri peptidoglikan-prepoznavni proteini, ki so direktno vpleteni v ubijanje mikrobov. (11) Receptor NOD1 je prisoten v mnogih celicah in tkivih, medtem ko NOD2 najdemo predvsem v celicah imunskega sistema, kot so npr. makrofagi, dendritične celice in Paneth-ove celice. (9)

1.3.1 Bakterijska celična stena

Bakterijska celična stena daje celicam trdnost saj je zgrajena iz peptidoglikana (PGN), ki je polimer z veliko molekulsko maso, sestavljen iz glikozaminoglikanov, prečno povezanih z oligopeptidi. (11-13) Polimer je sestavljen iz sladkornih in aminokislinskih komponent. V sladkornem -delu se izmenjujeta N-acetilglukozamin in N-acetilmuraminska kislina, ki sta povezani z vezjo β -(1,4). Na N-acetilmuraminsko (MurNAc) kislino se pripenja oligopeptid, ki vsebuje 3 do 5 aminokislinskih ostankov. Peptidne verige se lahko prečno povezujejo s sosednjimi peptidnimi verigami in tako dajejo molekuli tridimenzionalno strukturo. (11)

Naš imunski sistem zazna prisotnost mikroorganizmov, saj receptorji NOD prepoznavajo posamezne fragmente PGN, ki nastanejo po njegovi razgradnji z lizocimom in drugimi encimi. NOD1 zazna D-Glu-mezo-DAP (Slika 2) tip bakterijskega peptidoglikana, NOD2 pa prepozna muramil dipeptid. (11, 14, 15)



Slika 2: Osnova strukturna enota peptidoglikana (12)

1.3.2 Struktura NOD2

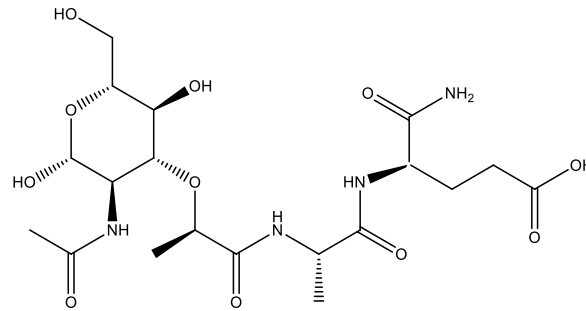
NOD2 ima značilno tridelno strukturo (sodi med že prej omenjene NLR), saj ga sestavlja C-terminalna senzorna domena – sestavljena iz LRR, ki prepoznava ligande, centralno locirana domena, ki veže nukleotide (NACHT) in uravnava samo-oligomerizacijo in aktivacijo, ter N-terminalna efektorska domena, ki je sestavljena iz 2 domen CARD, ki uravnavata protein-proteinske interakcije in sta zato pomembni za transdukcijo signalov. (10, 16)

NOD1 in NOD2 se med seboj v grobem razlikujeta predvsem v številu domen CARD, saj NOD1 v svoji strukturi vsebuje eno domeno CARD, NOD2 pa dve. (16, 17)

1.3.3 Muramil dipeptid

Muramilpeptidi (Slika 3) so razgradni produkti peptidoglikana, ki vsebujejo MurNAc del in vsaj eno aminokislino. Mednje sodi tudi muramil dipeptid (MDP), sestavljen iz MurNAc in dveh aminokislin, L-Ala in D-Glu, kar predstavlja minimalno strukturo sposobno sprožiti adjuvantni odziv (Slika 3). MDP najdemo tako v Gram negativnih kot tudi v Gram pozitivnih bakterijah. (18-21)

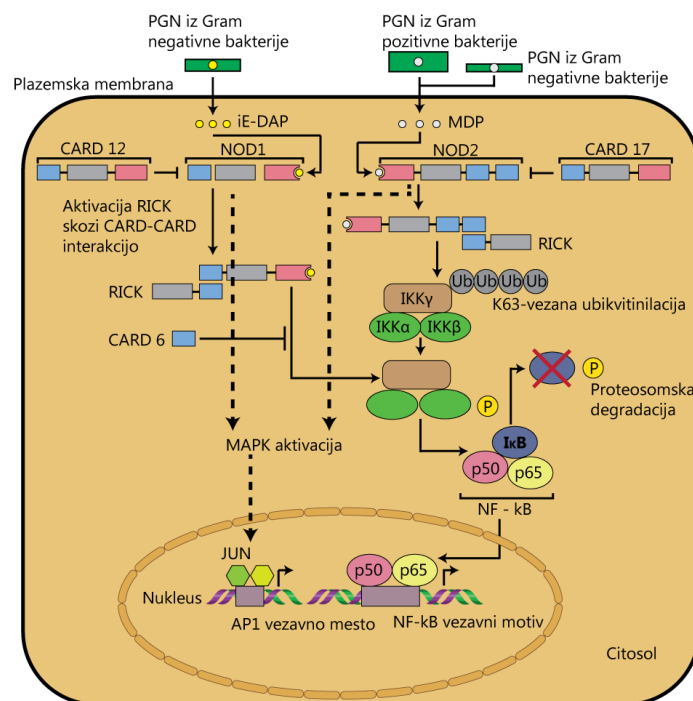
MDP in ostali muramil peptidi so sposobni direktne indukcije citokinov (IL-1, TNF- α , IL-6), kar aktivira in modulira odziv imunskega sistema in s tem posledično tudi vnetni odziv. (19, 20)



Slika 3: Muramil dipeptid (MDP) (22)

1.3.4 Signalna pot

PGN iz Gram pozitivnih ali Gram negativnih bakterij vstopi skozi plazemsko membrano v notranjost celice. Skozi membrano lahko vstopijo s pasivno difuzijo, z različnimi celičnimi transportnimi sistemi, tvorbo bakterijskega eksosoma, nekatere invazivne bakterije pa lahko vstopijo tudi direktno skozi membrano. NOD1 in NOD2 se normalno nahajata v neaktivnem stanju, vezana na ADP ali prosta nukleotida. Razgradne produkte PGN po vstopu v celico prepozna LRR del C-terminalne domene, MDP se domnevno veže na LRR. Preko interakcije CARD-CARD se aktivira serinska treoninska kinaza RICK (tudi RIP2), kar vodi do aktivacije NF- κ B ali MAPK. Posledično se poveča transkripcija genov, ki sodelujejo pri imunskem odgovoru (Slika 4). (2, 7, 10, 15, 23)



Slika 4: Prikaz signalne poti (23)

1.3.5 Regulacija signalne poti receptorjev NOD2

Signalna kaskada receptorja NOD2 mora biti strogo kontrolirana, saj drugače lahko pride bodisi do prevelike ali prenizke aktivacije. Neravnotežje te kaskade tako lahko vodi bodisi do supresije vnetnega odziva in s tem do resnih infekcijskih bolezni, po drugi strani pa pretirana aktivacija vodi do nastanka kroničnih vnetnih in avtoimunskih bolezni. NOD2 interagira s številnimi drugimi proteini, ki lahko negativno ali pozitivno uravnavajo signalno pot. [10] Regulacija signalne poti poteka na različnih stopnjah, odvisna pa je tudi od tipa celice. V zgodnjih fazah regulacije ima pomembno vlogo citoskelet, saj so raziskave pokazale, da citoskelet potencira odgovor makrofagov na ligande NOD. Oligomerizacija prav tako predstavlja pomemben korak v signalni kaskadi NOD, zato je kontrolirana s komponentami, ki vstopajo v interakcije s centralno domeno NACHT. Regulacija pa poteka tudi na nivoju transdukcije signala, saj je kinaza RIP2 podvržena avtofosforilaciji in ubikvitinaciji, kar sproži aktivacijo ali kasnejšo deaktivacijo NOD signalizacije. Ubikvitinacija RIP2 je eden najbolj reguliranih korakov NOD signalizacije. (10, 17)

1.3.6 Fiziološki pomen receptorjev NOD

- Produkcija in izločanje protimikrobnih peptidov. (10)
- Sprožitev protimikrobnega odziva s tvorbo reaktivnih kisikovih in dušikovih zvrsti z indukcijo dušikovega oksida in NADPH oksidaze. (10)
- Obramba pred nebakterijskimi patogeni, kot so paraziti (*Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*) in virusnimi okužbami (respiratorni sincicijski virus). (10)
- Signalizacija NOD2 kontrolira število in sestavo komenzalne mikrobiote (črevesnih bakterij), vendar hkrati preko povratne zanke tudi mikrobiota regulira izražanje NOD2 in signalizacijo NOD2-RICK. (7)

1.3.7 Povezava proteinov NOD z boleznimi

Motena regulacija signalizacije NOD1 in NOD2 lahko povzroči ali prispeva k nastanku različnih človeških bolezni. (5)

Receptor NOD1 je kodiran z genom *CARD4*, NOD2 pa z genom *CARD15*. Polimorfizem posameznih nukleotidov (SNP) in mutacije v genih *CARD4* in *CARD15* povzročajo motnje v njuni funkciji, kar lahko povzroča kronične vnetne nepravilnosti, vodi do nastanka avtoimunskih bolezni in rakavih obolenj. Motnje v signalizaciji receptorjev NOD so tako odgovorne tudi za nastanek astme, atopij, multiple skleroze, sistemskega lupusa

eritematozusa, medtem ko neprimerna aktivacija NOD2 lahko vodi tudi k nekontrolirani proliferaciji določenega tipa celic. Z genetičnimi študijami so dokazali, da je več različic NOD2 povezanih s povečano občutljivostjo za Chronovo bolezen, saj jo lahko povzročajo namreč tri glavni polimorfizmi receptorja NOD2 v domeni LRR. (5, 10, 15, 17) Nekatere nesmiselne mutacije rezultirajo v zamenjavi ene aminokislina v NOD2, kar lahko privede do sindroma Blau, dve avtosomni dominantni nepravilnosti pa karakterizirata zgodnje granulomatozno vnetje, ki lahko prizadane kožo, oči in sklepe. (5) Okvare signalizacije NOD pa ne povzročajo le mutirani geni za proteine NOD, temveč tudi okvarjene komponente NOD signalne poti. Na splošno so ugotovili, da je NOD2 bolj dovzeten za samoaktivacijo v primerjavi z NOD1, bolj pogoste pa so tudi mutacije NOD2. (10, 15)

1.3.8 Terapevtski potencial

Pri farmakološki manipulaciji receptorjev NOD1 in NOD2 je potrebno biti izjemno previden, saj sta glavna koordinatorja obrambnega sistema, vnetja in apoptoze. Tarčna in kontrolirana modulacija prirojenega imunskega odgovora ima sicer velik potencial za zdravljenje kroničnih vnetnih in avtoimunskih bolezni, ki so povezani z aktivacijo faktorja NF- κ B. Specifični modulatorji signalne poti NLR bi lahko bili boljši od klasičnih protivnetnih učinkovin, saj bi predvidoma imeli manj stranskih učinkov.

Možnosti za ciljno zaviranje signalizacije NOD2:

- zaviranje preko motene vezave liganda
- zaviranje ATP vezavne domene
- zaviranje avto-oligomerizacije NOD2. (10)

1.4 ZNANI LIGANDI NOD2

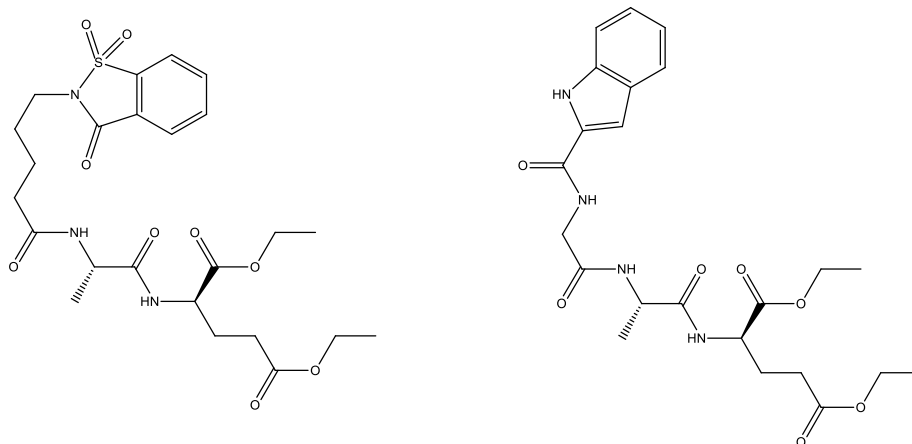
1.4.1 Agonisti

Najmanjša struktura, ki ima adjuvantno aktivnost za receptor NOD2 je MDP. Mimetiki MDP-ja so manj toksični, lažje vstopajo v celice (so bolj lipofilni) in imajo močnejšo adjuvantno aktivnost kot MDP. Na Slika 5 vidimo, kako so sladkorni del v strukturi MDP zamenjani z aromatskimi obroči. Na Slika 6: MDP-C je prikazana spojina MDP-C, ki je v osnovi tripeptid, sestavljen iz sladkornega dela in tripeptida L-Ala-D-isoGln-L-Lys, ki je naaminski skupini lizina še dodatno acilirana s 3-nitrocimetno kislino. Izkazuje močno

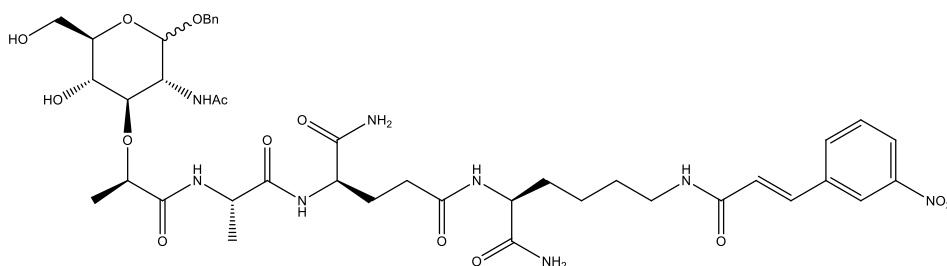
Asja Frank:

Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorjev NOD2 z benzimidazolnim skeletom

imunostimulatorno delovanje, pri čemer pa ne povzroča alergij, je apirogen in izkazuje nizko toksičnost. (22, 24, 25)



Slika 5: Nekateri predstavniki iz skupine dezmuramilpeptidov (25)



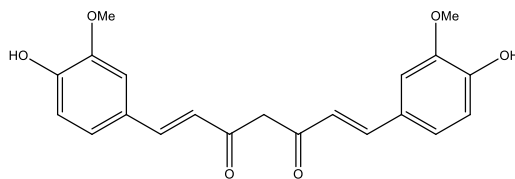
Slika 6: MDP-C (22, 25)

1.4.2 Antagonisti

- Naravni zaviralci signalizacije NOD1/2

Veliko naravnih spojin ima protivnetne lastnosti. Kurkumin (Slika 7) je polifenol iz rastline *Curcuma longa*, ki zavira različne signalne poti (TNF- α , TLR4), kar vodi do zaviranja aktivacije NF- κ B. Ugotovili so, da zavira tako z MDP inducirano kot tudi z lavrinsko kislino inducirano aktivacijo NOD2, kar se v končni fazi kaže kot supresija aktivacije NF- κ B. (26)

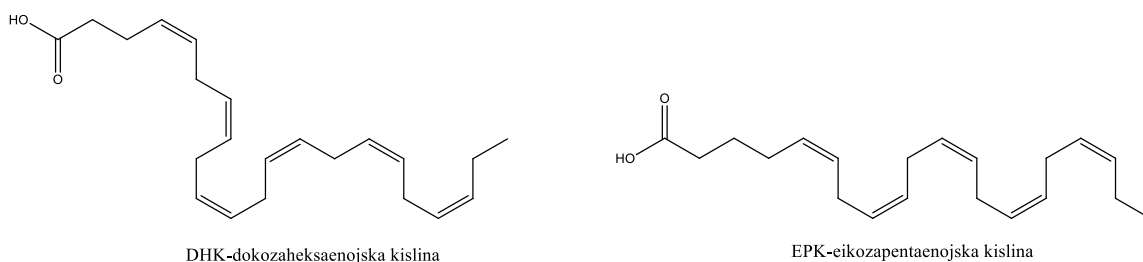
Partenolid, seskviterpenski lakton, prav tako kot kurkumin vpliva na z MDP inducirano in z lavrinsko kislino inducirano signalizacijo NOD2, podobno pa se obnašajo tudi nekateri drugi seskviterpenski laktoni (helenalin). (26)



Slika 7: Kurkumin (10)

- Endogeni zaviralci signalizacije NOD1/2

Receptorji NOD lahko modulirajo tudi nekatere endogene molekule, in sicer nekatere maščobne kisline. Medtem ko nasičene maščobne kisline, kot na primer lavrinska kislina, sprožijo aktivacijo signalizacije NOD1/2, pa nenasičene maščobne kisline, še posebej tiste $n - 3$ poli-nenasičenega tipa (omega-3 maščobne kisline), to signalno pot zavirajo. Dokozaheksaenojska kislina (DHK) in eikozapentaenojska kislina (EPK) (Slika 8) sta se izkazali kot zaviralca samo-oligomerizacijskega procesa NOD2, kar je vodilo do supresije aktivacije NF- κ B in posledične supresije izražanja IL-8. (27)



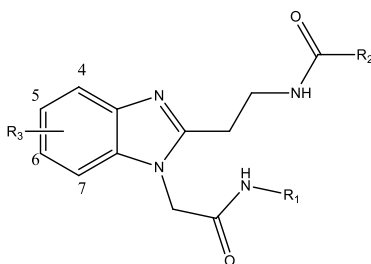
Slika 8: DHK in EPK (10)

- Zaviralci odkriti z rešetanjem visoke zmogljivosti

Za identificiranje zaviralcev signalne poti NOD2 so uporabili pristop rešetanja visoke zmogljivosti in odkrili benzimidazol-diamid, ki je selektivno zaviral z MDP stimuliran in preko NOD2 posredovano izločanje IL-8. V naslednjem koraku so sintezno pripravili številne analoge prvotnega zadetka, pri čemer so variirali substituentne R1, R2 in R3, kar je nazorno prikazano v Preglednica II in Preglednica III ter spojinam določili tudi vrednosti IC_{50} . (28)

Asja Frank:

Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorjev NOD2 z benzimidazolnim skeletom



Preglednica II: Strukture sintetiziranih spojin in njihove jakosti zaviranja NOD2 (28)

#	R1	R2	R3	NOD2 IC ₅₀ (μ M)	#	R1	R2	R3	NOD2 IC ₅₀ (μ M)
1			H	3,3	8			H	3,3
2			H	4,0	9			H	35,2
3			H	0,8	10			H	>50
4			H	1,3	11			H	>50
5			H	1,6	12			H	>50
6			H	2,8	13			H	>50
7			H	3,3	14			H	>50
15			H	3,4	19			H	>50
16			H	3,8	20			H	>50

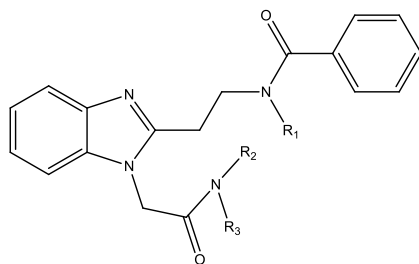
17			H	4,7	21			H	>50
18			H	>50	22			H	>50
23			5- Cl	1,3	26			5- MeO	>50
24			6- Cl	4,2	27			6- MeO	>50
25			5- Me	4,6	28			4- Me	>50

Rezultati:

- R1 je dovzeten za večje strukturne spremembe, saj so na tem mestu uvedli benzimidazolni fragment, benzotiofenski fragment, 1,2-dimetilbenzenski fragment, indolni fragment in druge. Ugotovili so, da je najbolj optimalen benzimidazolni fragment. R2 so lahko modificirali le na poziciji orto, in sicer z majhnima substituentoma (Cl, Me) (spojini 16 in 17, Preglednica II).
- Ugotovili so, da se na mestu 5 ali 6 osnovnega benzimidazolnega skeleta (spojine 23 in 24, Preglednica II) lahko uvede majhen substituent kot npr. Cl, medtem ko uvedba metoksi substituenta vodi v izgubo aktivnosti.
- Najbolj aktivna spojina je spojina 29 (Preglednica III), kar so dosegli z dodatno metilacijo amidnega dušika (R1 substituent). Ostale kombinacije metilacije amidnih dušikov so vodile v izgubo aktivnosti (Preglednica III).
- Spojine 32-37, pri katerih so namesto 2,3-dihidroindenskega obroča uvajali različne aromatske sisteme, niso pokazale nobene bistvene izboljšave in so imele enako aktivnost kot spojina 29 (Preglednica III).
- Pretvorba benzimidazolnega skeleta v imidazolnega pa je privedla do popolne izgube aktivnosti.

Asja Frank:

Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorjev NOD2 z benzimidazolnim skeletom



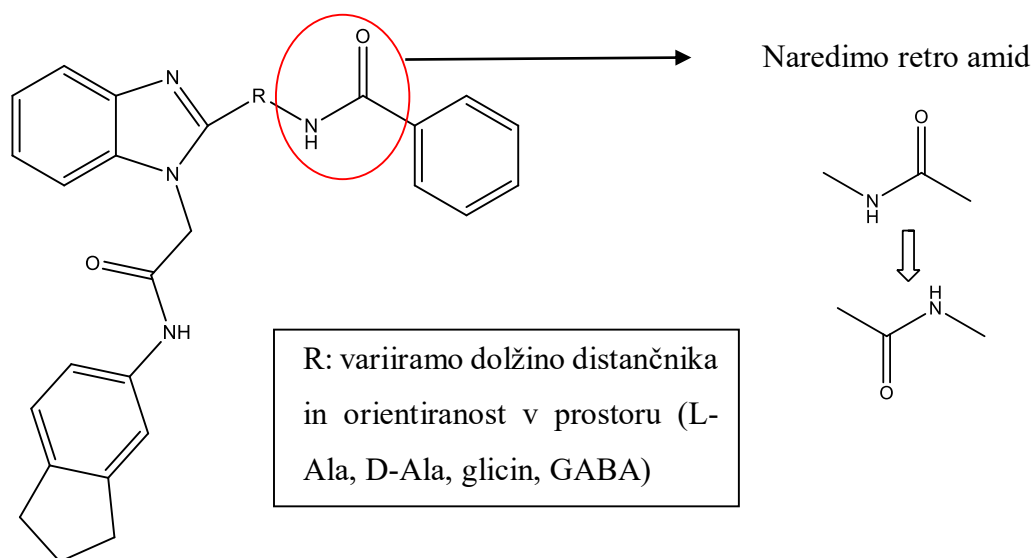
Preglednica III: Strukture sintetiziranih spojin druge serije in njihove jakosti zaviranja NOD2 (28)

#	R1	R2	R3	NOD2 IC50 (μ M)	#	R1	R2	R3	NOD2 IC50 (μ M)
1	H	H		3,2 \pm 1,4	30	Me	Me		17,0 \pm 2,0
29	Me	H		0,4 \pm 0,3	31	H	Me		20,0
32	Me	H		0,2 \pm 0,01	35	Me	H		0,9 \pm 0,2
33	Me	H		0,3 \pm 0,01	36	Me	H		1,3
34	Me	H		0,6 \pm 0,1	37	Me	H		1,6 \pm 0,1

NAMEN DELA

- V okviru magistrske naloge bomo raziskali kemijski prostor znanega antagonist receptorja NOD2 in sintetizirali nove antagoniste.
- Načrtovanje bomo izvedli na osnovi liganda, kot spojino vodnico pa bomo izbrali *N*-(2-(1-(2,3-dihidro-1*H*-inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1*H*-benzo[d]imidazol-2-il)metil)benzamid.
- Pri novih spojinah bomo variirali dolžino distančnika R med osnovnim benzimidazolnim skeletom in benzamidnim delom molekule.
- Pripravili bomo tudi retroamidni analog spojine vodnice.

Struktura osnovne spojine



Slika 9: Načrtovane sintezne modifikacije znanega antagonist receptorja NOD2

Vse sintetizirane antagoniste bomo fizikalno-kemijsko in spektroskopsko ovrednotili. Pripravljene spojine bomo dali tudi biološko testirati in določiti njihovo antagonistično delovanje na receptor NOD2, selektivnost spojin glede na receptor NOD1 in citotoksičnost.

MATERIALI IN METODE

REAGENTI

Za pripravo spojin smo uporabili reagente proizvajalcev: Acros Organics (Belgija), Carlo Erba (Italija), Gram-mol (Hrvaška), Fluka (Švica), Janssen (ZDA), Merck (Nemčija), Panreac (Španija) ter Sigma-Aldrich (ZDA).

LABORATORIJSKA OPREMA

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

TALIŠČE

Za določevanje tališča spojin smo uporabili: Koflerjev mikroskop proizvajalca Leica z ogrevalno mizico, tališča niso korigirana.

POIMENOVANJE SPOJIN

Za poimenovanje spojin smo uporabili program ChemBioDraw Ultra 12.0.

JEDRSKA MAGNETNA REZONANCA

^1H in ^{13}C NMR spektri so bili posneti z napravo Bruker Avance DPX₄₀₀ pri frekvenci 400 (^1H) in 100 MHz (^{13}C) na Fakulteti za Farmacijo, Univerze v Ljubljani. Vzorce smo raztopili v CDCl_3 ali DMSO-d_6 .

IR SPEKTROSKOPIJA

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

MASNA SPEKTROMETRIJA (MS) IN MASNA SPEKTROMETRIJA VISOKE LOČLJIVOSTI (HRMS)

Masni spektri so bili posneti s spektrometrom Q-TOF Premier z ESI tehniko ionizacije na Inštitutu Jožef Stefan.

TENKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA

Za spremljanje poteka reakcij smo uporabljali kromatografske ploščice proizvajalca Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ z 0,22 mm debelim nanosom silikagela. Za detekcijo spojin smo uporabili UV lučko z valovnima dolžina 254 in 366 nm.

KOLONSKA »FLASH« KROMATOGRAFIJA

Za stacionarno fazo smo uporabili Kieselgel 60 z velikostjo delcev 0,042-0,063 mm, za mobilno fazo smo uporabili različne mešanice topil, ki so opisane pri poteku reakcij. Kolonsko kromatografijo smo izvajali v različno velikih steklenih kolonah, ki smo jih izbrali glede na količino spojine, ki smo jo želeli očistiti.

TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI

Za HPLC analizo smo uporabili kolono Luna Agilent C18. Analiza je bila gradientna acetonitril/0.1% TFA: od 0-30 minut se je sestava spreminjala od 30% acetonitrila do 80%, od 30-35 minut pa še od 80% acetonitrila do 90%.

BIOLOŠKO TESTIRANJE

Novo sintetizirane antagoniste receptorjev NOD2 smo dali biološko ovrednotiti na Katedro za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Za testiranje so uporabili celice Ramos-Blue™ NOD2 in reagent QUANTI-Blue™ proizvajalca InvivoGen. Naše antagoniste (**5**, **11**, **17**, **20**, **27** in **32**) so testirali pri različnih koncentracijah, kot agonist NOD2 pa so uporabili 2 μM MDP. Pri negativni kontroli je bil suspenziji celic dodan le gojitveni medij. Celice so bile nato skupaj z ustreznimi slepimi vzorci 18 ur inkubirane pri 37 °C v 5 % atmosferi CO₂. Po končani inkubaciji je bila v supernatantu celic z reagentom QUANTI-Blue™ spektrofotometrično izmerjena količina »izločene zarodne alkalne fosfataze« (angl. »secreted embryonic alkaline phosphatase« – SEAP). Absorbanca vzorcev je bila izmerjena pri 640 nm po 24-urni inkubaciji v mediju za analizo. Selektivnost

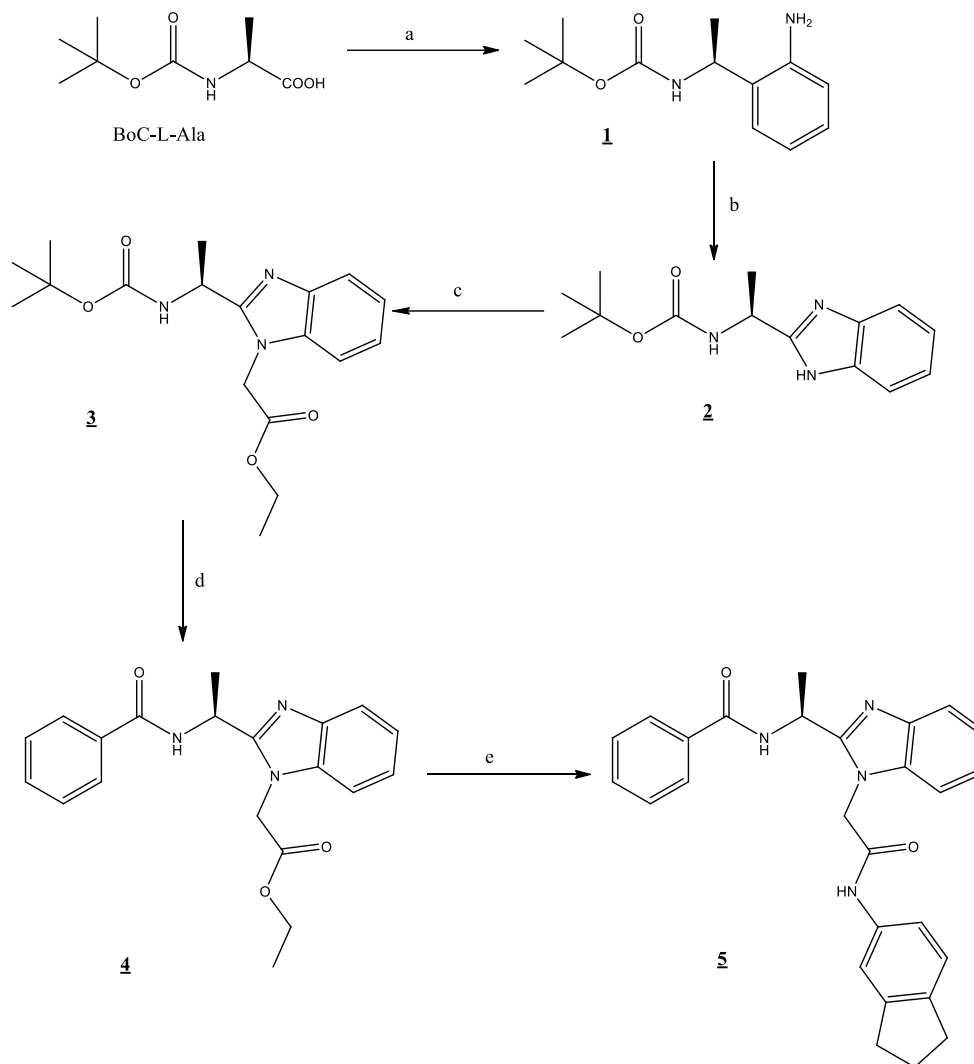
Asja Frank:

Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorjev NOD2 z benzimidazolnim skeletom

sintetiziranih spojin so določili z analognim testom na celični liniji HEK-Blue NOD1, pri čemer so kot agonist NOD1 uporabili 100 nM koncentracijo C12-iE-DAP.

EKSPERIMENTALNI DEL

1.5 Reakcijska shema 1:



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

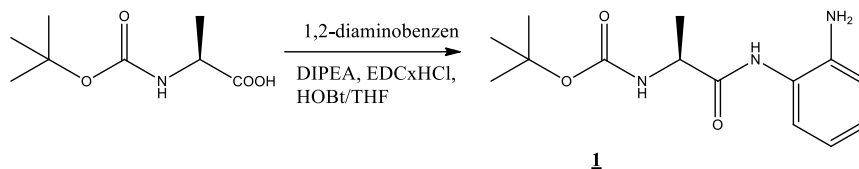
b: AcOH, 70 °C

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

d: i) 1M HCl/AcOH, AcOH; ii) benzoil klorid, DIPEA, THF, 0 °C

e: i) 1M NaOH, THF; ii) 5-aminoindan, EDC×HCl, HOBt, DIPEA, DMAP, DMF

1.5.1 Sinteza *tert*-butil (*S*)-(1-((2-aminofenil)amino)-1-oksopropan-2-il)karbamata (**1**)



Raztopini Boc-L-Ala (2,08 g, 11 mmol) v THF (40 mL) smo dodali EDC·HCl (3,22 g, 17 mmol), HOBT (2,55 g, 17 mmol) in 1,2-diaminobenzen (1,32 g, 17 mmol). V reakcijsko zmes smo nato počasi dokapavali DIPEA (3,05 mL, 17 mmol) in pustili mešati preko noči pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo v bučko dodali 20 mL vode in odparili zmes topil pod znižanim tlakom. V bučko smo dodali suhemu preostanku 100 mL diklorometana. Organsko fazo smo spirali z 2 × 50 mL vode in 50 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili z Na₂SO₄, prefiltrirali in odparili topilo pod znižanim tlakom. Po uparivanju je v bučki ostala surova spojina **1** kot bel prašek (2,54 g).

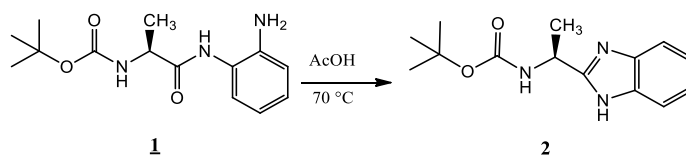
Izkoristek reakcije: 82,6 %

Rf (CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1 + AcOH): 0,79

<i>tert</i> -butil (<i>S</i>)-(1-((2-aminofenil)amino)-1-oksopropan-2-il)karbamata (1)		M _r =279,16
Izgled	umazan bel amorfen prah	
Analiza	Rezultati	
¹ H-NMR (CDCl ₃ , 400 MHz)	δ[ppm]=1.46-1.48 (m, 12H, 4×CH ₃), 4.26-4.28 (m, 1H, CHCH ₃), 4.99-5.01 (m, 1H, -NH _{Boc} -), 6.76-6.80 (m, 2H, Ar-H), 7.02-7.64 (m, 1H, Ar-H), 7.24 (s, 1H, 4×Ar-H), 7.90 (s, 1H, ArNHCO-)	
MS (ESI)	m/z: 280,2 (M+H) ⁺	
T _t	131-135 °C	
HRMS za C ₁₄ H ₂₂ N ₃ O ₃	izračunano: 280,1661 izmerjeno: 280,1662	

IR	ν [cm^{-1}] = 3331, 1692, 1653, 1522, 1495, 1457, 1367, 1311, 1286, 1249, 1227, 1167, 1068, 1050, 1033, 753, 741, 697, 644, 563
----	--

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



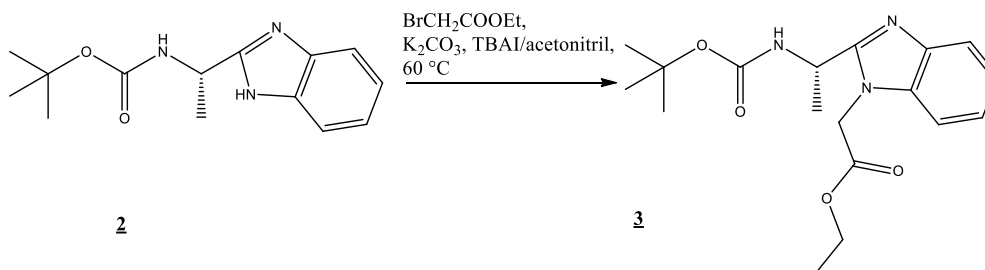
Spojino **1** smo raztopili v 30 mL AcOH in segrevali pri 70 °C 2 uri. Po končani reakciji smo odparili AcOH in preostanek raztopili v 100 mL diklorometana. Organsko fazo smo spirali s 3 × 50 mL nasičene raztopine NaHCO₃, 50 mL vode in 50 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili z Na₂SO₄, prefiltrirali in odparili topilo pod znižanim tlakom ter dobili surovo spojino **2** (1,47 g).

Izkoristek reakcije: 62,8 %

Rf(CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1 + AcOH): 0,62

<i>tert</i> -butil (<i>S</i>)-(1-(1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-il)etil)karbamat (2)		M _r =261,32
Izgled	umazano bel amorfni prah	
Analiza	Rezultati	
¹ H-NMR (CDCl ₃ , 400 MHz)	δ[ppm]=1.46 (s, 9H, 3×CH ₃), 1.74 (d, 3H, J= 7.2 Hz, CHCH ₃), 4.96-5.03 (m 1H, -CH-), 5.16 (d, 1H, J=6.8 Hz, -NH <i>Boc</i> -), 7.23-7.25 (m, 2H, Ar- <u>H</u>), 7.41-7.42 (m, 1H, Ar- <u>H</u>), 7.75 (s, 1H,Ar- <u>H</u>), 10.22 (s, 1H, -NH- <u>Het</u>)	
MS (ESI)	m/z: 262,2 (M+H) ⁺	
T _t	164-168 °C	
HRMS za C ₁₄ H ₂₀ N ₃ O ₂	izračunano: 262,1556 izmerjeno: 262,1559	
IR	ν [cm^{-1}] = 3338, 1683, 1512, 1456, 1315, 1277, 1263, 1251, 1167, 1074, 1049, 746, 733, 604, 581	

1.5.3 Sinteza etil (*S*)-2-(2-(1-((*tert*-butoksikarbonil)amino)etil)-1*H*-benzoimidazol-1-il)acetata (**3**)



V 50 mL bučki smo v 30 mL acetonitrila suspendirali spojino **2** (0,50 g, 1,9 mmol) in K_2CO_3 (0,39 g, 2,85 mmol). Suspenzijo smo 15 minut mešali pri sobni temperaturi, nakar smo dodali etil 2-bromoacetat (233 μ L, 2,09 mmol) in za konico spatule TBAI. Reakcijsko zmes smo nato preko noči segrevali pri 70 °C. Po končani reakciji smo odparili acetonitril pod znižanim tlakom in preostanku dodali 75 mL diklorometana. Organsko fazo smo sprali z 2 \times 20 mL vode, 20 mL nasičene raztopine NaCl in sušili z Na_2SO_4 . Topilo smo odparili pod znižanim tlakom in dobili rjavkast surov produkt **3**, ki smo ga nato očistili s kolonsko kromatografijo (MF: CH_2Cl_2 :MeOH=30:1) in dobili čisto spojino **3** (90 mg).

Izkoristek reakcije: 13,64 %

Rf(CH_2Cl_2 : MeOH = 9 : 1 + AcOH): 0,76

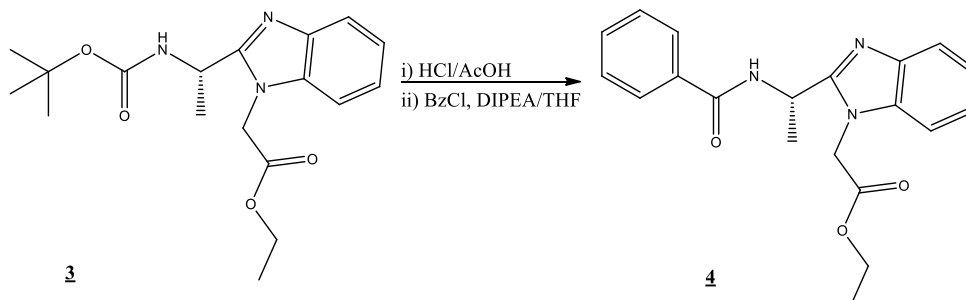
Etil (<i>S</i>)-2-(2-(1-((<i>tert</i> -butoksikarbonil)amino)etil)-1 <i>H</i> -benzoimidazol-1-il)acetat (3)	$M_r=347,41$
Izgled	rumen prašek
Analiza	Rezultati
1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz)	δ [ppm]= 1.30 (t, 3H, $J=7.2$ Hz, CH_2CH_3), 1.44 (s, 9H, 3x CH_3), 1.72 (d, 2H, $J=6.8$ Hz, $-CHCH_3$), 4.25 (k, 2H, $J=7.2$ Hz, CH_2CH_3), 4.96 (d, 1H, $J=18.0$ Hz, $-CH_{2A}-N$), 5.05-5.12 (m, 2H, NCH_2), 5.20-5.25 (m, 2H, $-CH_{2B}-N$ in $NHBoc$), 7.27-7.32 (m, 3H, Ar- H), 7.77-7.80 (m, 1H, Ar- H)
MS (ESI)	m/z: 348,2 ($M+H$) ⁺

Asja Frank:

Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorjev NOD2 z benzimidazolnim skeletom

T _t	118-121 °C
HRMS za C ₁₈ H ₂₆ N ₃ O ₄	izračunano: 348,1923 izmerjeno: 348,1929
IR	ν [cm ⁻¹] = 3334, 1749, 1677, 1512, 1463, 1426, 1373, 1335, 1317, 1245, 1201, 1155, 1112, 1059, 1027, 994, 743, 636

1.5.4 Sinteza etil (S)-2-(2-(1-benzoamidoetil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetata (**4**)



Spojino **3** (0,16 g, 0,47 mmol) smo raztopili v 2 mL AcOH in ohladili na 0 °C. Na ledeni kopeli smo dodali 1M HCl/AcOH (2 mL, 2 mmol) in pustili mešati pri sobni temperaturi 1,5 ure. Nato smo pod znižanim tlakom odparili topilo in dobili suh preostanek, ki smo ga raztopili v 2 mL THF. Na ledeni kopeli smo dodali DIPEA (162 μ L, 0,93 mmol) in benzoil klorid (60 μ L, 0,52 mmol) ter reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi 30 minut. Po končani reakciji smo odparili topilo pod znižanim tlakom in spojino očistili s kolonsko kromatografijo (MF:CH₂Cl₂:MeOH=30:1) ter dobili 127 mg spojine **4**.

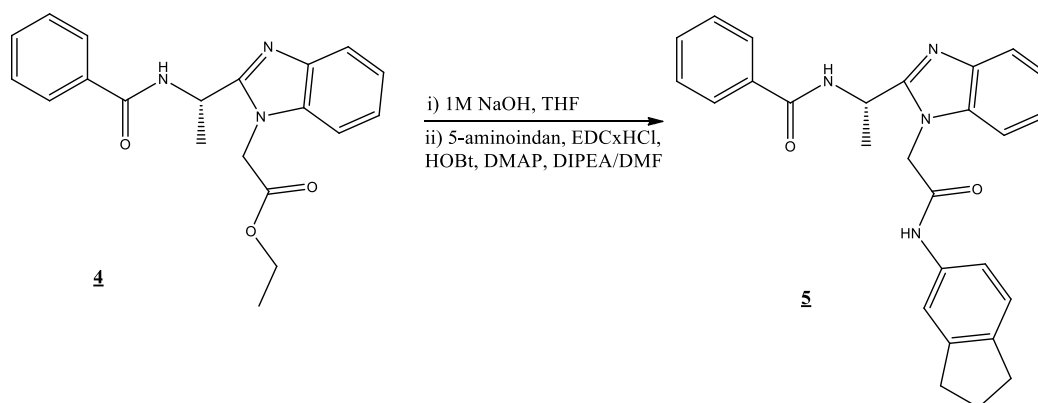
Izkoristek reakcije: 77,7 %

Rf(CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1+): 0,61

Etil (S)-2-(2-(1-benzoamidoetil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetat (4)	M _r =351,40
Izgled	svetlo rumen prah
Analiza	Rezultati
¹ H-NMR (DMSO-d ₆ , 400 MHz)	δ [ppm]= 1.00 (t, 3H, J=7.2 Hz, CH ₃ CH ₂ -), 1.66 (d, 3H, J=6.8 Hz, CH ₃ CH-), 3.73-3.97 (m, 2H, -CH ₂ CH ₃), 5.18 (d, 1H, J= 18.0 Hz, NCH _{2A}), 5.25 (d, 1H, J= 18.0 Hz, NCH _{2B}), 5.51-5.59 (m, 1H, -CH-), 7.18-7.24 (m, 2H, Ar-H), 7.42-7.53 (m, 4H, Ar-H), 7.63-7.66 (m, 1H, Ar-H), 7.86-7.89 (m, 2H, Ar-H), 9.04 (d, 1H, J=8.8 Hz, -NH-)
MS (ESI)	m/z: 352,2 (M+H) ⁺
T _t	192-195 °C

HRMS za C ₂₀ H ₂₂ N ₃ O ₃	izračunano: 352,1661 izmerjeno: 352,1653
IR	ν [cm ⁻¹] = 3252, 2988, 1744, 1638, 1531, 1514, 1461, 1428, 1341, 1279, 1201, 1120, 1026, 737, 701

1.5.5 Sinteza (S)-N-(1-(1-(2-((2,3-dihidro-1H-inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etil)benzamida (**5**)



Spojino **4** (57 mg, 0,163 mmol) smo raztopili v 2 mL THF, dodali 1M NaOH (977 μ L, 0,98 mmol) in pustili mešati 30 minut. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes nakisali z 1M HCl do pH=5 in odparili topilo pod znižanim tlakom. S surovim produktom smo takoj vstopili v naslednjo sintezno stopnjo, v kateri smo surovo kislino (52 mg, 0,16 mmol) raztopili v 2 mL DMF in dodali 5-aminoindan (17 mg, 0,13 mmol), EDCxHCl (46 mg, 0,24 mmol), HOBt (33 mg, 0,24 mmol), DIPEA (51 μ L, 0,29 mmol) in za konico spatule DMAP. Reakcijsko zmes smo 48 ur mešali pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes zlili na 10 mL zmesi ledu in vode, pri čemer je izpadla bela oborina, ki smo jo odfiltrirali, sprali z etrom, posušili na zraku in dobili 38 mg spojine **5**.

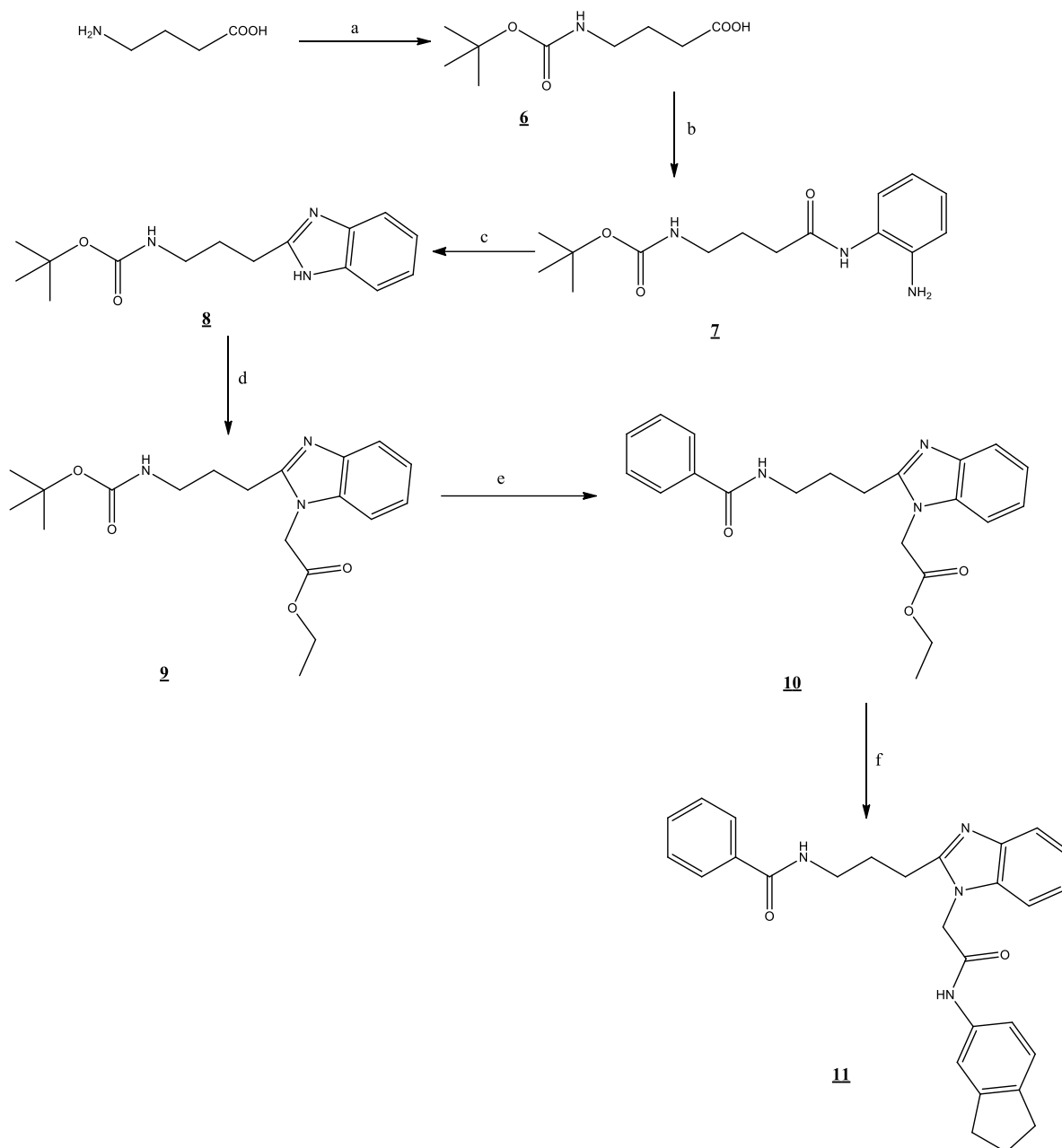
Izkoristek reakcije: 53,2 %

Rf(CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1): 0,77

(S)-N-(1-(1-(2-((2,3-dihidro-1H-inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etil)benzamid (5)	M _r =438,52
Izgled	bel prah
Analiza	Rezultati

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz)	$\delta[\text{ppm}] = 1.68$ (d, 3H, $J=6.8$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH-}$), 1.94-2.01 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2.76-2.77 (m, 4H, $2 \times \text{Ph-CH}_2$), 5.17 (d, 1H, $J=17.2$ Hz, CH_2AN), 5.25 (d, 1H, $J=17.2$ Hz, CH_2BN), 5.47-5.54 (m, 1H, $-\text{CH-}$), 7.08-7.10 (m, 1H, Ar-H), 7.17-7.22 (m, 3H, Ar-H), 7.36-7.38 (m, 3H, Ar-H), 7.45-7.49 (m, 2H, Ar-H), 7.64 (d, 1H, $J=6.4$ Hz, Ar-H), 7.84 (d, 2H, $J=7.6$ Hz, Ar-H), 9.05 (d, 1H, $J=7.6$ Hz, $-\text{CHNH-}$), 10.28 (s, 1H, $-\text{CONH-}$)
MS (ESI)	m/z : 437,2 (M-H) $^-$
T_t	> 300 °C
HRMS za $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_2$	izračunano: 437,1978 izmerjeno: 437,1975
IR	$\nu [\text{cm}^{-1}] = 3249, 1671, 1633, 1537, 1464, 1436, 1338, 1281, 1216, 741, 701$
HPLC (254nm)	100%, $t_r = 12.59$ min
^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz)	$\delta[\text{ppm}] = 19.06, 25.12, 31.73, 32.41, 41.50, 110.08, 115.51, 117.38, 118.82, 121.58, 124.07, 127.52, 128.01, 133.53, 136.62, 138.69, 141.73, 144.06, 155.82, 165.05, 165.79$

1.6 Reakcijska shema 2:



a: NaHCO_3 , Boc-anhidrid, dioksan/voda

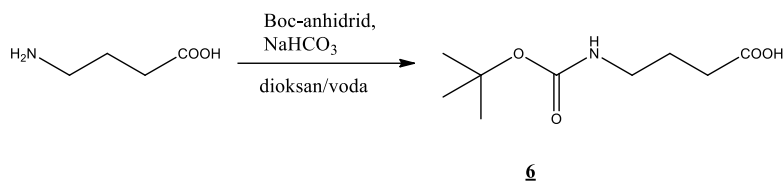
b: 1,2-diaminobenzen, DIPEA, $\text{EDC} \times \text{HCl}$, HOBt, DMAP, THF

c: AcOH, 70 °C

d: etil 2-bromoacetat, K_2CO_3 , acetonitril, 70 °C

e: i) 1M HCl/AcOH, AcOH; ii) DIPEA, benzoil klorid, THF, 0 °C

f: i) 1M NaOH, THF; ii) 5-aminoindan, $\text{EDC} \times \text{HCl}$, HOBt, DIPEA, DMAP, DMF

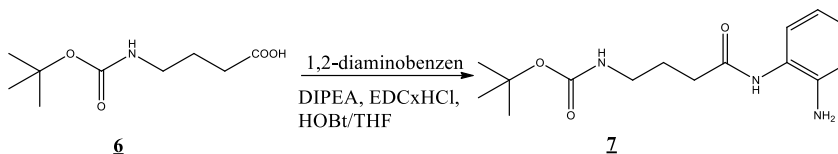
1.6.1 Sinteza 4-((*tert*-butoksikarbonil)amino)butanojske kisline (**6**)

V 250 mL bučki smo v zmesi dioksan/voda (70/30) raztopili 4-aminobutanojsko kislino (4,13 g, 40 mmol) in dodali NaHCO₃ (5,04 g, 60 mmol). S kapalnikom smo v zmes počasi (20 min) dokapavali raztopino Boc-anhidrida v 15 mL dioksana. Reakcijsko zmes smo pustili mešati pri sobni temperaturi 24 ur in po končani reakciji odparili dioksan pod znižanim tlakom. Zaostalo alkalno vodno fazo smo sprali z 20 mL etra. Vodno fazo smo nakisali z 1M HCl na ledeni kopeli do pH=2-3. Nakisano vodno fazo smo ekstrahirali s 3 × 50 mL etilacetata. Združene organske faze smo sprali s 50 mL nasičene raztopine NaCl in sušili z Na₂SO₄. Po odparevanju topila pod znižanim tlakom smo dobili spojino **6** kot viskozno prozorno tekočino (8,12 g).

Izkoristek reakcije: 85,3 %

Rf(CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1 + AcOH): 0,58

4-((<i>tert</i> -butoksikarbonil)amino)butanojska kislina (6)		M _r =203,12
Izgled	prozorna viskozna tekočina	
Analiza	Rezultati	
¹ H-NMR (CDCl ₃ , 400 MHz)	δ[ppm]=1.44 (s, 9H, 3×CH ₃), 1.82 (kvintet, 2H, J=7.2 Hz, CH ₂ CH ₂ CH ₂), 2.40 (t, 2H, J= 7.2 Hz, CH ₂ CH ₂ CH ₂), 3.19 (k, 2H, J= 6.4 Hz, CH ₂ CH ₂ CH ₂), 4.67-4.68 (m, 1H, -NH-)	
IR	ν [cm ⁻¹] = 3350, 2980, 1688, 1522, 1366, 1271, 1250, 1162	
Tt	Lit.: /	

1.6.2 Sinteza *tert*-butil (4-((2-aminofenil)amino)-4-oksobutil)karbamata (**7**)

Raztopini spojine **6** (3,50 g, 17,3 mmol) v THF (60 mL) smo dodali EDC \times HCl (5,75 g, 30 mmol), HOBT (4,05 g, 30 mmol) in 1,2-diaminobenzene (2,38 g, 22 mmol). V reakcijsko zmes smo nato počasi dokopavali DIPEA (5,3 mL, 30 mmol), dodali še za konico spatule DMAP in jo pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo odparili THF pod znižanim tlakom. V bučko smo suhemu preostanku dodali 100 mL diklorometana. Organsko fazo smo sprali z 2 \times 50 mL vode in 50 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili z Na₂SO₄, prefiltrirali in odparili topilo pod znižanim tlakom. Po uparivanju je v bučki ostala surova spojina **7** kot bela amorfna snov (5,08 g).

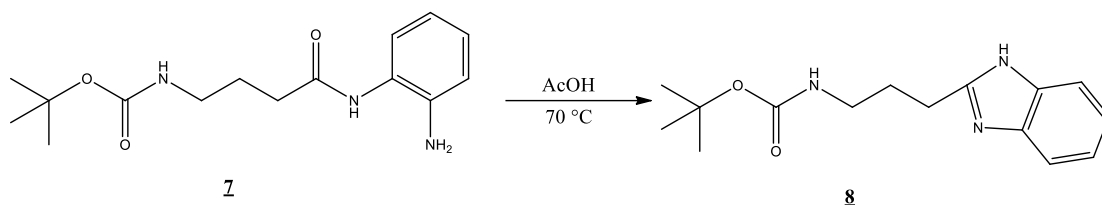
Izkoristek reakcije: 84,8 %

Rf(CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1 + AcOH): 0,66

<i>tert</i> -butil (4-((2-aminofenil)amino)-4-oksobutil)karbamata (7)		M _r =293,17
Izgled	svetlo rjav prašek	
Analiza	Rezultati	
¹ H-NMR (CDCl ₃ , 400 MHz)	δ [ppm]=1.44 (s, 9H, 3 \times CH ₃), 1.85-1.91 (m, 2H, CH ₂ CH ₂ CH ₂), 2.04-2.44 (m, 2H, CH ₂ CH ₂ CH ₂), 3.25-3.29 (m, 2H, CH ₂ CH ₂ CH ₂), 4.05 (s, 2H, Ar-NH ₂), 4.82 (s, 1H, -NH _{Boc}), 6.76-6.80 (m, 2H, Ar-H), 7.00-7.05 (m, 1H, Ar-H), 7.35 (d, 1H, J=7.6 Hz, Ar-H), 8.23 (s, 1H, ArNHCO)	
MS (ESI)	m/z: 294,2 (M+H) ⁺	
T _t	122-126 °C	
HRMS za C ₁₅ H ₂₄ N ₃ O ₃	izračunano: 294,1818 izmerjeno: 294,1824	

IR	ν [cm^{-1}] = 3333, 1685, 1639, 1586, 1535, 1496, 1456, 1364, 1297, 1273, 1245, 1224, 1167, 1139, 1088, 1058, 1000, 937, 890, 750, 669, 624, 565
----	---

1.6.3 Sinteza terc-butil (3-(1H-benz[d]imidazol-2-il)propil)karbamata (**8**)



Spojino **7** smo raztopili v 50 mL AcOH in 16 ur segrevali pri 70 °C. Po končani reakciji smo odparili AcOH in preostanek raztopili v 100 mL diklorometana. Organsko fazo smo spirali s 3 × 50 mL nasičene raztopine NaHCO₃, 50 mL vode in 50 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo nato sušili z Na₂SO₄, prefiltrirali in odparili topilo pod znižanim tlakom ter dobili spojino **8** (2,60 g) kot umazano bel prah.

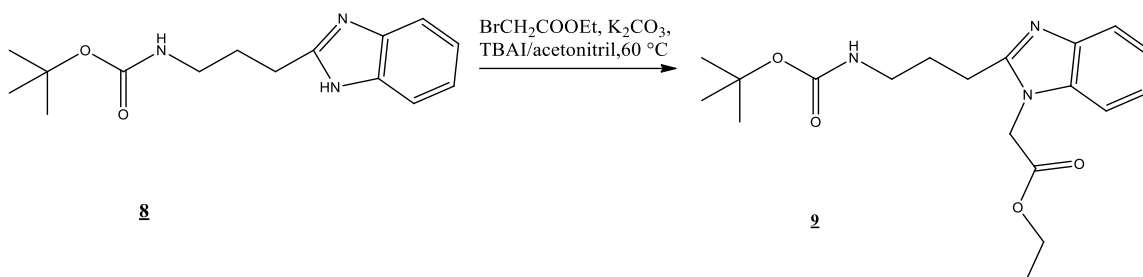
Izkoristek reakcije: 65,2 %

Rf(CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1 + AcOH): 0,48

terc-butil (3-(1H-benz[d]imidazol-2-il)propil)karbamata (8)		M _r =275,16
Izgled	Umazano bel prašek	
Analiza	Rezultati	
¹ H-NMR (CDCl ₃ , 400 MHz)	δ [ppm]=1.47-1.52 (m, 9H, 3×CH ₃), 1.90-1.96 (m, 2H, CH ₂ CH ₂ CH ₂), 2.96-2.99 (m, 2H, CH ₂ CH ₂ CH ₂), 3.26-3.30 (m, 2H, -CH ₂ CH ₂ CH ₂ -), 4.89-4.92 (m, 1H, BocNH-), 7.22-7.26 (m, 2H, Ar-H), 7.61-7.62 (m, 2H, Ar-H), 11.20 (s, 1H, -NH-Het)	
MS (ESI)	m/z: 276,2 (M+H) ⁺	
T _t	139-143 °C	
HRMS za C ₁₅ H ₂₂ N ₃ O ₂	izračunano: 276,1712 izmerjeno: 276,1717	

IR	ν [cm^{-1}] = 3346, 1687, 1536, 1439, 1361, 1271, 1246, 1172, 732, 637
----	---

1.6.4 Sinteza etil 2-(2-(3-((*tert*-butoksikarbonil)amino)propil)-1*H*-benzoimidazol-1-il)acetata (**9**)



V 50 mL bučki smo v 30 mL acetonitrila suspendirali spojino **8** (0,55 g, 2 mmol) in K_2CO_3 (0,42 g, 3 mmol). Suspenzijo smo 15 minut mešali pri sobni temperaturi, nakar smo dodali etil 2-bromoacetat (245 μL , 2,2 mmol) in za konico spatule TBAI. Reakcijsko zmes smo nato preko noči segrevali pri 60 °C. Po končani reakciji smo odparili acetonitril pod znižanim tlakom in preostanku dodali 75 mL diklorometana. Organsko fazo smo sprali z 2×20 mL vode, 20 mL nasičene raztopine NaCl in sušili z Na_2SO_4 . Topilo smo odparili pod znižanim tlakom in dobili rjavkast surov produkt, ki smo ga nato očistili s kolonsko kromatografijo (MF: CH_2Cl_2 :MeOH=30:1) in dobili čisto spojino **9** (169 mg).

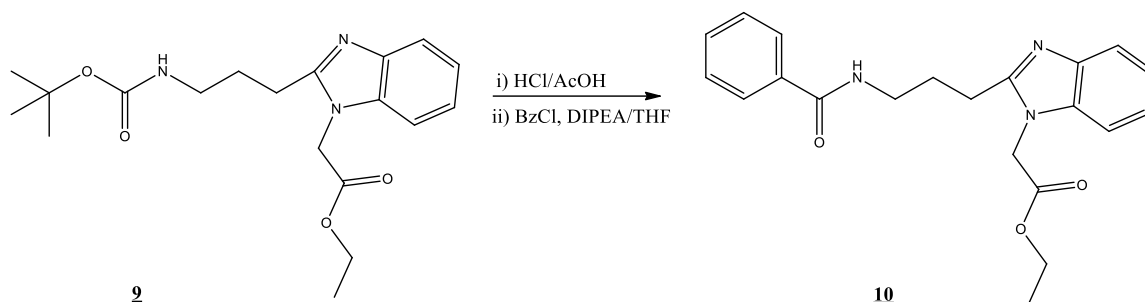
Izkoristek reakcije: 23,4 %

Rf(CH_2Cl_2 : MeOH = 9 : 1 + AcOH): 0,69

etil 2-(2-(3-((<i>tert</i> -butoksikarbonil)amino)propil)-1 <i>H</i> -benzoimidazol-1-il)acetat (9)	$M_r=361,44$
Izgled	Rjav prašek
Analiza	Rezultati
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz)	δ [ppm]=1.22 (t, 3H, $J=7.2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.38 (m, 9H, $3 \times \text{CH}_3$), 1.88 (kvintet, 2H, $J=7.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$),

	2.75 (t, 2H, J=7.6 Hz, CH ₂ CH ₂ CH ₂), 3.02-3.06 (m, 2H, NHCH ₂ CH ₂), 4.16 (q, 2H, J=7.2 Hz, CH ₃ CH ₂ O-), 5.17 (s, 2H, -NCH ₂ -), 6.92 (t, 1H, J=5.6 Hz, NH), 7.14-7.19 (m, 2H, Ar-H), 7.43-7.47 (m, 1H, Ar-H), 7.53-7.57 (m, 1H, Ar-H)
MS (ESI)	m/z: 362,3 (M+H) ⁺
T _t	118-120 °C
HRMS za C ₁₉ H ₂₈ N ₃ O ₄	izračunano: 362,2080 izmerjeno: 362,2075
IR	v [cm ⁻¹] = 3365, 2980, 1734, 1679, 1525, 1466, 1372, 1280, 1243, 1214, 1174, 1033, 742

1.6.5 Sinteza etil 2-(2-(3-benzamidopropil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetata (**10**)



Spojino **9** (88 mg, 0,22 mmol) smo raztopili v 2 mL AcOH in ohladili na 0 °C. Na ledeni kopeli smo dodali 1M HCl/AcOH (2 mL, 2 mmol) in pustili mešati pri sobni temperaturi 1,5 ure. Nato smo pod znižanim tlakom odparili topilo in dobili suh preostanek, ki smo ga raztopili v 2 mL THF. Na ledeni kopeli smo dodali DIPEA (76 µL, 0,44 mmol) in benzoil klorid (28 µL, 0,24 mmol) ter reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi 30 minut. Po končani reakciji smo odparili topilo pod znižanim tlakom in spojino očistili s kolonsko kromatografijo (MF:CH₂Cl₂:MeOH=30:1) ter dobili 81 mg spojine **10**.

Izkoristek reakcije: 100 %

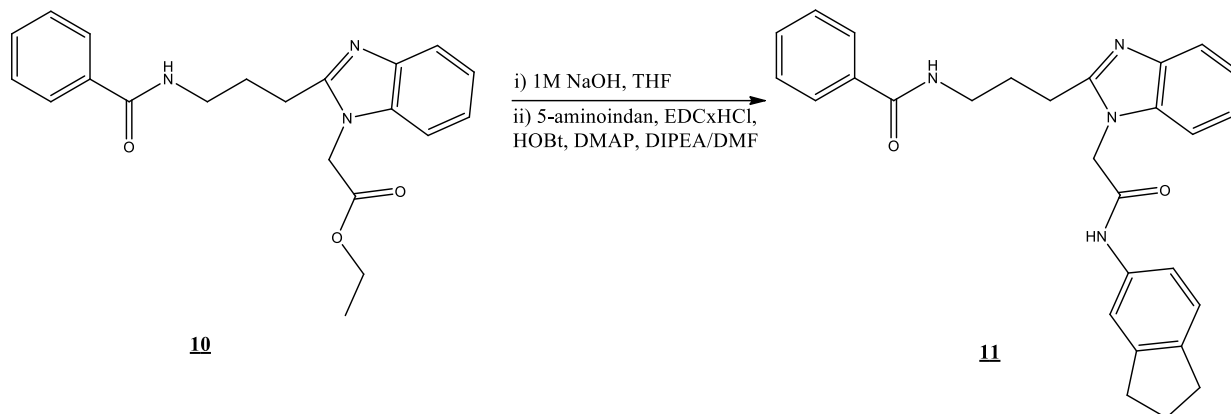
Rf(CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1+): 0,56

Asja Frank:

Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorjev NOD2 z benzimidazolnim skeletom

Etil 2-(2-(3-benzamidopropil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetat (10)	M _r =365,43
Izgled	svetlo rjav prah
Analiza	Rezultati
¹ H-NMR (CDCl ₃ , 400 MHz)	δ[ppm]= 1.18 (t, 3H, J= 7.2 Hz, CH ₃ CH ₂ -), 2.02-2.10 (m, 2H, -CH ₂ -), 2.85 (t, 2H, J=7.6 Hz, -CH ₂ -), 3.38-3.43 (m, 2H, -CH ₂ -), 4.11-4.16 (m, 2H, -CH ₂ CH ₃), 5.19 (s, 2H, -NCH ₂ -), 7.15-7.20 (m, 2H, Ar-H), 7.43-7.64 (m, 3H, Ar-H), 7.85 (dd, 2H, J= 1.2 Hz, J= 8.8 Hz, Ar-H), 7.95 (dd, 2H, J= 1.2 Hz, J= 8.4 Hz, Ar-H), 8.62 (t, 1H, J=5.2 Hz, -NH-)
MS (ESI)	m/z: 364,2 (M-H) ⁻
T _t	86-87 °C
HRMS za C ₂₁ H ₂₂ N ₃ O ₃	izračunano: 364,1661 izmerjeno: 364,1651
IR	v [cm ⁻¹] = 3385, 2988, 1731, 1638, 1532, 1471, 1280, 1217, 1161, 1024, 745, 737, 717, 708, 689

1.6.6 Sinteza N-(3-(1-(2-((2,3-dihidro-1H-inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)propil)benzamid (**11**)



Spojino **10** (58 mg, 0,14 mmol) smo raztopili v 2 mL THF, dodali 1M NaOH (852 μL , 0,85 mmol) in pustili mešati 30 minut. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes nakisali z 1M HCl do pH=5 in odparili topilo pod znižanim tlakom.

Surovo kislino (54 g, 0,14 mmol) smo raztopili v 4 mL DMF in dodali 5-aminoindan (15 mg, 0,11 mmol), EDC \times HCl (41 mg, 0,21 mmol), HOBT (29 mg, 0,21 mmol), DIPEA (44 μL , 0,26 mmol) in za konico spatule DMAP. Reakcijsko zmes smo 24 ur mešali pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes zlili na 10 mL zmesi ledu in vode, pri čemer je izpadla bela oborina, ki smo jo odfiltrirali, sprali z etrom, posušili na zraku in dobili 10 mg spojine **11**.

Izkoristek reakcije: 15,6 %

Rf(CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1+AcOH): 0,46

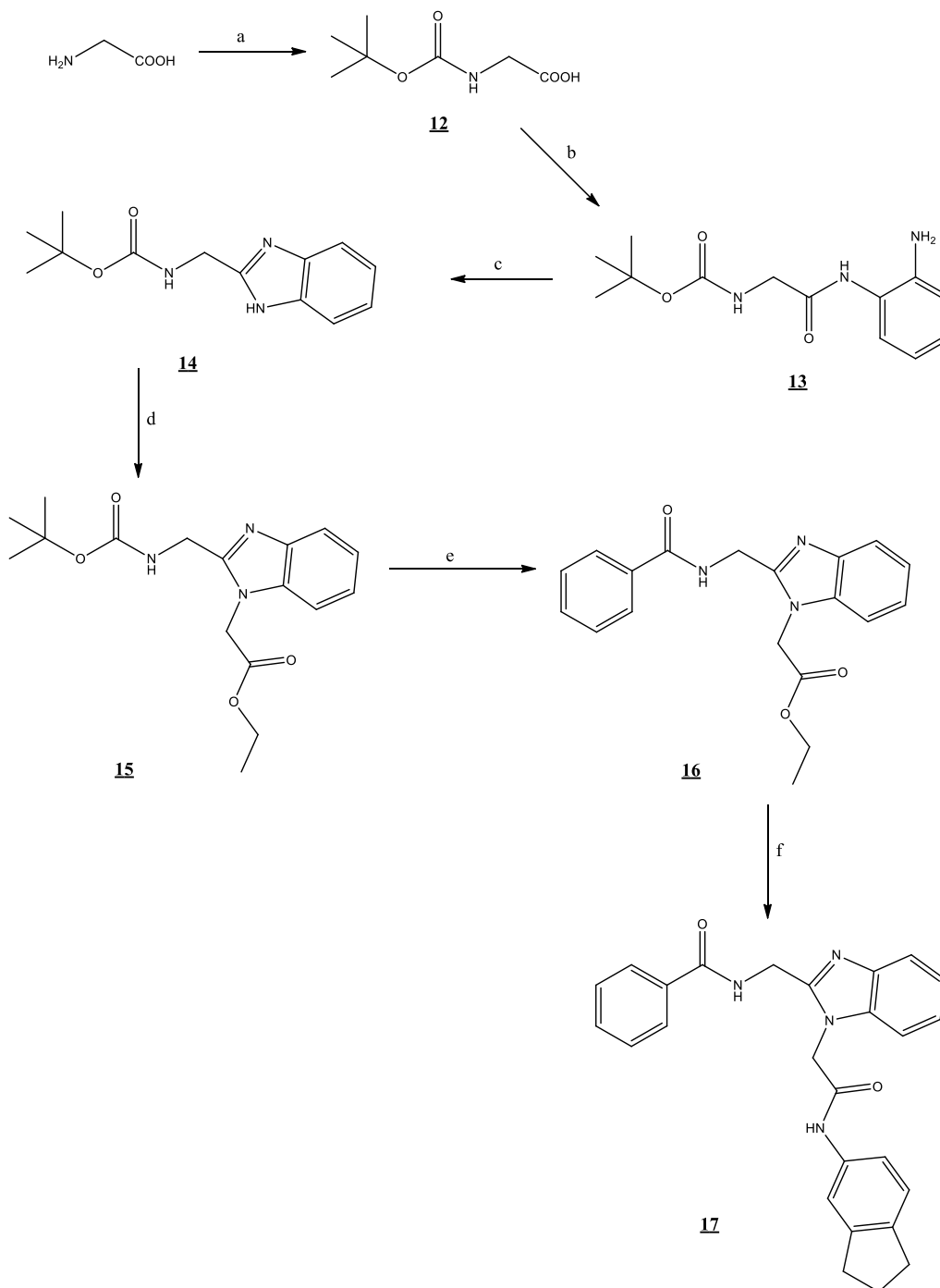
N-(3-(1-(2-((2,3-dihidro-1H-inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)propil)benzamid (11)		M _r =452,55
Izgled	rjav prah	
Analiza	Rezultati	
¹ H-NMR (DMSO-d ₆ , 400 MHz)	δ [ppm]= 1.95-2.07 (m, 2H, CH ₂ -Ar), 2.15 (s, 2H, -CH ₂ CH ₂ CH ₂ -), 2.80 (t, 4H, J=7.2 Hz, 2 \times CH ₂ -Ar), 2.92 (t, 2H, J=7.2 Hz, -CH ₂ CH ₂ CH ₂ -), 3.41-3.46 (m, 2H, -CH ₂ CH ₂ CH ₂ -), 5.09 (s, 2H, -COCH ₂ N-), 7.14-7.21 (m,	

Asja Frank:

Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorjev NOD2 z benzimidazolnim skeletom

	3H, Ar- <u>H</u>), 7.28 (d, 1H, J=8.0 Hz, Ar- <u>H</u>), 7.40-7.60 (m, 6H, Ar- <u>H</u>), 7.82 (d, 2H, J= 8.8 Hz, Ar- <u>H</u>), 8.64 (t, 1H, J= 5.6 Hz, -NH <u>C</u> OCH ₂ -), 10.40 (s, 1H, -CONH <u>A</u> r)
MS (ESI)	m/z: 251,2 (M-H) ⁻
T _t	221-224 °C
HRMS za C ₂₈ H ₂₇ N ₄ O ₂	izračunano: 451,2134 izmerjeno: 451,2144
IR	ν [cm ⁻¹] = 3268, 2941, 1603, 1542, 1490, 1464, 1416, 1284, 742, 706, 542
HPLC (254nm)	100%, tr = 12.63 min
¹³ C NMR (DMSO-d ₆ , 100 MHz)	δ [ppm]= 24.16, 25.12, 26.39, 31.75, 32.42, 109.58, 115.49, 117.40, 118.28, 121.31, 121.62, 124.24, 127.09, 128.17, 130.96, 134.61, 136.65, 138.90, 142.09, 142.15, 144.24, 155.49, 165.17, 166.25, 170.24

1.7 Reakcijska shema 3:



a: NaHCO_3 , Boc-anhidrid, dioksan/voda

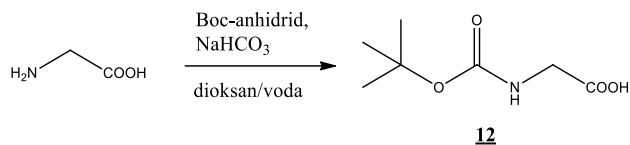
b: 1,2-diamino benzen, DIPEA, $\text{EDC}\times\text{HCl}$, HOBt, DMAP, THF

c: AcOH, 70 °C

d: etil 2-bromoacetat, K_2CO_3 , acetonitril, 70 °C

e: i) 1M HCl/AcOH, AcOH; ii) DIPEA, benzoil klorid, THF, 0 °C

f: i) 1M NaOH, THF; ii) 5-aminoindan, $\text{EDC}\times\text{HCl}$, HOBt, DIPEA, DMAP, DMF

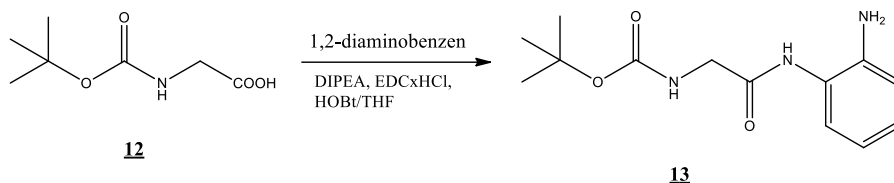
1.7.1 Sinteza (terc-butoksikarbonil)glicina (**12**)

V 100 mL bučki smo v zmesi dioksan/voda (70/30) raztopili glicin (3,00 g, 40 mmol) in dodali NaHCO₃ (5,04 g, 60 mmol). S kapalnikom smo v zmes počasi (20 min) dokapavali raztopino Boc-anhidrida (10,48 g, 48 mmol) v 15 mL dioksana. Dodali smo za konico spatule DMAP in reakcijo pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo odparili dioksan pod znižanim tlakom. Zaostalo vodno fazo smo ekstrahirali z 20 mL etra in jo nato nakisali z 1M HCl do pH=2-3. Nakisano vodno fazo smo ekstrahirali s 3 × 50 mL etilacetata. Združene organske faze smo sprali s 50 mL nasičene raztopine NaCl in sušili z Na₂SO₄. Po odparevanju topila pod znižanim tlakom smo dobili spojino **12** (4,66 g).

Izkoristek reakcije: 66,6 %

Rf(CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1 + AcOH): 0,57

(terc-butoksikarbonil)glicin (12)	M _r =175,18
Izgled	Umazano bel prašek
Analiza	Rezultati
T _t	83-87 °C Lit.: 88-90 °C (30)
IR	ν [cm ⁻¹] = 2978, 1736, 1670, 1529, 1408, 1367, 1280, 1194, 1156, 1055, 957, 856, 673, 580

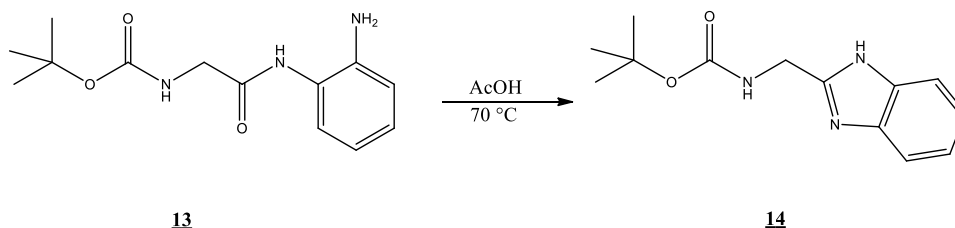
1.7.2 Sinteza *tert*-butil (2-((2-aminofenil)amino)-2-oksoetil)karbamata (**13**)

Raztopini spojine **12** v THF (60 mL) smo dodali EDCxHCl (5,75 g, 30 mmol), HOBT (4,05 g, 30 mmol) in 1,2-diaminobenzen (2,38 g, 22 mmol). V reakcijsko zmes smo počasi (20 min) dokapavali DIPEA (5,2 mL, 30 mmol), dodali še za konico spatule DMAP in jo pustili mešati 48 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo v bučko dodali 20 mL vode in zmes topil odparili pod znižanim tlakom. Preostanek smo raztopili v 100 mL diklorometana. Organsko fazo smo sprali z 2 × 50 mL vode, 50 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo nato posušili z Na₂SO₄, prefiltrirali in odparili topilo pod znižanim tlakom. Po uporevanju smo dobili spojino **13** (3,45 g).

Izkoristek reakcije: 74,2 %

Rf(CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1 + AcOH): 0,59

<i>tert</i> -butil (2-((2-aminofenil)amino)-2-oksoetil)karbamata (13)		M _r =265,31
Izgled	rjavi kristali	
Analiza	Rezultati	
¹ H-NMR (DMSO-d ₆ , 400 MHz)	δ[ppm]=1.39 (s, 9H, 3×CH ₃), 3.73 (d, 2H, J=5.6 Hz, -NHCH ₂ CO-), 4.87 (s, 2H, -NH ₂), 6.50-6.55 (m, 1H, Ar-H), 6.69-6.71 (m, 1H, Ar-H), 6.89-6.92 (m, 1H, Ar-H), 7.04 (t, 1H, J=6.0 Hz, -NHCH ₂ -), 9.08 (s, 1H, -CONH-)	
MS (ESI)	m/z: 266,2 (M+H) ⁺	
T _t	119-123 °C	
HRMS za C ₁₃ H ₂₀ N ₃ O ₃	izračunano: 266,1505 izmerjeno: 266,1502	
IR	ν [cm ⁻¹] = 3249,1701, 1676, 1593, 1526, 1459, 1366, 1290, 1252, 1153,1049, 942, 860, 746, 702, 517	

1.7.3 Sinteza terc-butil ((1H-benz[d]imidazol-2-il)metil)karbamata (**14**)

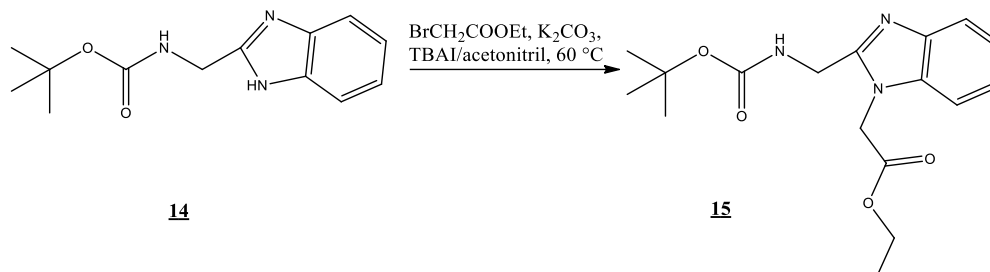
Spojino **13** smo raztopili v 40 mL AcOH in 20 ur segrevali pri 70 °C. Po končani reakciji smo odparili AcOH in preostanek raztopili v 100 mL diklorometana. Organsko fazo smo spirali s 3 × 50 mL nasičene raztopine NaHCO₃, 50 mL vode in 50 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo nato sušili z Na₂SO₄, prefiltrirali in odparili topilo pod znižanim tlakom ter dobili spojino **14** (4,16 g) kot bež prašek.

Izkoristek reakcije: 100 %

Rf(CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1 + AcOH): 0,62

terc-butil ((1H-benz[d]imidazol-2-il)metil)karbamata (14)		M _r =247,29
Izgled	bež prašek	
Analiza	Rezultati	
¹ H-NMR (DMSO-d ₆ , 400 MHz)	δ[ppm]= 1.42 (s, 9H, 3×CH ₃), 4.36 (d, 2H, J=5.6 Hz, -NHCH ₂ -), 7.14-7.16 (m, 2H, Ar-H), 7.44 (t, 1H, J=5.2 Hz, NH), 7.49-7.51 (m, 2H, Ar-H), 12.23 (s, 1H, -NH-Het)	
MS (ESI)	m/z: 248,1 (M+H) ⁺	
T _t	184-186 °C	
HRMS za C ₁₃ H ₁₈ N ₃ O ₂	izračunano: 248,1399 izmerjeno: 248,1401	
IR	ν [cm ⁻¹] = 3340, 1683, 1525, 1438, 1392, 1367, 1311, 1278, 1253, 1168, 1025, 936, 858, 772, 753, 735, 634	

1.7.4 Sinteza etil 2-(2-(((*tert*-butoksikarbonil)amino)metil)-1*H*-benzo[d]imidazol-1-il)acetata (**15**)



V 50 mL bučki smo v 30 mL acetonitrila suspendirali spojino **14** (0,49 g, 2 mmol) in K_2CO_3 (0,41 g, 3 mmol). Suspenzijo smo 15 minut mešali pri sobni temperaturi, nakar smo dodali etil 2-bromoacetat (245 μL , 2,2 mmol) in za konico spatule TBAI. Reakcijsko zmes smo nato preko noči segrevali pri 60 $^\circ\text{C}$. Po končani reakciji smo odparili acetonitril pod znižanim tlakom in preostanku dodali 75 mL diklorometana. Organsko fazo smo sprali z 2×20 mL vode, 20 mL nasičene raztopine NaCl in sušili z Na_2SO_4 . Topilo smo odparili pod znižanim tlakom in dobili rjavkasto surov produkt, ki smo ga nato očistili s kolonsko kromatografijo (MF: $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=30:1$) in dobili čisto spojino **15**.

Izkoristek reakcije: 30,6 %

Rf($\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 9 : 1 + \text{AcOH}$): 0,63

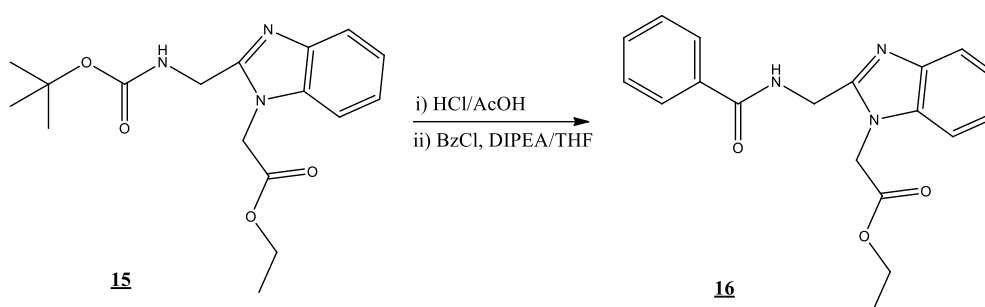
Etil 2-(2-(((<i>tert</i> -butoksikarbonil)amino)metil)-1 <i>H</i> -benzo[d]imidazol-1-il)acetat (15)	$M_r=333,38$
Izgled	rumeni kristali
Analiza	Rezultati
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz)	$\delta[\text{ppm}] = 1.27$ (t, 3H, $J=7.2$ Hz, CH_3CH_2-), 1.45 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$), 4.22 (q, 2H, $J=7.2$ Hz, CH_3CH_2-), 4.59 (d, 2H, $J=5.6$ Hz, $-\text{CH}_2\text{NH}-$), 5.00 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{N}-$), 5.40 (s, 1H, NHBoc), 7.25-7.30 (m, 3H, Ar-H), 7.73-7.75 (m, 1H, Ar-H)
MS (ESI)	$m/z: 334,2$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

Asja Frank:

Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorjev NOD2 z benzimidazolnim skeletom

T _t	135-138 °C
HRMS za C ₁₇ H ₂₄ N ₃ O ₄	izračunano: 334,1767 izmerjeno: 334,1760
IR	v [cm ⁻¹] = 3194, 2995, 1750, 1679, 1465, 1282, 1251, 1194, 1161, 1139, 1027, 855, 744

1.7.5 Sinteza etil 2-(2-(benzamidometil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetata (**16**)



Spojino **15** (0,17 g, 0,45 mmol) smo raztopili v 2 mL AcOH in ohladili na 0 °C. Na ledeni kopeli smo dodali 1M HCl/AcOH (2 mL, 2 mmol) in pustili mešati pri sobni temperaturi 1,5 ure. Nato smo pod znižanim tlakom odparili topilo in dobili suh preostanek, ki smo ga raztopili v 2 mL THF. Na ledeni kopeli smo v raztopino dodali DIPEA (156 µL, 0,90 mmol) in benzoil klorid (57 µL, 0,49 mmol) ter reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi 30 minut. Po končani reakciji smo odparili topilo pod znižanim tlakom in spojino očistili s kolonsko kromatografijo (MF:CH₂Cl₂:MeOH=30:1) ter dobili 142 mg spojine **16**.

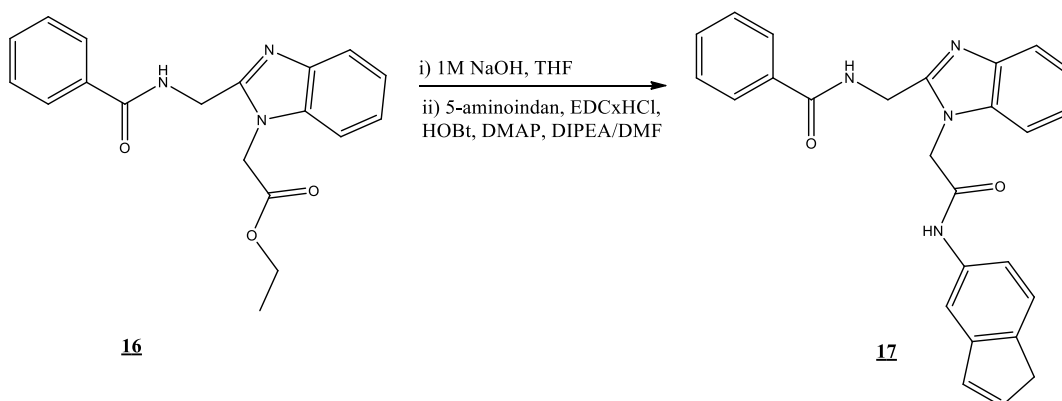
Izkoristek reakcije: 93,3 %

R_f(CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1): 0,55

Etil 2-(2-(benzamidometil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetat (16)	M _r =337,37
Izgled	umazano bel prah
Analiza	Rezultati

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz)	δ [ppm]= 1.08 (t, 3H, $J=7.2$ Hz, $-\text{CH}_3$), 3.96 (q, 2H, $J=7.2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 4.75 (d, 2H, $J=6.0$ Hz, CH_2NH), 5,28 (s, 2H, $-\text{NCH}_2$), 7.18-7.24 (m, 2H, Ar-H), 7.45-7.64 (m, 3H, Ar-H), 7.88-7.96 (m, 4H, Ar-H), 9.17 (t, 1H, $J=5.6$ Hz, $-\text{NH}$ -)
MS (ESI)	m/z : 338,1 (M+H) $^+$
T_t	107-109 $^\circ\text{C}$
HRMS za $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_3$	izračunano: 338,1505 izmerjeno: 338,1504
IR	ν [cm^{-1}] = 3338, 2984, 1751, 1533, 1280, 1251, 1204, 1172, 1068, 1024, 743, 717, 690, 657

1.7.6 Sinteza N-((1-(2-((1H-inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)benzamida (**17**)



Spojino **16** (0,11 g, 0,29 mmol) smo raztopili v 2ml THF, dodali 1M NaOH (1,7 mL, 1,7 mmol) in pustili mešati 30 minut. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes nakisali z 1M HCl do pH=5 in odparili topilo pod znižanim tlakom. S surovim produktom smo takoj nadaljevali naslednjo stopnjo sinteze.

Surovo kislino (99 mg, 0,29 mmol) smo raztopili v 4 mL DMF in dodali 5-aminoindan (31 mg, 0,23 mmol), EDC \times HCl (82 mg, 0,43 mmol), HOBt (58 mg, 0,43 mmol), DIPEA (89 μL , 0,52 mmol) in za konico spatule DMAP. Reakcijsko zmes smo 48 ur mešali pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes zlili na 10 mL zmesi ledu in vode, pri čemer je izpadla bela oborina, ki smo jo odfiltrirali, sprali z etrom, posušili na zraku in dobili 54 mg spojine **17**.

Asja Frank:

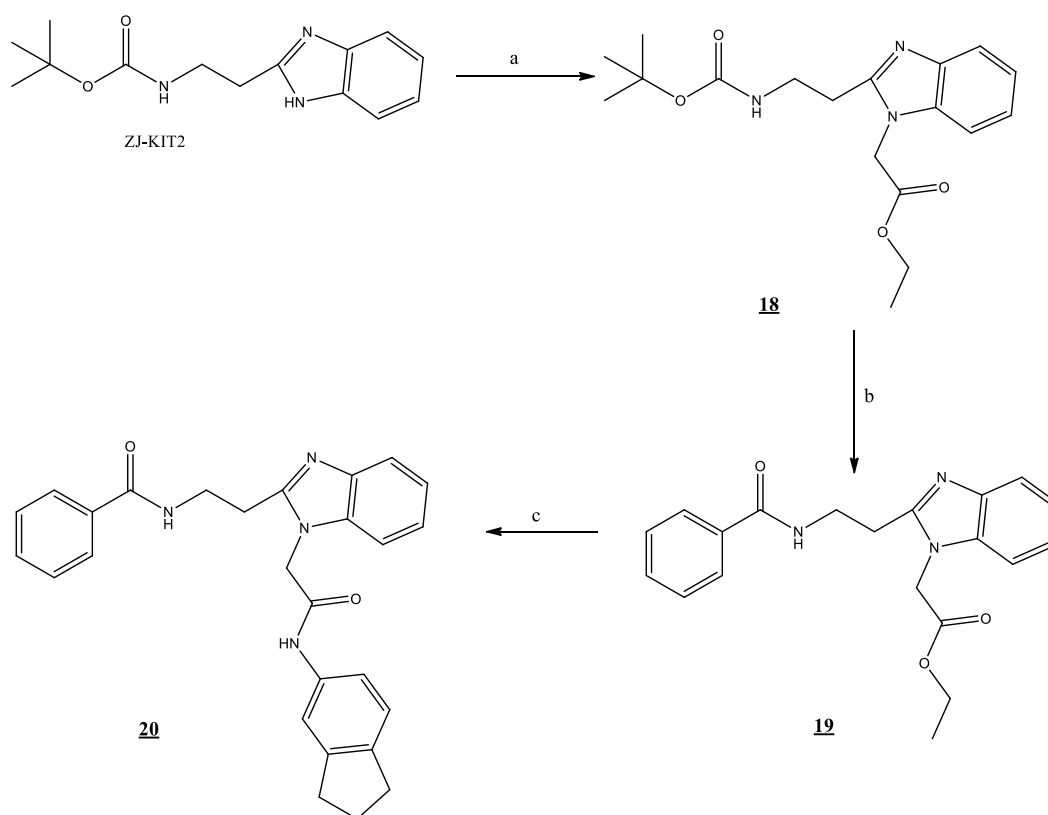
Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorjev NOD2 z benzimidazolnim skeletom

Izkoristek reakcije: 44,4 %

Rf(CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1+AcOH): 0,65

<i>N</i> -((1-(2-((1 <i>H</i> -inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1 <i>H</i> -benzo[d]imidazol-2-il)metil)benzamid (17)		M _r =424,49
Izgled	svetlo rumen prah	
Analiza	Rezultati	
¹ H-NMR (DMSO-d ₆ , 400 MHz)	δ[ppm]= 1.97-2.04 (m, 2H, -CH ₂ CH ₂ CH ₂ -), 2.77-2.86 (m, 4H, 2×CH ₂ -Ar), 4.77 (d, 2H, J= 4.4 Hz, CH ₂ NH-), 5.24 (s, 2H, CH ₂ N-), 7.11-7.24 (m, 3H, Ar-H), 7.40-7.62 (m, 7H, Ar-H), 7.87-7.95 (m, 2H, Ar-H), 9.16 (s, 1H, -CH ₂ CONH-), 10.36 (s, 1H, -CONHAr)	
MS (ESI)	m/z: 423,1 (M-H) ⁻	
T _t	278-280 °C	
HRMS za C ₂₆ H ₂₃ N ₄ O ₂	izračunano: 423,1821 izmerjeno: 423,1830	
IR	ν [cm ⁻¹] = 3279, 1672, 1643, 1541, 1489, 1466, 1415, 1289, 1218, 821, 739, 693	
HPLC (254nm)	100%, tr = 11.63 min	
¹³ C NMR (DMSO-d ₆ , 100 MHz)	δ[ppm]= 25.11, 31.73, 32.41, 36.20, 46.27, 109.90, 115.54, 117.42, 118.77, 121.77, 122.31, 124.16, 127.34, 127.53, 128.22, 128.35, 131.40, 133.63, 135.79, 136.55, 138.90, 141.80, 144.18, 152.50, 165.10, 166.36	

1.8 Reakcijska shema 4:

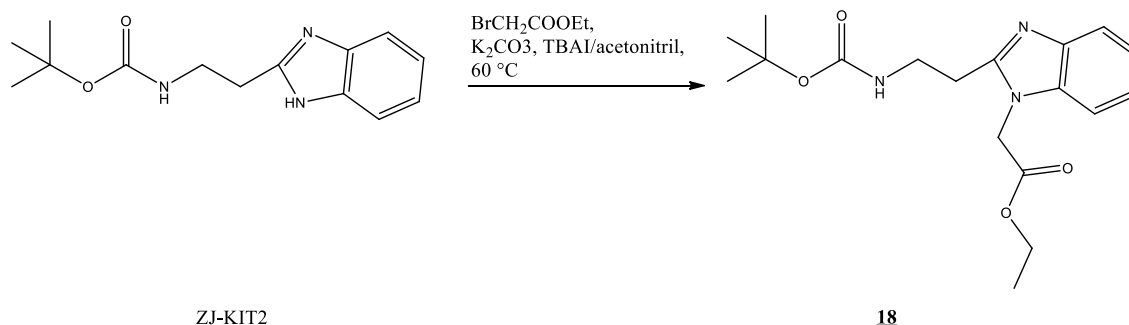


a: etil 2-bromoacetat, K_2CO_3 , acetonitril, 70 °C

b: i) 1M HCl/AcOH, AcOH; ii) DIPEA, benzoil klorid, 0 °C

c: i) 1M NaOH, THF; ii) 5-aminoindan, EDC \times HCl, HOBT, DIPEA, DMAP, DMF

1.8.1 Sinteza etil 2-(2-(2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)etil)-1H-benz[d]imidazol-1-il)acetata (**18**)



V 50 mL bučki smo v 15 mL acetonitrila suspendirali spojino ZJ-KIT2 (0,26 g, 1 mmol) in K_2CO_3 (0,21 g, 1,5 mmol). Suspenzijo smo 15 minut mešali pri sobni temperaturi, nakar smo dodali etil 2-bromoacetat (122 μL , 1,1 mmol) in za konico spatule TBAI. Reakcijsko zmes smo nato preko noči segrevali pri 60 $^\circ\text{C}$. Po končani reakciji smo odparili acetonitril pod znižanim tlakom in preostanku dodali 50 mL diklorometana. Organsko fazo smo sprali z 2×15 mL vode, 15 mL nasičene raztopine NaCl in sušili z Na_2SO_4 . Topilo smo odparili pod znižanim tlakom in dobili amorfen surov produkt oranžne barve, ki smo ga nato očistili s kolonsko kromatografijo (MF: CH_2Cl_2 :MeOH=30:1) in dobili čisto spojino **18**.

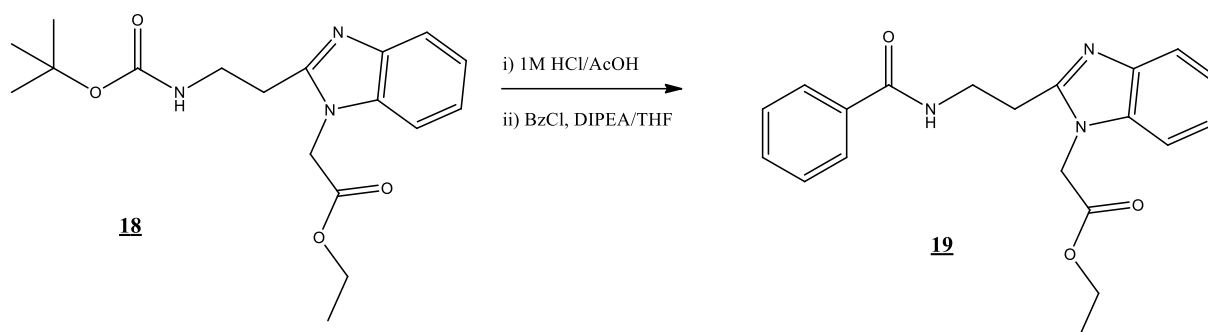
Izkoristek reakcije: 96,8 %

Rf(CH_2Cl_2 : MeOH = 9 : 1 + AcOH): 0,65

Etil 2-(2-(2-((<i>tert</i> -butoksikarbonil)amino)etil)-1H-benz[d]imidazol-1-il)acetat (18)	$M_r=347,41$
Izgled	rjava amorfna snov
Analiza	Rezultati
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz)	$\delta[\text{ppm}] = 1.26$ (t, 3H, $J=7.2$ Hz, CH_2CH_3), 1.42 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$), 3.01 (t, 2H, $J=6.0$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 3.72 (q, 2H, $J=6.0$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 4.23 (q, 2H, $J=7.2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 4.83 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{N}-$), 5.49 (s, 1H, NHBoc), 7.21-7.28 (m, 3H, Ar-H), 7.72-7.75 (m, 1H, Ar-H)
MS (ESI)	m/z : 348,2 ($\text{M}+\text{H}$) ⁺

T _t	83-84 °C
HRMS za C ₁₈ H ₂₆ N ₃ O ₄ :	izračunano: 348,1923 izmerjeno: 348,1925
IR	v [cm ⁻¹] = 3221, 2972, 1745, 1702, 1466, 1440, 1364, 1288, 1276, 1222, 1176, 1139, 1061, 1029, 958, 768, 748

1.8.2 Sinteza etil 2-(2-(2-benzamidoetil)-1H-benzoimidazo-1-il)acetata (**19**)



Spojino **18** (0,48 g, 1,23 mmol) smo raztopili v 10 mL AcOH in ohladili na 0 °C. Na ledeni kopeli smo dodali 1M HCl/AcOH (2 mL, 2 mmol) in mešali pri sobni temperaturi 1,5 ure. Nato smo pod znižanim tlakom odparili topilo in dobili suh preostanek, ki smo ga raztopili v 6 mL THF. Na ledeni kopeli smo dodali DIPEA (429 µL, 2,47 mmol) in benzoil klorid (157 µL, 1,36 mmol) ter reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi 30 minut. Po končani reakciji smo odparili topilo pod znižanim tlakom in spojino očistili s kolonsko kromatografijo (MF: CH₂Cl₂:MeOH=30:1) ter dobili rjavkasto amorfno snov **19** (176 mg).

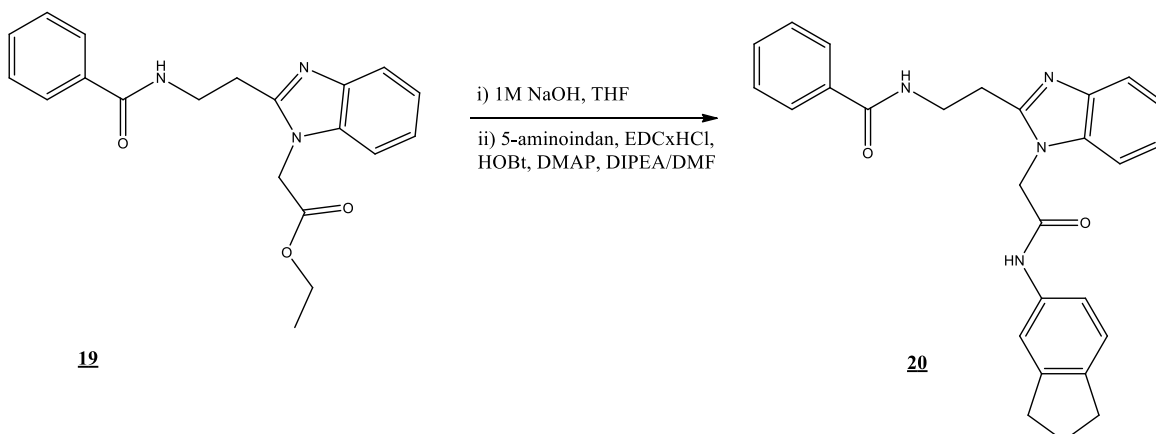
Izkoristek reakcije: 40,6 %

Rf(CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1 + AcOH): 0,61

Etil 2-(2-(2-benzamidoetil)-1H-benzoimidazo-1-il)acetat (19)	M _r =351,4
Izgled	svetlo rjav prah
Analiza	Rezultati
¹ H-NMR (CDCl ₃ , 400 MHz)	δ[ppm]= 1.23 (t, 3H, J= 7.2 Hz, CH ₃ CH ₂ -), 3.12 (t, 2H, J= 6.0 Hz, CH ₂ CH ₂), 4.04 (q, 2H, J= 6.0 Hz, CH ₂ CH ₂), 4.17 (q, 2H, J=7.2 Hz, CH ₂ CH ₃), 4.84 (s, 2H, NCH ₂),

	7.22-7.28 (m, 3H, Ar-H), 7.34-7.47 (m, 3H, Ar-H), 7.73-7.82 (m, 4H, 3×Ar-H+NHC=O)
MS (ESI)	m/z: 352,2 (M+H) ⁺
T _t	84-85 °C
HRMS za C ₂₀ H ₂₂ N ₃ O ₃	izračunano: 352,1661 izmerjeno: 352,1659
IR	ν [cm ⁻¹] = 2988, 1731, 1650, 1535, 1469, 1447, 1377, 1286, 1218, 1198, 1028, 780, 765, 745, 702

1.8.3 Sinteza N-(2-(1-(2-((2,3-dihidro-1H-inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1H-benzoimidazol-2-il)etil) benzamida (**20**)



Spojino **19** (65,0 mg, 0,17 mmol) smo raztopili v 2 mL THF in dodali 1M NaOH (675 µL, 0,67 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali 1 uro pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes nakisali z 1M HCl do pH=5 in odparili topilo pod znižanim tlakom. S surovim produktom smo takoj nadaljevali naslednjo stopnjo sinteze.

Surovo kislino (53 mg, 0,17 mmol) smo raztopili v 1 mL DMF in dodali 5-aminoindan (18 mg, 0,13 mmol), EDCxHCl (48 mg, 0,25 mmol), HOBT (34 mg, 0,25 mmol), DIPEA (52 µL, 0,30 mmol) in za konico spatule DMAP. Reakcijsko zmes smo 48 ur mešali pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes zlili na 10 mL zmesi ledu in vode, pri čemer je izpadla bela oborina, ki smo jo odfiltrirali, sprali z etrom, posušili na zraku in dobili 49 mg spojine **20**.

Asja Frank:

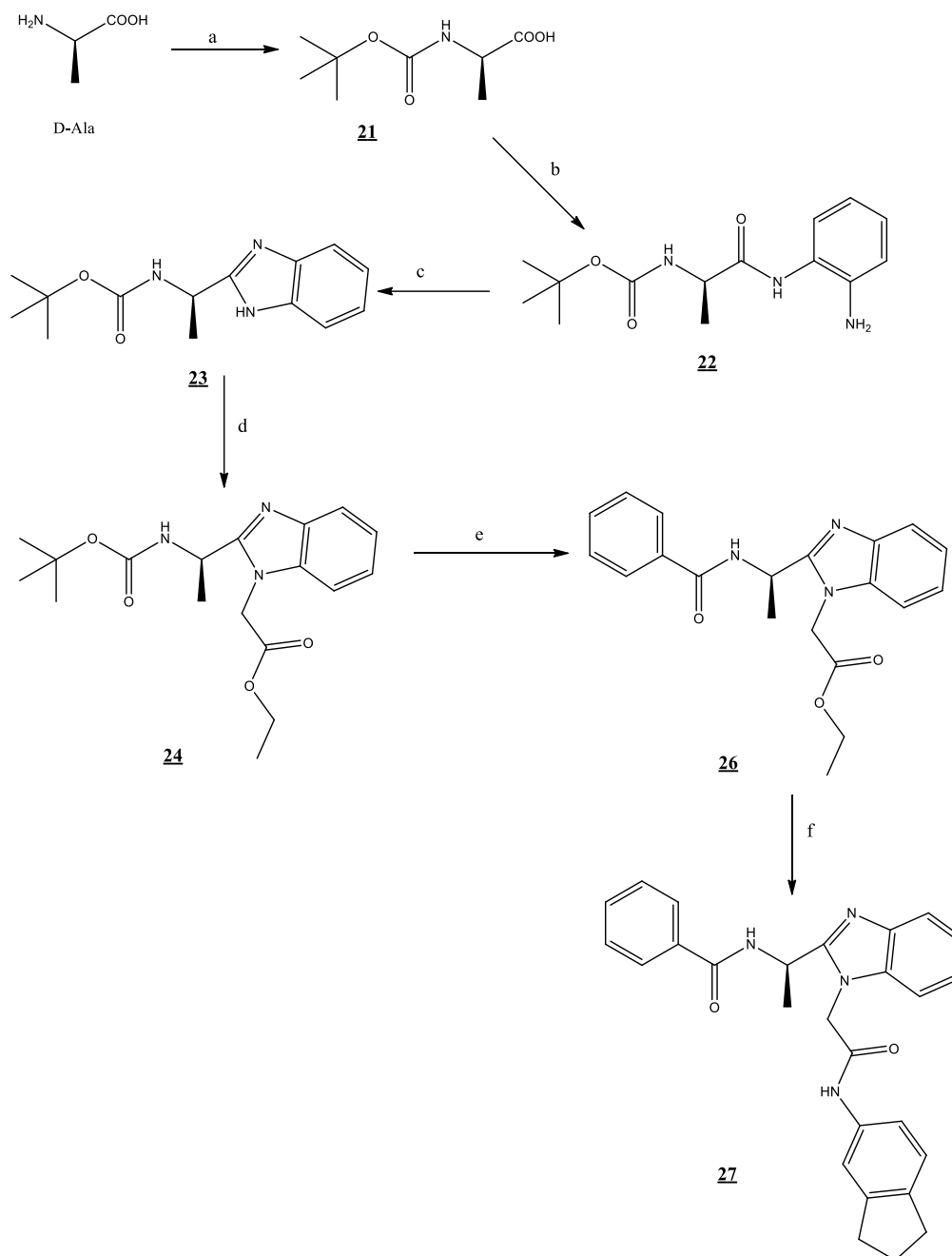
Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorjev NOD2 z benzimidazolnim skeletom

Izkoristek reakcije: 67,5 %

Rf(CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1 + AcOH): 0,60

N-(2-(1-(2-((2,3-dihidro-1 <i>H</i> -inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1 <i>H</i> -benzoimidazol-2-il)etil)benzamid (20)		M _r =438,52
Izgled	umazano bel prah	
Analiza	Rezultati	
¹ H-NMR (DMSO-d ₆ , 400 MHz)	δ[ppm]= 1.94-2.02 (m, 2H, CH ₂ CH ₂ CH ₂), 2.77-2.82 (m, 4H, 2xPh-CH ₂), 3.14 (t, 2H, J= 7.2 Hz, -CH ₂ CH ₂ NH), 3.76-3.81 (m, 2H, -CH ₂ CH ₂ NH), 5.13 (s, 2H, NCH ₂ CO), 7.13-7.20 (m, 3H, Ar-H), 7.29 (d, 1H, J=7.6 Hz, Ar-H), 7.43-7.52 (m, 5H, Ar-H), 7.60-7.62 (m, 1H, Ar-H), 7.84 (d, 2H, J= 7.2 Hz, Ar-H), 8.70 (t, 1H, J= 5.6 Hz, CH ₂ NHCO), 10.43 (s, 1H, CONHAr)	
MS (ESI)	m/z: 437,2 (M-H) ⁻	
T _t	244-248 °C	
HRMS za C ₂₇ H ₂₅ N ₄ O ₂	izračunano: 437,1978 izmerjeno: 437,1969	
IR	ν [cm ⁻¹] = 3291, 1634, 1616, 1549, 1488, 1460, 1439, 1416, 1196, 740, 709, 690	
HPLC (254nm)	100%, tr = 12.58 min	
¹³ C NMR (DMSO-d ₆ , 100 MHz)	δ[ppm]= 25.11, 26.75, 31.74, 32.43, 37.45, 46.07, 109.64, 115.47, 117.38, 118.46, 121.41, 121.79, 124.24, 127.08, 128.26, 131.16, 134.32, 135.57, 136.66, 138.91, 142.19, 144.25, 153.69, 165.15, 166.29	

1.9 Reakcijska shema 5:



a: NaHCO_3 , Boc-anhidrid, dioksan/voda

b: 1,2-diaminobenzen, DIPEA, $\text{EDC} \times \text{HCl}$, HOBt, DMAP, THF

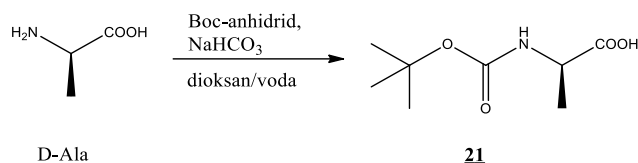
c: AcOH, 70 °C

d: etil 2-bromoacetat, K_2CO_3 , acetonitril, 70 °C

e: i) 1M HCl/AcOH, AcOH; ii) DIPEA, benzoil klorid, THF, 0 °C

f: i) 1M NaOH, THF; ii) 5-aminoindan, $\text{EDC} \times \text{HCl}$, HOBt, DIPEA, DMAP, DMF

1.9.1 Sinteza (terc-butoksikarbonil)-D-alanina (**21**)



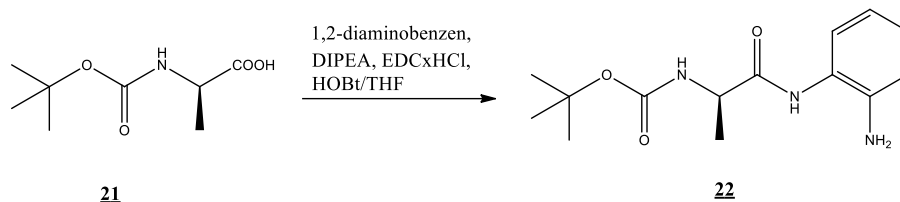
V bučki smo v zmesi dioksan/voda (70/30) raztopili D-alanin (2,00 g, 22,45 mmol) in dodali NaHCO₃ (2,83 g, 33,67 mmol). S kapalnikom smo v zmes počasi (20 minut) dokapavali Boc-anhidrid (5,88 g, 26,94 mmol), raztopljen v 15 mL dioksana. Reakcijsko zmes smo pustili mešati pri sobni temperaturi 24 ur in po končani reakciji odparili dioksan pod znižanim tlakom. Zaostalo vodno fazo smo ekstrahirali z 20 mL etra in jo na ledeni kopeli nakisali z 1M HCl do pH=2-3. Nakisano vodno fazo smo ekstrahirali s 3 × 50 mL etilacetata. Združene organske faze smo sprali s 50 mL nasičene raztopine NaCl in sušili z Na₂SO₄. Po odparevanju topila pod znižanim tlakom smo dobili belkasto amorfno spojino **21** (3,61 g).

Izkoristek reakcije: 85,3 %

Rf(CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1 + AcOH): 0,50

(terc-butoksikarbonil)-D-alanin (21)		M _r =189,21
Izgled	belkasta amorfna snov	
Analiza	Rezultati	
T _t	76-78 °C Lit.: 77-78 °C (31)	
IR	ν [cm ⁻¹] = 3404, 2992, 1732, 1687, 1663, 1508, 1459, 1228, 1156, 1072, 1018, 518	

1.9.2 Sinteza *tert*-butil (*R*)-(1-((2-aminofenil)amino)-1-oksopropan-2-il)karbamata (**22**)



Raztopini spojine **21** (3,58 g, 18,96 mmol) v THF (65 mL) smo dodali EDCxHCl (6,36 g, 33,15 mmol), HOBt (4,45 g, 33,15 mmol) in 1,2-diaminobenzen (2,63 g, 24,30 mmol). V reakcijsko zmes smo nato počasi (20 minut) dokapavali DIPEA (5,7 mL, 33,15 mmol), dodali za konico spatule DMAP in pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo v bučko dodali 20 mL vode in odparili zmes topil pod znižanim tlakom. V bučko smo suh preostanek raztopili v 100 mL diklorometana. Organsko fazo smo sprali z 2 x 50 mL vode, 50 mL nasičene raztopine NaCl in sušili z Na₂SO₄. Vodne faze smo združili in reekstrahirali z 2 x 50 mL diklorometana. Organske faze smo sprali s 50 mL nasičene raztopine NaCl in posušili z Na₂SO₄. Združene organske faze smo prefiltrirali in topilo odparili pod znižanim tlakom ter dobili spojino **22** (4,68 g).

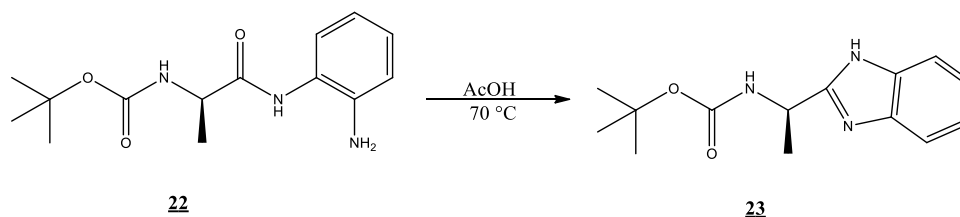
Izkoristek reakcije: 88,4 %

Rf(CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1 + AcOH): 0,62

<i>tert</i> -butil (<i>R</i>)-(1-((2-aminofenil)amino)-1-oksopropan-2-il)karbamata (22)		M _r =279,33
Izgled	rjav prašek	
Analiza	Rezultati	
¹ H-NMR (DMSO-d ₆ , 400 MHz)	δ[ppm]=1.27 (d, 3H, J=6.8 Hz -CH ₃), 1.40 (s, 9H, 3×CH ₃), 4.07-4.14 (m, 1H, -NHCHCH ₃), 4.85 (s, 2H, -NH ₂), 6.52-6.55 (m, 1H, Ar-H), 6.69-6.72 (m, 1H, Ar-H), 6.89-6.94 (m, 1H, Ar-H), 7.08-7.10 (m, 2H, Ar-H + NH), 9.13 (s, 1H, -CONHAr)	
MS (ESI)	m/z: 280,2 (M+H) ⁺	
T _t	139-142 °C	

HRMS za C ₁₄ H ₂₂ N ₃ O ₃	izračunano: 280,1661 izmerjeno: 280,1665
IR	ν [cm ⁻¹] = 3331, 1691, 1652, 1523, 1457, 1311, 1248, 1167, 1068, 1049, 753, 741, 644

1.9.3 Sinteza terc-butil (R)-(1-(1H-benz[d]imidazol-2-il)etil)karbamata (**23**)



Spojino **22** smo raztopili v 30 mL AcOH in čez noč segrevali pri 70 °C. Po končani reakciji smo odparili AcOH in preostanek raztopili v 100 mL diklorometana. Organsko fazo smo ekstrahirali s 3 x 50 mL nasičene raztopine NaHCO₃, 50 mL vode, 50 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo nato sušili z Na₂SO₄, prefiltrirali in odparili topilo pod znižanim tlakom ter dobili surovo spojino **23** (2,74 g).

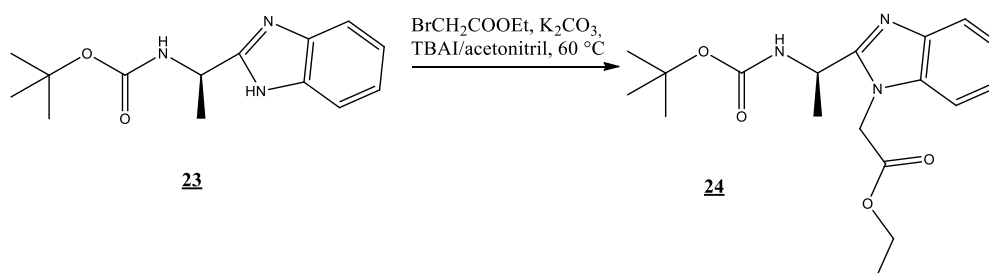
Izkoristek reakcije: 63,2 %

Rf(CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1 + AcOH): 0,52

<i>tert</i> -butil (R)-(1-(1H-benz[d]imidazol-2-il)etil)karbamata (23)		M _r =261,32
Izgled	umazano bel prašek	
Analiza	Rezultati	
¹ H-NMR (CDCl ₃ , 400 MHz)	δ [ppm]= 1.47 (s, 9H, 3×CH ₃ -), 1.75 (d, 3H, J=6.8 Hz, CH ₃ CH-), 4.96 (kvintet, 1H, J=7.2 Hz, -CH-), 5.10 (d, 1H, J= 6.4 Hz, -NH _{Boc} -), 7.23-7.26 (m, 2H, 2 Ar-H), 7.43 (s, 1H, Ar-H), 7.75 (s, 1H, Ar-H), 10.11 (s, 1H, -NH-Het)	
MS (ESI)	m/z: 262,2 (M+H) ⁺	
T _t	222-224 °C	

HRMS za C ₁₄ H ₂₀ N ₃ O ₂	izračunano: 262,1556 izmerjeno: 262,1550
IR	ν [cm ⁻¹] = 3329, 1678, 1522, 1454, 1391, 1338, 1314, 1268, 1164, 1070, 1045, 862, 733, 619

1.9.4 Sinteza etil (*R*)-2-(2-(1-((*tert*-butoksikarbonil)amino)etil)-1*H*-benz[d]imidazol-1-il)acetata (**24**)



V 50 mL bučki smo v 30 mL acetonitrila suspendirali spojino **23** (0,52 g, 2 mmol) in K₂CO₃ (0,41 g, 3 mmol). Suspenzijo smo 15 minut mešali pri sobni temperaturi, nakar smo dodali etil 2-bromoacetat (245 μ L, 2,2 mmol) in za konico spatule TBAI. Reakcijsko zmes smo nato preko noči segrevali pri 60 °C. Po končani reakciji smo odparili acetonitril pod znižanim tlakom in preostanek raztopili v 75 mL diklorometana. Organsko fazo smo sprali z 2 \times 20 mL vode, 20 mL nasičene raztopine NaCl in sušili z Na₂SO₄. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom in dobili rjavkast surov produkt, ki smo ga nato očistili s kolonsko kromatografijo (MF: CH₂Cl₂:MeOH=30:1) in dobili čisto spojino **24**.

Izkoristek reakcije: 86,7 %

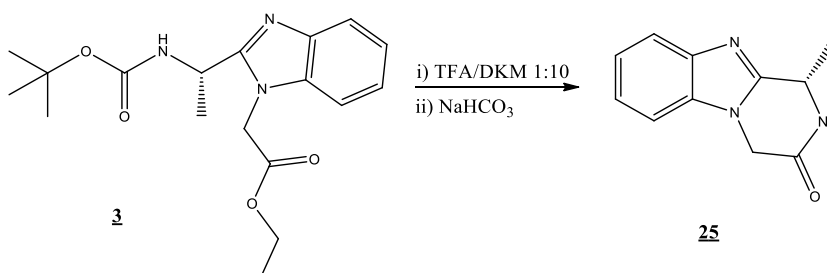
R_f(CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1 + AcOH):0,73

Etil (<i>R</i>)-2-(2-(1-((<i>tert</i> -butoksikarbonil)amino)etil)-1 <i>H</i> -benz[d]imidazol-1-il)acetat (24)	M _r =347,41
Izgled	svetlo rumen prah
Analiza	Rezultati

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz)	δ [ppm]=1.21 (t, 3H, $J=7.2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.36 (s, 9H, $3\times\text{CH}_3$), 1.49 (d, 3H, $J=6.8$ Hz, $-\text{CHCH}_3$), 4.12-4.19 (m, 2H, CH_3CH_2-), 4.89-4.97 (m, 1H, $-\text{NHCH}-$), 5.19 (d, 1H, $J=18.0$ Hz, $\text{CH}_{2\text{A}}-\text{N}$), 5.27 (d, 1H, $J=18.4$ Hz, $\text{CH}_{2\text{B}}-\text{N}$), 7.17-7.23 (m, 2H, Ar-H), 7.46-7.48 (m, 2H, Ar-H), 7.59-7.62 (m, 1H, $-\text{NHBoc}-$)
MS (ESI)	m/z : 348,2 (M+H) $^+$
T_t	136-137 °C
HRMS za $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_4$	izračunano: 348,1923 izmerjeno: 348,1920
IR	ν [cm^{-1}] = 3334, 2988, 1749, 1676, 1513, 1464, 1335, 1246, 1220, 1198, 1155, 1060, 1028, 743

1.9.5 Neuspešen poskus sinteze spojine **25**,

sinteza (S)-1-metil-1,2-dihidrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a]pirazin-3(4H)-ona (**25**)



Spojino **3** (0,20 g, 0,52 mmol) smo raztopili v 10 mL diklorometana in ohladili na 0 °C ter dodali 1 mL trifluorocetne kisline. Nato smo odstranili ledeno kopel in pustili mešati 2 uri pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo odparili topilo pod znižanim tlakom in preostanek 3-krat prelili z 10 mL etra in ga vmes odparili pod znižanim tlakom. Nato smo suhemu preostanku dodali 4 mL THF in 2 mL NaHCO₃ in zmes topil odparili pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo raztopili v 10 mL THF, dodali NaHCO₃ (65 mg, 0,78 mmol) in zmes ohladili na ledeni kopeli. Po kapljicah smo dodali benzoil klorid (66 μL , 0,57 mmol), odstranili ledeno kopel in pustili mešati pol ure. Po končani reakciji smo odparili topilo pod znižanim tlakom in surovo spojino očistili s kolonsko kromatografijo (MF:CH₂Cl₂:MeOH=30:1, nato CH₂Cl₂:MeOH=9:1). Masa čiste spojine **25** je znašala 145 mg.

Asja Frank:

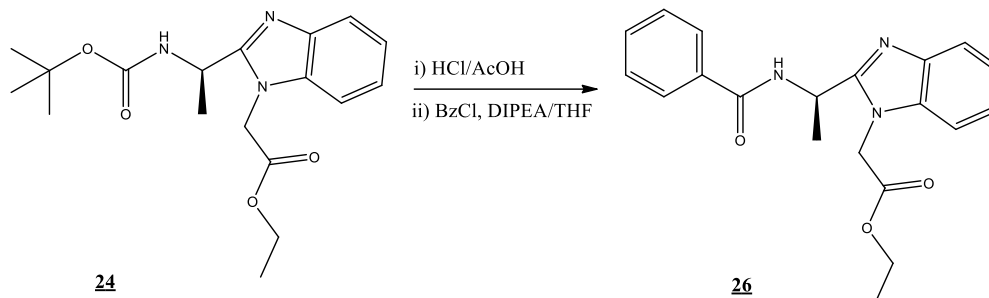
Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorjev NOD2 z benzimidazolnim skeletom

Izkoristek reakcije: 100 %

Rf(CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1): 0,52

(S)-1-metil-1,2-dihidrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a]pirazin-3(4H)-on (25)		M _r =201,23
Izgled	umazano bel prah	
Analiza	Rezultati	
¹ H-NMR (CDCl ₃ , 400 MHz)	δ[ppm]= 1.81(d, 3H, J= 6.8 Hz, -CH ₃), 4.76-4.86 (m, 2H, -CH ₂ -), 5.04-5.09 (m, 1H, -CH-), 6.67 (s, 1H, -NH-), 7.33-7.38 (m, 3H, Ar-H), 7.77-7.80 (m, 1H, Ar-H)	
MS (ESI)	m/z: 202,1 (M+H) ⁺	
T _t	199-203 °C	
HRMS za C ₁₁ H ₁₂ N ₃ O	izračunano: 202,0980 izmerjeno: 202,0983	
IR	ν [cm ⁻¹] = 3194, 3062, 1670, 1438, 1308, 834, 745, 517	

1.9.6 Sinteza etil (*R*)-2-(2-(1-benzamidoetil)-1*H*-benzo[d]imidazol-1-il)acetata (**26**)



Spojino **24** (0,10 g, 0,29 mmol) smo raztopili v 2 mL AcOH in ohladili na 0 °C. Na ledeni kopeli smo dodali 1M HCl/AcOH (2 mL, 2 mmol) in pustili mešati pri sobni temperaturi 1,5 ure. Nato smo pod znižanim tlakom odparili topilo in dobili suh preostanek, ki smo ga raztopili v 2 mL THF. Na ledeni kopeli smo v raztopino dodali DIPEA (183 μ L, 0,77 mmol) in benzoil klorid (49 μ L, 0,42 mmol) ter reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi 30 minut. Po končani reakciji smo odparili topilo pod znižanim tlakom in spojino očistili s kolonsko kromatografijo (MF:CH₂Cl₂:MeOH=30:1) ter dobili 82 mg spojine **26**.

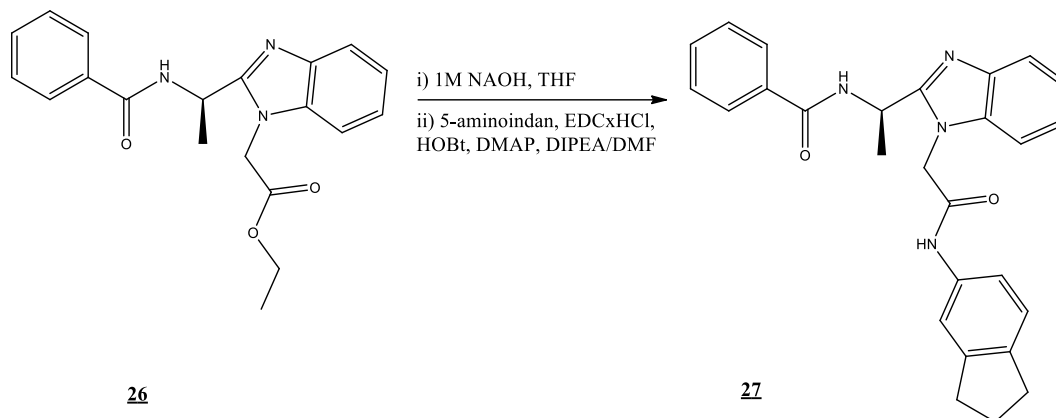
Izkoristek reakcije: 80,7 %

Rf(CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1): 0,67

Etil (<i>R</i>)-2-(2-(1-benzamidoetil)-1 <i>H</i> -benzo[d]imidazol-1-il)acetat (26)		M _r =351,40
Izgled	bel prah	
Analiza	Rezultati	
¹ H-NMR (CDCl ₃ , 400 MHz)	δ [ppm]= 1.24 (t, 3H, J=7.2 Hz, -CH ₂ CH ₃), 1.90 (d, 3H, J=6.8 Hz, CH ₃ CH-), 4.10-4.23 (m, 2H, -CH ₂ CH ₃), 5.03 (d, 1H, J=18.0 Hz, CH ₂ A _N), 5.40 (d, 1H, J= 18.0 Hz, CH ₂ B _N), 5.57-5.65 (m, 1H, -CH-), 7.30-7.44 (m, 3H, Ar-H), 7.49 (d, 2H, J=7.2 Hz, Ar-H), 7.51-7.60 (m, 2H, Ar-H), 7.84-7.86 (m, 3H, 2×Ar-H + NH)	
MS (ESI)	m/z: 352,2 (M+H) ⁺	
T _t	186-187 °C	
HRMS za C ₂₀ H ₂₂ N ₃ O ₃	izračunano: 352,1661	

	izmerjeno: 352,1654
IR	ν [cm^{-1}] = 3252, 2992, 1743, 1638, 1531, 1514, 1462, 1340, 1201, 736, 700

1.9.7 Sinteza (R)-N-(1-(1-(2-((2,3-dihidro-1H-inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etil)benzamida (**27**)



Spojino **26** (56 mg, 0,16 mmol) smo raztopili v 2 mL THF in dodali 1M NaOH (960 μL , 0,96 mmol). Reakcijsko zmes smo pol ure mešali pri sobni temperaturi in po končani reakciji zmes nakisali do pH=5 z 1M HCl ter odparili topilo pod znižanim tlakom. Surov produkt **27** smo takoj uporabili v naslednji stopnji sinteze. Surovo kislino (87 mg, 0,18 mmol) smo raztopili v 1 mL DMF in dodali 5-aminoindan (19 mg, 0,14 mmol), EDC \times HCl (51 mg, 0,27 mmol), HOBt (36 mg, 0,27 mmol), DIPEA (56 μL , 0,32 mmol) in za konico spatule DMAP. Reakcijsko zmes smo 24 ur mešali pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes zlili na 10 mL zmesi ledu in vode, pri čemer je izpadla bela oborina, ki smo jo odfiltrirali, sprali z etrom, posušili na zraku in dobili 5 mg spojine **27**.

Izkoristek reakcije: 6,4 %

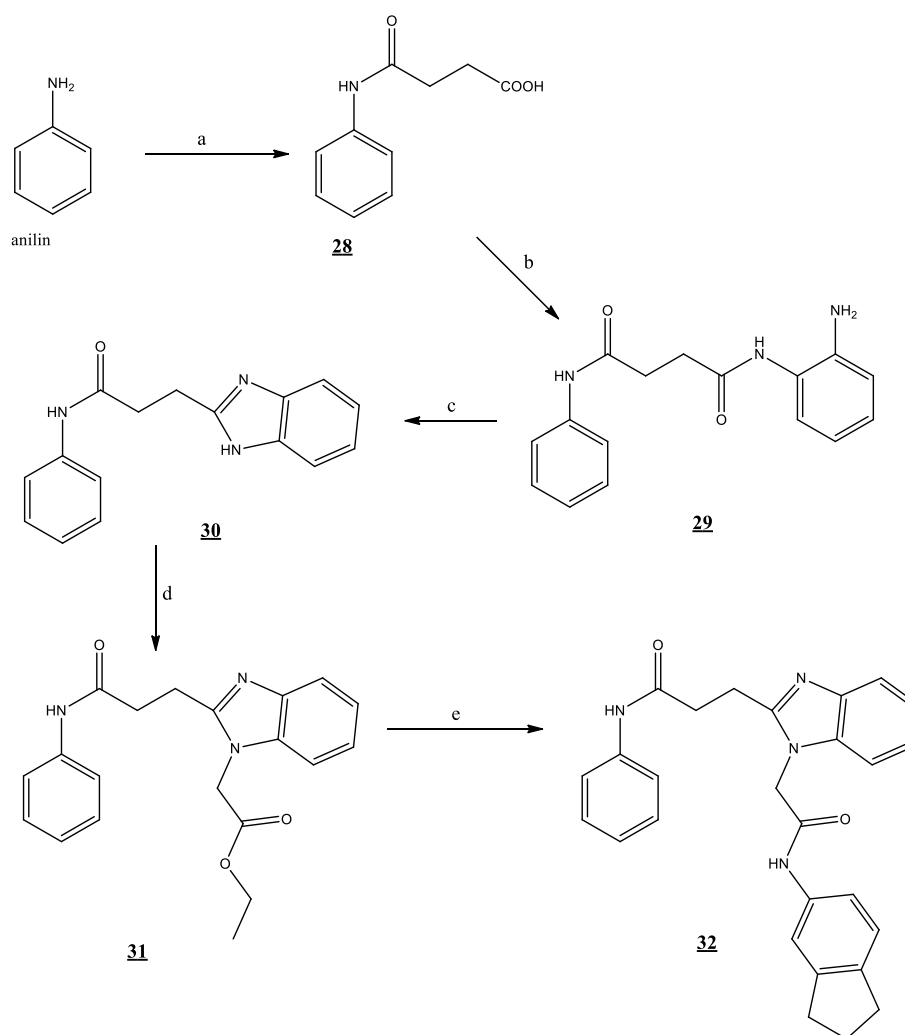
Rf(CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1+ AcOH): 0,60

Asja Frank:

Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorjev NOD2 z benzimidazolnim skeletom

(R)-N-(1-(1-(2-((2,3-dihidro-1H-inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etil)benzamid (27)	M _r =438,52
Izgled	rjavi kristali
Analiza	Rezultati
¹ H-NMR (DMSO-d ₆ , 400 MHz)	δ[ppm]= 1.68 (d, 3H, J=6.8 Hz, CH ₃ CH-), 1.94-2.01 (m, 2H, -CH ₂ CH ₂ CH ₂ -), 2.76-2.79 (m, 4H, 2×CH ₂ -Ph), 5.17 (d, 1H, J= 17.2 Hz, CH _{2A} -N), 5.25 (d, 1H, J= 17.2 Hz, CH _{2B} -N), 5.45 (kvintet, 1H, J=7.2 Hz, -CH-), 7.08-7.10 (m, 1H, Ar-H), 7.16-7.23 (m, 3H, Ar-H), 7.34-7.38 (m, 3H, Ar-H), 7.44-7.50 (m, 2H, Ar-H), 7.62-7.65 (m, 1H, Ar-H), 7.84 (d, 2H, J=7.2 Hz, Ar-H), 9.05 (d, 1H, J= 8.0 Hz, CONHCH), 10.28 (s, 1H, ArNHCO)
MS (ESI)	m/z: 437,2 (M-H) ⁻
T _t	269-273 °C
HRMS za C ₂₇ H ₂₅ N ₄ O ₂	izračunano: 437,1978 izmerjeno: 437,1978
IR	ν [cm ⁻¹] = 3252, 1668, 1632, 1539, 1489, 1463, 1279, 1075, 802, 747, 697
HPLC (254nm)	100%, tr = 12.59 min

1.10 Reakcijska shema 6:



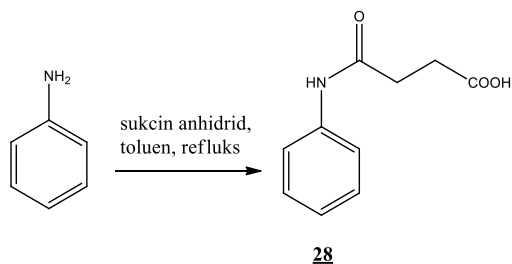
a: sukcinanhidrid, toluen, reflux

b: 1,2-diaminobenzen, DIPEA, EDC×HCl, HOBt, DMAP, THF

c: AcOH, 70 °C

d: etil 2-bromoacetat, K₂CO₃, acetonitril, 70 °C

e: i) 1M NaOH, THF; ii) 5-aminoindan, EDC×HCl, HOBt, DIPEA, DMAP, DMF

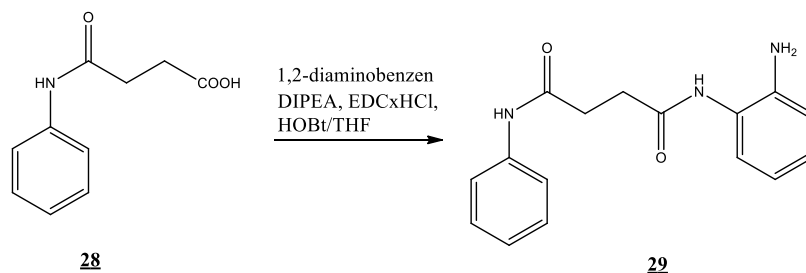
1.10.1 Sinteza 4-okso-4-(fenilamino)butanojske kisline (**28**)

Anilin (3,0 g, 32,2 mmol) smo raztopili v toluenu (50 mL) in dodali sukcinanhidrid (3,87 g, 38,7 mmol). Reakcijsko zmes smo nato 3 ure refluktirali pri 110 °C. Po končani reakciji smo odfiltrirali nastalo oborino, jo posušili v sušilniku pri 60 °C in dobili spojino **28** (6,37 g).

Izkoristek reakcije: 100 %

Rf(CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1): 0,25

4-okso-4-(fenilamino)butanojska kislina (28)		M _r =193,20
Izgled	bel prah	
Analiza	Rezultati	
¹ H-NMR (DMSO-d ₆ , 400 MHz)	δ[ppm]=2.51-2.57 (m, 4H, -CH ₂ CH ₂ -), 6.99-7.03 (m, 1H, Ar-H), 7.26-7.30 (m, 2H, Ar-H), 7.56-7.59 (m, 2H, Ar-H), 9.95 (s, 1H, -NH-), 12.14 (s, 1H, -COOH)	
MS (ESI)	m/z: 192,1 (M-H) ⁻	
T _t	137-138 °C Lit.: 134-137 °C (32)	
HRMS za C ₁₀ H ₁₀ NO ₃	izračunano: 192,0661 izmerjeno: 192,0664	
IR	ν [cm ⁻¹] = 3317, 1692, 1663, 1600, 1541, 1503, 1444, 1417, 1377, 1330, 1279, 1222, 1185, 905, 796, 762, 739, 692, 651, 560	

1.10.2 Sinteza N¹-(2-aminofenil)-N⁴-fenilsukcinamida (**29**)

Raztopini spojine **28** (2,00 g, 10,36 mmol) v THF (50 mL) smo dodali EDC×HCl (2,98 g, 15,54 mmol), HOBT (2,10 g, 15,54 mmol) in 1,2-diaminobenzen (1,23 g, 11,39 mmol). V reakcijsko zmes smo nato počasi dokapavali DIPEA (2,7 mL, 15,54 mmol) in pustili mešati 48 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo v bučko dodali 20 mL vode in odparili zmes topil pod znižanim tlakom. V bučko smo suh preostanek raztopili v 100 mL diklorometana. Organsko fazo smo nato spirali z 2 × 50 mL vode in 50 mL nasičene raztopine NaCl in posušili z Na₂SO₄. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom ter dobili spojino **29** kot svetlo rjav prašek (2,15 g).

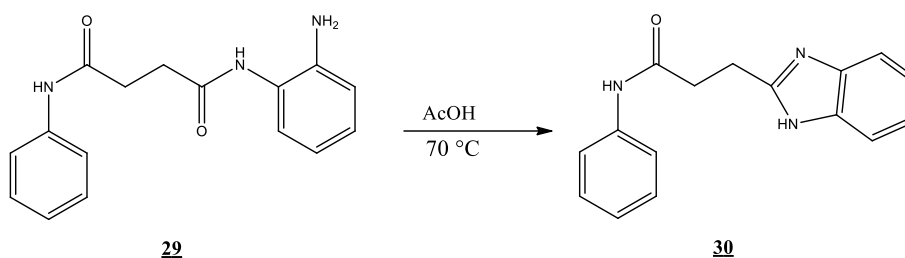
Izkoristek reakcije: 73,3 %

Rf(CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1): 0,57

N ¹ -(2-aminofenil)-N ⁴ -fenilsukcinamid (29)		M _r =283,33
Izgled	svetlo rjav prah	
Analiza	Rezultati	
¹ H-NMR (DMSO-d ₆ , 400 MHz)	δ[ppm]=2.64-2.65 (m, 4H, 2x CH ₂), 4.88 (s, 2H, -NH ₂), 6.49-6.53 (m, 1H, Ar-H), 6.68-6.70 (m, 1H, Ar-H), 6.86-6.91 (m, 1H, Ar-H), 7.00 (s, 1H, Ar-H), 7.11-7.13 (m, 1H, Ar-H), 7.29 (t, 2H, J= 8.0 Hz, Ar-H) 7.59 (d, 2H, J=7.8 Hz, Ar-H), 9.19 (s, 1H, -CONH-), 10.00 (s, 1H, Ph-NHCO-)	
MS (ESI)	m/z: 282,1 (M-H) ⁻	
T _t	195-199 °C	
HRMS za C ₁₆ H ₁₆ N ₃ O ₂	izračunano: 282,1243	

	izmerjeno: 282,1246
IR	ν [cm^{-1}] = 3289, 1643, 1595, 1524, 1496, 1461, 1444, 1342, 1228, 1153, 968, 743, 690, 554, 504

1.10.3 Sinteza 3-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)-N-fenilpropanamida (**30**)



Spojino **29** smo raztopili v 10 mL AcOH in 24 ur segrevali pri 70 °C. Po končani reakciji smo odparili AcOH in preostanek raztopili v 50 mL diklorometana. Organsko fazo smo spirali s 3 × 25 mL nasičene raztopine NaHCO₃, 25 mL vode in 25 mL nasičene raztopine NaCl. Spojino **30** smo zaznali tudi v vodni fazi, zato smo naredili ponovno ekstrakcijo z 2 × 30 mL diklorometana. Organske faze smo združili, posušili z Na₂SO₄ in odparili topilo pod znižanim tlakom ter dobili spojino **30**, v obliki belega praha, ki smo jo nato posušili v sušilniku pri 45 °C (574 mg).

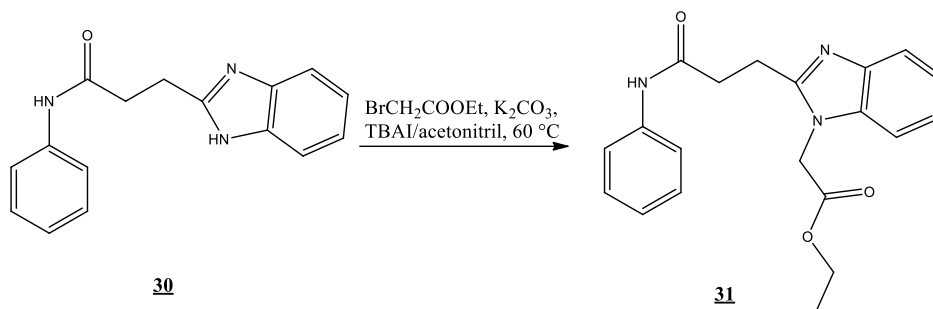
Izkoristek reakcije: 100 %

Rf(CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1 + AcOH): 0,38

3-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)-N-fenilpropanamid (30)		M _r =265,31
Izgled	bel prah	
Analiza	Rezultati	
¹ H-NMR (DMSO-d ₆ , 400 MHz)	δ [ppm]= 2.91 (t, 2H, J=7.2 Hz, -CH ₂ CH ₂ -), 3.13 (t, 2H, J=7.2 Hz, -CH ₂ CH ₂ -), 7.00 (t, 1H, J=7.2 Hz, Ar-H), 7.07-7.11 (m, 2H, Ar-H), 7.25-7.29 (m, 2H, Ar-H), 7.44-7.46 (m, 2H, Ar-H), 7.60 (d, 2H, J=7.6 Hz, Ar-H), 10.34 (s, 1H, -CONH-), 12.66 (s, 1H, NH-Het)	
MS (ESI)	m/z: 264,1 (M-H) ⁻	

T _t	232-235 °C
HRMS za C ₁₆ H ₁₄ N ₃ O	izračunano: 264,1137 izmerjeno: 264,1142
IR	v [cm ⁻¹] = 3197, 1666, 1601, 1556, 1500, 1445, 1415, 1303, 1271, 1187, 1025, 965, 734

1.10.4 Sinteza etil 2-(2-(3-okso-3-(fenilamino)propil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetata (**31**)



V 50 mL bučki smo v 10 mL acetonitrila suspendirali spojino **30** (0,15 g, 0,57 mmol) in K₂CO₃ (0,12 g, 0,85 mmol). Suspenzijo smo 15 minut mešali pri sobni temperaturi, dodali smo etil 2-bromoacetat (69 μL, 0,62 mmol) in za konico spatule TBAI. Reakcijsko zmes smo nato preko noči segrevali pri 60 °C. Po končani reakciji smo odparili acetonitril pod znižanim tlakom in preostanek raztopili v 30 mL diklorometana. Organsko fazo smo sprali z 2 × 10 mL vode, 10 mL nasičene raztopine NaCl in posušili z Na₂SO₄. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom in dobili surov produkt, ki smo ga nato očistili s kolonsko kromatografijo (MF: CH₂Cl₂:MeOH=30:1) in dobili 51 mg čiste spojine **31**.

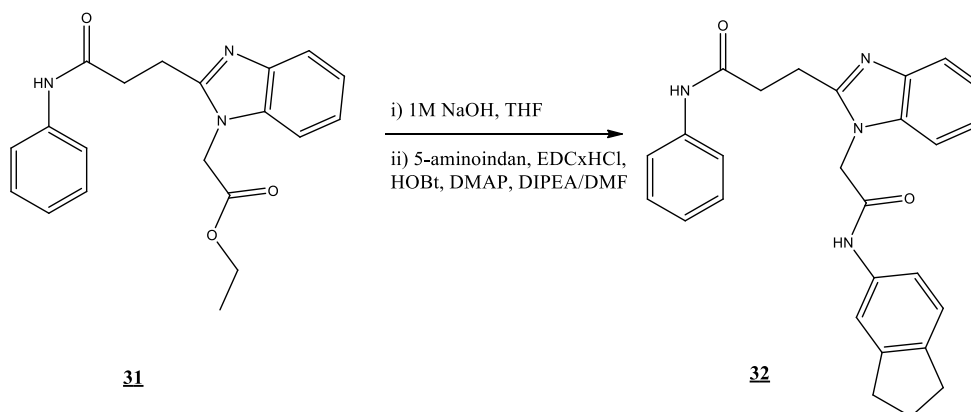
Izkoristek reakcije: 23,1 %

Rf(CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1): 0,68

Etil 2-(2-(3-okso-3-(fenilamino)propil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetat (31)	M _r =351,32
Izgled	rjavi kristali
Analiza	Rezultati

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz)	$\delta[\text{ppm}] = 1.23$ (t, 3H, $J=7.2$ Hz, CH_3CH_2-), 2.94 (t, 2H, $J=7.2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 3.08 (t, 2H, $J=7.2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 4.18 (q, 2H, $J=7.2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 5.25 (s, 2H, $-\text{NCH}_2$), 7.02 (t, 1H, $J=7.2$ Hz, Ar-H), 7.14-7.20 (m, 2H, Ar-H), 7.48 (d, 1H, $J=6.8$ Hz, Ar-H), 7.26-7.30 (m, 2H, Ar-H), 7.54-7.61 (m, 3H, Ar-H), 10.09 (s, 1H, $-\text{CONH}-$)
MS (ESI)	m/z : 250,2 (M-H) $^-$
T_t	93-96 °C
HRMS za $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_3$	izračunano: 350,1505 izmerjeno: 350,1513
IR	$\nu [\text{cm}^{-1}] = 2984, 1737, 1694, 1552, 1500, 1466, 1443, 1424, 1374, 1220, 1177, 1028, 740, 689$

1.10.5 Sinteza 3-(1-(2-((2,3-dihidro-1H-inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-N-fenilpropanamida (**32**)



Spojino **31** (0,18 g, 0,47 mmol) smo raztopili v 2 mL THF in dodali 1M NaOH (2,8 mL, 2,8 mmol). Reakcijsko zmes smo pol ure mešali pri sobni temperaturi in po končani reakciji zmes nakisali do $\text{pH}=5$ z 1M HCl ter odparili topilo pod znižanim tlakom. Surov produkt smo takoj uporabili v naslednji stopnji.

Surovo kislino (170 mg, 0,47 mmol) smo raztopili v 8 mL DMF in dodali 5-aminoindan (49 mg, 0,37 mmol), EDC \times HCl (130 mg, 0,700 mmol), HOBt (94 mg, 0,70 mmol), DIPEA (146 μL , 0,84 mmol) in za konico spatule DMAP. Reakcijsko zmes smo 48 ur mešali pri sobni

Asja Frank:

Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorjev NOD2 z benzimidazolnim skeletom

temperaturi. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes zlili na 10 mL zmesi ledu in vode, pri čemer je izpadla bela oborina, ki smo jo odfiltrirali, sprali z etrom, posušili na zraku in dobili 140 mg spojine **32**.

Izkoristek reakcije: 35,9 %

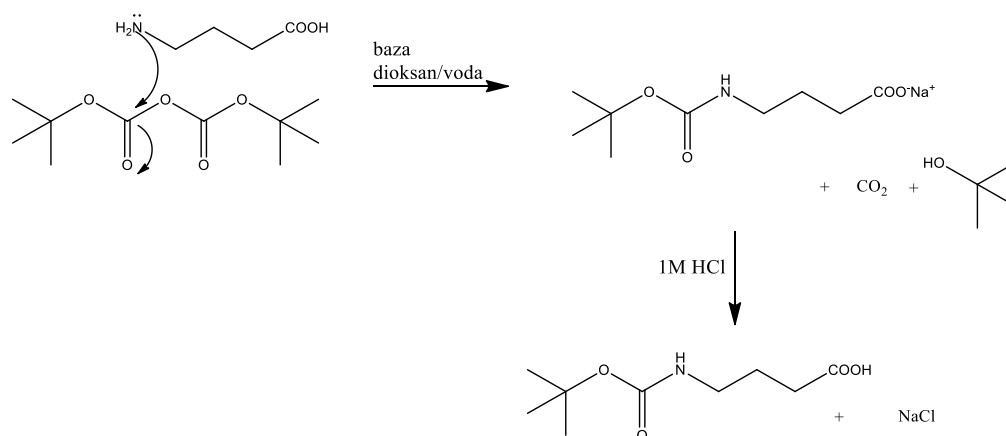
Rf(CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1 + AcOH): 0,22

3-(1-(2-((2,3-dihidro-1 <i>H</i> -inden-5-il)amino)-2-oksoetil)-1 <i>H</i> -benzo[d]imidazol-2-il)- <i>N</i> -fenilpropanamid (32)		M _r =438,52
Izgled	umazano bel prah	
Analiza	Rezultati	
¹ H-NMR (DMSO-d ₆ , 400 MHz)	δ[ppm]= 1.95-2.02 (m, 2H, -CH ₂ CH ₂ CH ₂ -), 2.77-2.82 (m, 4H, 2×Ph-CH ₂), 2.98 (t, 2H, J=7.2 Hz, -CH ₂ CH ₂ CO-), 3.14 (t, 2H, J=7.2 Hz, -CH ₂ CH ₂ CO-), 5.15 (s, 2H, N-CH ₂), 7.01 (t, 1H, J=7.6 Hz, Ar-H), 7.14-7.20 (m, 3H, Ar-H), 7.25-7.31 (m, 3H, Ar-H), 7.47-7.60 (m, 5H, Ar-H), 10.12 (s, 1H, -NH-), 10.44 (s, 1H, -NH-)	
MS (ESI)	m/z: 437,2 (M-H) ⁻	
T _t	239-241 °C	
HRMS za C ₂₇ H ₂₅ N ₄ O ₂	izračunano: 437,1978 izmerjeno: 437,1972	
IR	ν [cm ⁻¹] = 3263, 1697, 1666, 1600, 1545, 1498, 1466, 1441, 1407, 1304, 1250, 1166, 752, 734, 689, 667, 580	
HPLC (254nm)	100%, tr = 13.87 min	
¹³ C NMR (DMSO-d ₆ , 100 MHz)	δ[ppm]= 21.98, 25.11, 31.74, 32.43, 33.24, 109.64, 115.46, 117.37, 118.29, 118.92, 121.32, 121.69, 122.95, 124.24, 128.65, 135.76, 136.69, 138.89, 139.23, 142.00, 144.25, 155.09, 165.20, 170.20, 177.22	

REZULTATI IN RAZPRAVA

1.11 Uvajanje boc-zaščite

Prosto aminske skupine večine izhodnih spojin smo v prvi fazi zaščitili z Boc-anhidridom. Reakcija poteka po principu nukleofilne substitucije. Sintezo smo izvedli ob prisotnosti prebitka baze NaHCO_3 v zmesi topil dioksan/voda. Po končani reakciji smo odparili dioksan, v alkalni vodni fazi pa je ostal produkt v obliki natrijeve soli, *t*-BuOH in nezreagirani Boc-anhidrid, ki smo ga odstranili, tako da smo alkalno vodno fazo ekstrahirali z dietiletrom. Vodno fazo smo na ledeni kopeli nakisali z 1M HCl do pH 2-3 in ekstrahirali z etilacetatom, pri čemer je nedisociiran produkt popolnoma prešel v organsko fazo. Reakcija je potekala brez posebnosti in z izkoristkom 66% pri spojini **12** (zaščita glicina) in s 85% izkoristkom pri spojinah **6** in **21** (zaščita 4-aminobutanojske kisline in D-alanina). Končne spojine so bile čiste in smo jih brez nadaljnjega čiščenja uporabili v naslednji stopnji sinteze. Kot bazo bi lahko pri teh reakcijah uporabili tudi 1M NaOH ali trietilamin, saj je reakcija v tem smislu dokaj robustna.

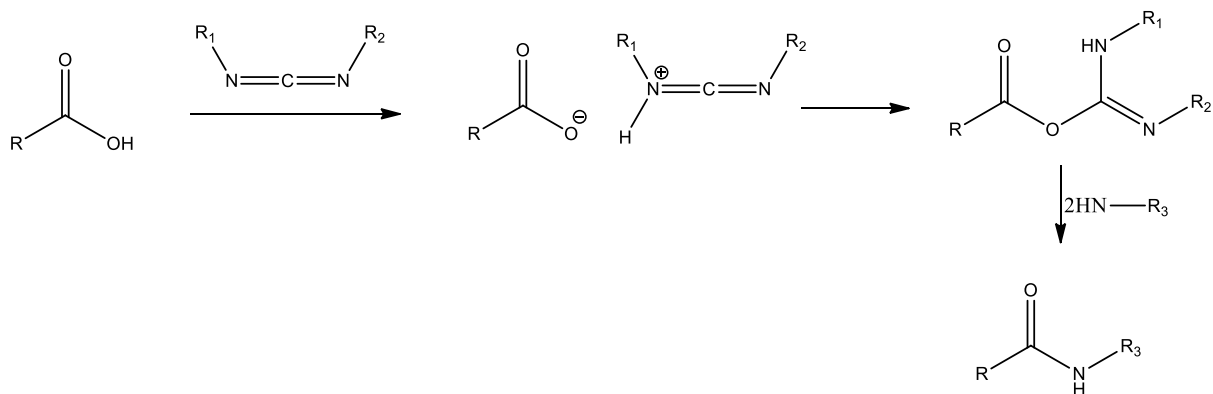


Slika 10: Mehanizem zaščite aminske skupine z Boc-anhidridom

1.12 Aciliranje 1,2-diaminobenzena

V splošnem so reakcije aciliranja 1,2-diaminobenzena potekale tako, da smo karboksilno kislino najprej raztopili v THF in nato dodali 1,2-diaminobenzen, DIPEA (kot bazo), EDC×HCl in HOBt (preprečuje racemizacijo in aktivira spojino). Po končani reakciji smo odparili topilo, suh preostanek raztopili v diklorometanu in ga sprali z vodo (nečistote so večinoma prešle v vodno fazo). Organski fazi smo odparili topilo in dobili spojino. Pri reakcijah nismo imeli nobenih težav in izkoristek pri spojini **1** je 82%, spojini **7** 85%, spojini **13** 74%, spojini **22** 88% in spojini **29** 73%. Najnižji izkoristek smo dobili pri spojinah **29** in **13**, zaradi sterične oviranosti. V primeru spojine **29** verjetno deluje kot sterična ovira dodaten benzenov obroč, pri spojini **13** pa je večja sterična oviranost zaradi kratkega distančnika, kar pomeni, da ima vpliv na izkoristek reakcije tudi izhodna spojina. Spojine so bile dovolj čiste, da smo lahko brez nadaljnjega čiščenja nadaljevali sintezno pot.

Za aktiviranje karboksilne skupine se uporabljajo tudi drugi sklopitveni reagenti, kot so DCC (*N,N'*-dicikloheksilkarbodiimid) ali DIC (*N,N'*-diisopropilkarbodiimid) (pri Fmoc zaščiti) v prisotnosti HOBt (preprečuje racemizacijo) ali HOAt (1-hidroksi-7-azabenzotriazol). Ostali sklopitveni reagenti so COMU (1-ciano-2-etoksi-2-oksoetilidenaminooksi)dimetilamino-morfolino-karbenium heksafluorofosfat), HBTU (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronium heksafluorofosfat) in HATU ((1-[Bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinium 3-oksid heksafluorofosfat)) v prisotnosti DIPEA ali *N*-metil morfolina (NMM) kot baze. Kot topila se lahko uporablja DMF ali acetonitril. (33-35)



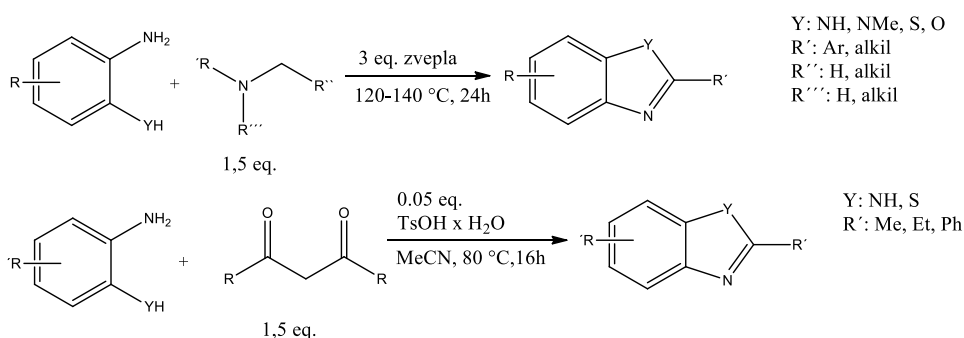
Slika 11: Mehanizem "couplinga" z EDC×HCl (36)

Karboksilna kislina reagira z EDC×HCl pri čemer nastane intermediat (aktiviran ester) z dobro izstopajočo skupino, nakar le-ta reagira z aminom in pride to tvorbe amidne vezi. (36)

1.13 Ciklizacija

Izhodne N-acilirane derivate 1,2-diaminobenzena **1**, **7**, **13**, **22** in **29** smo v raztopini AcOH segrevali pri 60-70 °C, pri čemer je pri vseh spojinah prišlo do ciklizacije in tvorbe benzimidazolnega ogrodja. Reakcije so potekale brez posebnosti in sicer s 63% izkoristkom pri spojinah **2** in **23**, 65% izkoristkom pri spojini **8** in 100% izkoristkom pri spojinah **14** in **30**. Najnižji izkoristek je bil pri spojinah **2** in **23** zaradi sterične oviranosti, saj sta spojinii sintetizirani iz D- oz L-alanina, pri katerih metilna skupina sterično ovira nadaljnje reakcije. Izkoristek sintez se je pokazal kot odvisen od izhodnih spojin. Spojine so bile po ciklizaciji čiste in zato dodatno čiščenje v nadaljnjih reakcijah ni bilo potrebno.

Sintezo lahko do benzimidazolov pridemo tudi preko drugačnih poti, z uporabo drugih reagentov. 1,2-diaminobenzenu dodamo prebitek amina vezanega na alkilno verigo ali benzenov obroč, prebitek žvepla in mešamo pri 120-140 °C 24 ur. Druga sintezna pot je, da 1,2-diaminobenzenu dodamo prebitek anhidrida (metil-, etil- ali fenilanhidrid), 0.05 eq. TsOH×H₂O, MeCN in mešamo pri 80 °C 16 ur (Slika 12). (37)



Slika 12: Alternativni sintezi benzimidazolov (37)

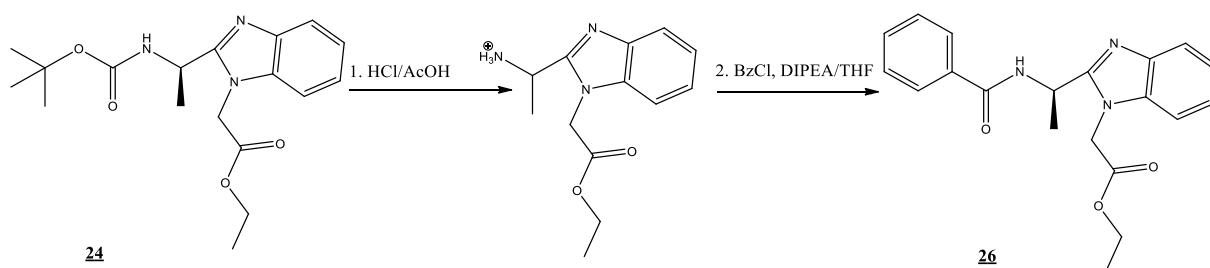
Postopek z AcOH in segrevanjem smo izbrali, ker je enostaven, krajši in zagotavlja dobre izkoristke.

1.14 Odstranitev boc zaščite in aciliranje prostega amina

Odstranitev Boc zaščite smo izvedli z acidolizo z 1M HCl/AcOH, pri čemer je nastal prost amin, na katerega smo v naslednji stopnji sinteze pripeli benzoil klorid. Ker je po reakciji v zmesi prisoten HCl in AcOH, smo vanjo dodali prebitok DIPEA za nevtralizacijo nastale kisline in s tem poskrbeli, da je prosti amin v neprotonirani obliki. Pri čiščenju surove spojine smo imeli nekoliko težav, saj se lise na TLC-ju niso lepo ločile. Problem smo rešili s preizkušanjem različnih mobilnih faz, dokler nismo našli optimalne CH₂Cl₂:MeOH=30:1 in nato 9:1. Izkoristki reakcij za spojino **19** 41%, spojino **4** 78%, spojino **26** 81%, spojino **16** 93% in spojino **10** 100%. Končne spojine so po čiščenju s kolonsko kromatografijo čiste in pripravljene na naslednjo stopnjo sinteze.

Pri spojini **3** je v stopnji odstranitve zaščite Boc skupine prišlo do neželene ciklizacije. V tem primeru smo pri reakciji uporabili trifluoroocetno kislino, kot bazo pa NaHCO₃, kar je privedlo do ciklizacije, saj je prost amin intramolekularno napadel ester, tako da je nastala spojina **25**.

V naslednjih reakcijah smo ciklizacijo preprečili tako, da smo odstranitev zaščite Boc skupine izvedli pri drugačnih pogojih, in sicer z uporabo raztopine 1M HCl/AcOH. Zamenjava trifluoroocetne kisline s HCl/AcOH in NaHCO₃ z DIPEA je preprečila neželeno ciklizacijo.



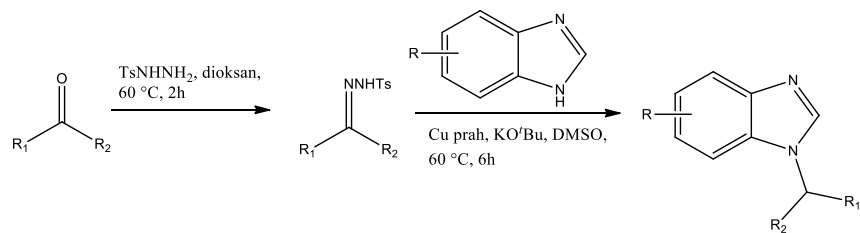
Slika 13: Mehanizem odščite Boc skupine in pripajanje BzCl

1.15 Alkiliranje obročnega dušika

Na obročni dušik benzimidazola smo pripeli alkilno substituento. Začetne spojine smo raztopili v acetonitrilu in dodali K_2CO_3 . Po 15 minutnem mešanju smo dodali etil 2-bromoacetat, za konico spatule TBAI (katalizator sinteze) in segrevali pri 60 °C 24 ur. Reakcija poteka po mehanizmu nukleofilne substitucije z elektrofilom (alkil halid). Nastane intermediat na katerega se pripne alkilna veriga, stranska produkta reakcije pa sta KBr in H_2CO_3 . (38, 39) Surove produkte smo očistili s kolonsko kromatografijo, reakcije so potekale brez posebnosti, izkoristki pa so zelo variirali: spojina **3** 14% izkoristek, spojini **9** in **31** 23% izkoristek, spojina **15** 31% izkoristek, spojina **24** 87% izkoristek in spojina **18** 97% izkoristek. Sklepamo, da se izkoristki razlikujejo zaradi sterične oviranosti, kar pomeni, da je vpliv izhodne spojine velik. Nižji izkoristki so bili pri spojinah **9** in **31**, spojina **9** ima distančnik dolg 3C atome, zaradi česar spojina ni tako rigidna kot spojine s krajšim distančnikom, spojina **31** pa ima v svoji strukturi dodaten benzenov obroč, ki potencialno deluje kot sterična ovira. Najvišji izkoristki so bili pri spojinah **24** in **18**, spojina **24** je sintetizirana iz D-Ala, kar omogoča večjo sterično dostopnost za sintezo in boljše izkoristke reakcije, spojina **18** pa ima distančnik dolg 2C atoma in je manj fleksibilna kot spojina **9** z distančnikom dolgim 3C atome. Nižji izkoristki so bili tudi zaradi čiščenja s kolonsko kromatografijo, saj smo tam izgubili nekaj produkta. Končne spojine so bile po čiščenju s kolonsko kromatografijo dovolj čiste, da smo jih lahko uporabili za nadaljnji sintezni korak. Druge možne poti N-alkiliranja benzimidazolov so z uporabo ostalih alkilhalidov, in uporabo KOH kot baze. (40) Nov reagent in katalizator za N-alkiliranje je N-tozilhidrazon ($TsNHNH_2$), ki omogoča nastanek vezi ogljik-heteroatom, kot katalizator pa se pri tej reakciji uporabljajo bakrove spojine (CuBr, prah Cu, CuI, $CuCl_2$). Kot bazo so tudi v tem primeru uporabljali K_2CO_3 ali KOtBu. Kot najboljšo topilo se je v njihovem primeru izkazal DMSO, medtem ko so se dioksan, THF, benzen, CH_2Cl_2 in DMF izkazali kot slaba topila za N-alkiliranje. Reakcijo se izvaja pri 60 °C. Z reakcijo so dosegli dobre izkoristke med 20-88%, odvisno od katalizatorja in baze. (39)

Asja Frank:

Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorjev NOD2 z benzimidazolnim skeletom



Slika 14: Mehanizem alternativnega N-alkiliranja (39)

Sintezni postopek z uporabo alkilhalida, K₂CO₃ in TBAI smo uporabili na podlagi dolgoletnih izkušenj, saj se je ta postopek izkazal kot zanesljiv, preprost, robusten, hkrati pa daje tudi visoke izkoristke. Sinteza, ki smo jo izvedli je podobna alternativni sintezi in daje tudi zelo podobne rezultate.

1.16 Alkalna hidroliza estra

Alkalna hidroliza estra je potekala pri spojinah **4**, **10**, **16**, **19**, **26** in **31**. Spojine smo raztopili v THF in jim dodali prebitek 1M NaOH, pri čemer je prišlo do hidrolize in nastanka natrijeve soli ustrezne kisline. Reakcijsko zmes smo nakisali do pH 5, da smo natrijeve soli kislin pretvorili do delno nedisociirane oblike. Ekstrakcije nismo izvajali zaradi prevelike polarnosti kislin in posledično prevelikih izgub. Nakisano raztopino smo preprosto odparili in surove produkte takoj uporabili v naslednji sintezni stopnji .

1.17 Tvorba amidne vezi

Tvorbe amidne vezi smo se poslužili tudi v zadnji stopnji sinteze spojin. Surove spojine smo raztopili v DMF, dodali 5-aminoindan, EDC×HCl (sklopitveni reagent za tvorjenje amidne vezi), HOBt (za tvorbo amidne vezi iz karboksilne kisline), DIPEA (baza) in za konico spatule DMAP (pomožni nukleofil). Reakcijo smo mešali 24 ur pri sobni temperaturi in nato izvedli izolacijo spojin. Reakcija je potekala brez večjih posebnosti, nekaj težav smo imeli z izolacijo spojin. Nekatere spojine niso takoj popolnoma izpadle, ko smo reakcijsko zmes vtili v vodo, zato smo jih dali še v hladilnik in šele nato odfiltrirali izpadlo oborino. Izkoristek reakcije ni bil dober pri vseh spojinah, pri spojini **27** je bil le dobrih 6%, pri spojini **11** 16%, spojini **32** 36%, spojini **5** 37%, spojini **17** 44%, in spojini **20** 68%. Menimo, da je slab izkoristek pri spojini **27** posledica sterične oviranosti, saj smo v primeru spojine **20**, ki nima take sterične oviranosti, dobili boljši izkoristek. Spojina **27** je sintetizirana iz D-Ala in ima kot taka večjo sterično oviranost, medtem ko spojini **17** in **20** nimata nobene funkcionalne skupine pripete na distančnik in s tem je tudi sterična oviranost manjša in izkoristek reakcije boljši. Slabši izkoristek je verjetno tudi posledica samega postopka izolacije spojin, saj smo imeli nekaj težav z izpadanjem produkta, ki smo jih rešili tako, da smo raztopino spojine za nekaj časa postavili v hladilnik. Izpadle spojine smo nato odfiltrirali, sprali z etrom ter posušili na zraku, saj nadaljnje čiščenje ni bilo potrebno, kar smo kasneje potrdili tudi s spektroskopskimi metodami.

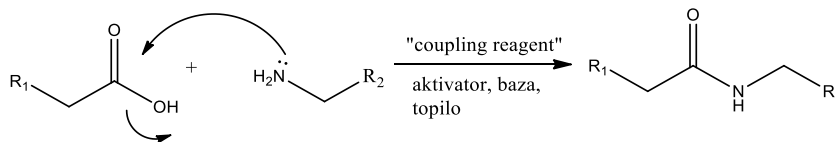
Reakcija poteče z aktivacijo karboksilne skupine (HOBt,), sledi zamenjava izstopajoče skupine s prostim aminom, pri čemer nastane kovalentna amidna vez. Za to je potreben »coupling reagent« (EDC×HCl, DCC, CDI, BOP), baza (DIPEA) in topilo (DMF, mešanica

Asja Frank:

Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorjev NOD2 z benzimidazolnim skeletom

DMF in vode, MeOH). Kot katalizator/pomožni nukleofil smo uporabili DMAP, lahko pa bi tudi AgCl. (41)

EDC×HCl smo izbrali, ker je preverjen sklopitveni reagent, prav tako smo se odločili za DIPEA, ki smo jo kot bazo uporabljali tudi pri drugih reakcijah. Dodatek DMAP-a je prav tako bil nujno potreben, da smo dosegli boljši izkoristek reakcije.

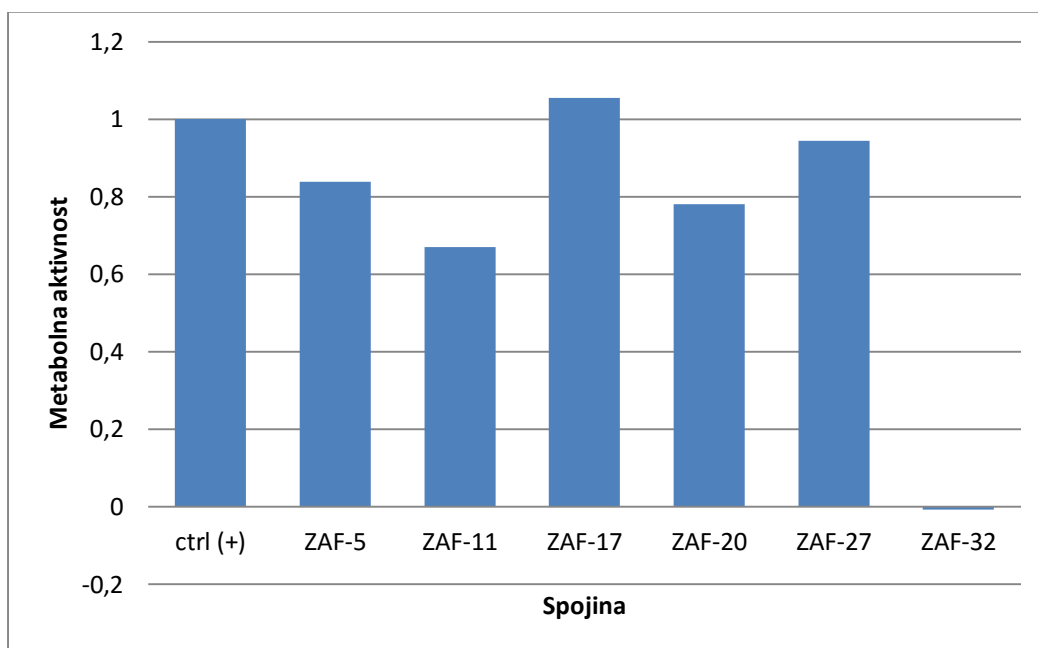


Slika 15: Mehanizem tvorbe amidne vezi (41)

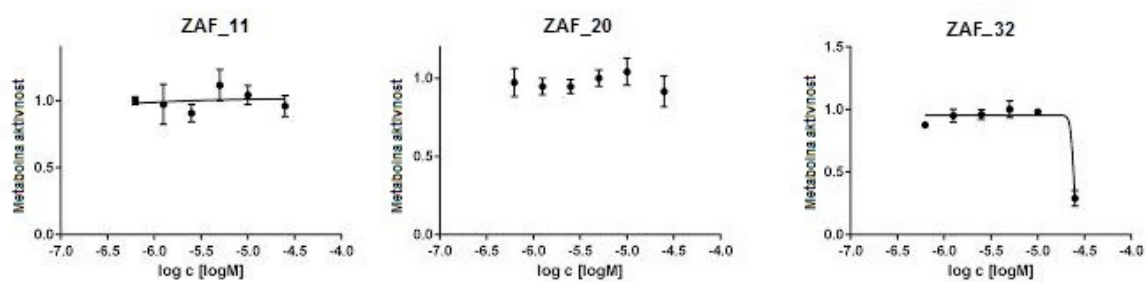
1.18 Biološko testiranje

1.18.1 Test citotoksičnosti

Test citotoksičnosti so izvedli na celični liniji HEK-Blue NOD2 (to so celice, ki prekomerno izražajo protein NOD2 in so zato primerne kot testni sistem za naše spojine) pri 25 μM koncentraciji sintetiziranih spojin. Spojine **20**, **11**, **27**, **5** in **17** pri 25 μM ne izkazujejo citotoksičnosti (Slika 16). Ugotovili smo, da je spojina **32** pri tej koncentraciji močno citotoksična, kar se vidi v močno znižani metabolni aktivnosti celic na Slika 16. Posledično so za ključne spojine izvedli tudi test citotoksičnosti v odvisnosti od koncentracije, in sicer pri šestih različnih koncentracijah (25 μM -0,5 μM) ter ugotovili, da spojina **32** pri končni koncentraciji 10 μM še ne izkazuje citotoksičnosti (Slika 17). Spojini **20** in **11** pa nista izkazovali citotoksičnosti pri nobeni izmerjeni koncentraciji (Slika 17).



Slika 16: Citotoksičnost končnih spojin

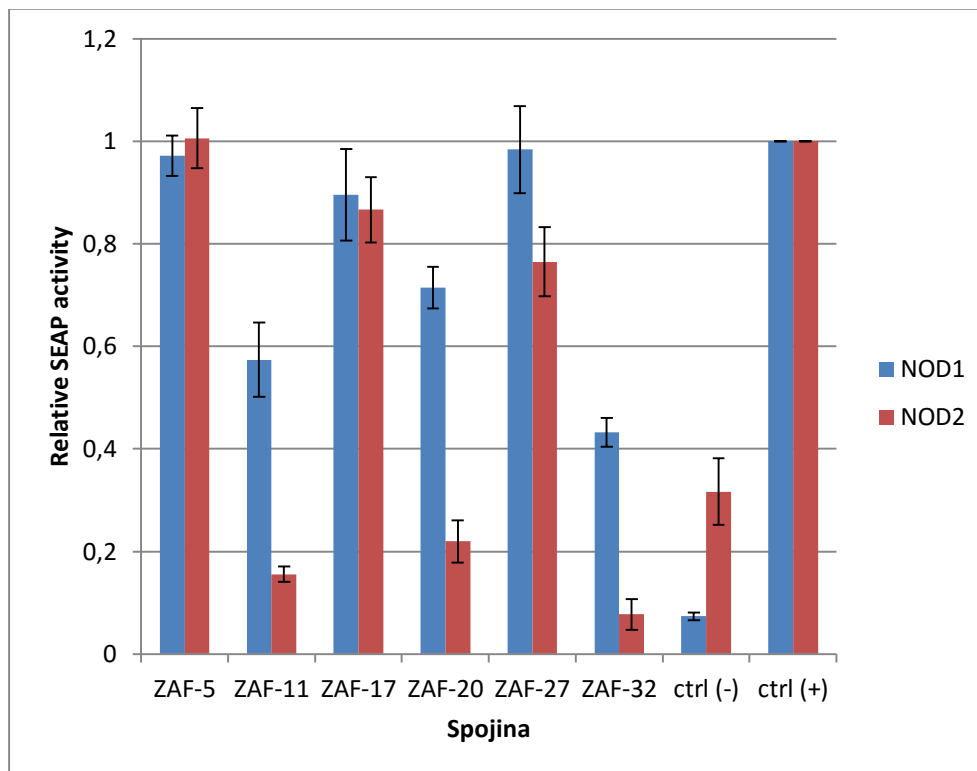


Slika 17: Citotoksičnost spojin 11, 20 in 32

1.18.2 Preizkus antagonistične aktivnosti in selektivnosti na receptorjih NOD1 in NOD2

Končnim spojinam (5, 11, 17, 20, 27 in 32) so biološko ovrednotili njihovo potencialno antagonistično delovanje na receptorje NOD na celicah HEK-Blue NOD1 in HEK-Blue NOD2 na Katedri za klinično biokemijo, na Fakulteti za farmacijo. Kot pozitivni kontroli, s katerima so še pred dodatkom naših spojin stimulirali receptorje NOD, so uporabili komercialno dostopna agonista receptorjev NOD1 in NOD2, in sicer 100 nM C12 iE-DAP (agonist NOD1) in 2 μ M MDP (agonist NOD2). HEK-Blue NOD1 in HEK-Blue NOD2 celicam so nato dodali naše končne spojine in izmerili za koliko se je zmanjšala količina SEAP v primerjavi s količino SEAP, ki so jo določili pri stimulaciji z ustreznim agonistom NOD1 oziroma NOD2. Relativno znižanje v primerjavi s pozitivno kontrolo imenujemo rezidualna aktivnost in je odraz antagonističnega delovanja spojin. Čim nižja je relativna aktivnost SEAP, tem boljše je antagonistično delovanje spojin.

S primerjavo relativnih SEAP aktivnosti HEK NOD1 in HEK NOD2 celic smo nato ocenili tudi faktor selektivnosti naših spojin za receptor NOD2 napram receptorju NOD1.



Slika 18: Antagonistična aktivnost spojin na receptor NOD1 in NOD2

Spojine **11**, **20**, **27** in **32** so testirali pri koncentraciji 25 μM , spojino **17** pri 12,5 μM ter **5** pri nasičeni koncentraciji, to je <4 μM . Pri nižjih koncentracijah so spojini **17** in **5** testirali zaradi slabše topnosti. Spojine **11**, **20** in **32** so se pokazale kot potencialni antagonisti receptorja NOD2 in NOD1. Kot je razvidno iz grafa (Slika 18) so največjo antagonistično aktivnost izkazale spojine **11**, **20** in **32**. Za spojino **11** so določili RA = 18% (NOD2) in RA = 58% (NOD1), za spojino **20** znašata RA = 24% (NOD2) in RA = 72% (NOD1) in za spojino **32** RA = 9% (NOD2) in RA = 45% (NOD1). Spojine **5**, **17** in **27** so na obeh receptorjih izkazale rezidualno aktivnost med 80 in 100%, kar pomeni, da so neaktivne, vendar je pri tem potrebno upoštevati tudi dejstvo, da sta spojini **5** in **17** testirani pri nižji koncentraciji zaradi slabe topnosti. Spojini bi pri koncentraciji 25 μM verjetno izkazali večje antagonistično delovanje. Ker se je spojina **32** pri 25 μM izkazala kot močno citotoksična, se je test aktivnih spojin (**11**, **20** in **32**) izvedel tudi pri koncentraciji 10 μM .

Iz dobljenih podatkov lahko že ugotovimo nekaj grobih zaključkov o odnosu med strukturo in delovanjem. Tako za antagonistično aktivnost kot tudi za necitotoksičnost spojin je zelo pomembna dolžina distančnika med benzimidazolnim obročem in benzamidnim delom molekule. Predvidevamo, da mora za dobro antagonistično aktivnost dolžina distančnika znašati vsaj 2C atoma, saj so se kot najboljši antagonisti izkazale spojine **20** (dolžina distančnika 2C atoma), **32** (dolžina distančnika 2C atoma) in **11** (dolžina distančnika 3C atome). Spojina **32** je močno citotoksična pri koncentracijah višjih od 10 μM , kar je lahko samo posledica prisotnosti retroamidnega fragmenta v strukturi. Spojina **20**, ki v svoji strukturi vsebuje klasični amid, je namreč popolnoma necitotoksična.

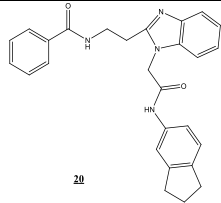
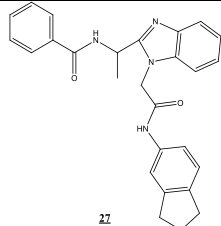
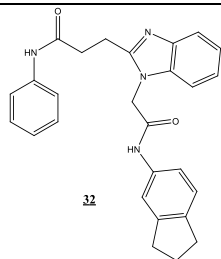
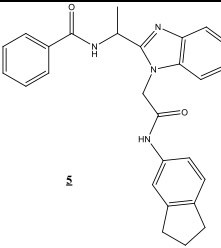
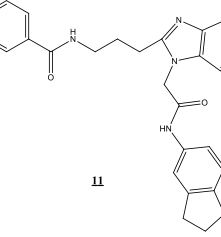
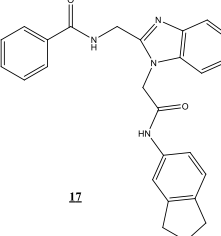
Zanimivo bi bilo sintetizirati in testirati spojino z distančnikom daljšim kot 3C atome in preveriti vpliv le-tega na biološko aktivnost in citotoksičnost.

Spojine **5**, **17** in **27**, ki v svoji strukturi vsebujejo distančnik dolžine 1C atoma, so popolnoma neaktivne kot antagonisti receptorjev NOD2 in NOD1, zato sklepamo, da je takšen distančnik prekratek za doseganje ustrezne biološke aktivnosti. Dodatno smo ugotovili, da lahko na neaktivnost vpliva tudi sterična oviranost, ki jo predstavlja dodatna metilna skupina na distančniku spojin **5** in **27**. Spojini **27** ((*R*)-konfiguracija) in **5** ((*S*)-konfiguracija) v svoji strukturi vsebujeta tudi stereogeni center, saj smo ju sintetizirali iz D-alanina in L-alanina. Sklepamo lahko, da sprememba konfiguracije nima bistvenega vpliva na aktivnost.

Asja Frank:

Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorjev NOD2 z benzimidazolnim skeletom

Preglednica IV: Tabela antagonističnih aktivnosti končnih spojin na receptorju NOD2

SPOJINA	TEST A (%)	TEST B (%)	TEST C (%)	REZIDUALNA AKTIVNOST (%) ± SD
 20	17,3	25,0	23,6	21,9 ± 4,1
 22	68,9	82,1	78,5	76,5 ± 6,7
 32	1,0	7,1	5,0	7,7 ± 3,0
 8	98,8	107,2	95,9	100,6 ± 5,9
 11	16,9	13,9	15,7	15,5 ± 1,5
 17	90,4	90,3	79,3	86,7 ± 6,4

SKLEPI

- Načrtovali in sintetizirali smo 6 novih potencialnih antagonistov receptorja NOD2.
- Kot biološko najbolj aktivne spojine so se izkazale spojine **11**, **20** in **32**, ki pri necitotoksični koncentraciji izkazujejo dobro antagonistično aktivnost na receptor NOD2.
- Spojine **11**, **20** in **32** izkazujejo za 3-4 krat boljšo antagonistično aktivnost na receptor NOD2 v primerjavi z NOD1.
- Ugotovili smo, da dolžina distančnika modulira antagonistični učinek na receptorjih NOD2 in NOD1.
- Prisotnost retroamida v strukturi spojine **32** privede do znatne citotoksičnosti pri koncentracijah večjih od 10 μ M.
- Z majhnimi spremembami in načrtovanjem na osnovi liganda smo uspeli malenkostno izboljšati aktivnost spojine **20**.
- V smislu nadaljnjega raziskovanja kemijskega prostora bi bilo smiselno sintetizirati nove spojine, ki bi vsebovale daljši distančnik, na katerega bi se lahko uvedlo še kakšno drugo polarno funkcionalno skupino z namenom izboljšanja topnosti.

LITERATURA

- [1] M. Zorc, D. Petrovič, A. Cör, M. Legan, A. M. Živin, D. Š. Martinčič, O. V. Porenta in R. Z. Pleskovič, *Histologija*, Inštitut za histologijo in embriologijo Medicinske Fakultete Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2012, p. 103.
- [2] M. Vozelj, *Temelji imunologije*, Ljubljana: DZS, 2000.
- [3] D.-I. Jeon, S.-R. Park, M.-Y. Ahn, S.-G. Ahn, J.-H. Park in J.-H. Yoon, „Jeon, Do-In, et al. "NOD1 and NOD2 stimulation triggers innate immune responses of human periodontal ligament cells.,“ *Int. J. Mol. Med.* , Izv. 29, pp. 699-703, 2012.
- [4] T. J. Kindt, R. A. Goldsby, B. A. Osborne, J. Kuby in J. Kuby, *Kuby Immunology*, Sixth Edition, New York: W. H. Freeman & Company, 2007.
- [5] L. Franchi, N. Warner, K. Viani in G. Nuñez, „Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense,“ *Immunol. Rev.*, Izv. 227, št. 1, pp. 106-128, 2009.
- [6] H. Kumar, T. Kawai in S. Akira, „Toll-like receptors and innate immunity,“ *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Izv. 388, št. 4, pp. 621-625, 2009.
- [7] M. H. Shaw, N. Kamada, N. Warner, Y. G. Kim in G. & Nuñez, „Shaw, Michael H., et al. The ever-expanding function of NOD2: autophagy, viral recognition, and T cell activation,“ *Trends Immunol.*, Izv. 32, št. 2, pp. 73-79, 2011.
- [8] J. M. Wilmanski, T. Petnicki-Ocwieja in K. S. Kobayashi, „NLR proteins: integral members of innate immunity and mediators of inflammatory diseases,“ *J. Leukoc. Biol.*, Izv. 83, št. 1, pp. 13-30, 2008.
- [9] R. G. Correa, S. Milutinovic in J. C. Reed, „Roles of NOD1 (NLRC1) and NOD2 (NLRC2) in innate immunity and inflammatory diseases,“ *Biosci. Rep.*, Izv. 32, št. 6, pp. 597-608, 2012.
- [10] Ž. Jakopin, „Nucleotide-Binding Oligomerization Domain (NOD) Inhibitors: A rational Approach toward Inhibition of NOD Signaling Pathway,“ *J. Med. Chem.*, Izv. 75, pp. 6897-6918, 2014.

- [11] V. Sukhithasri, N. Nisha, L. Biswas, V. A. Kumar in R. & Biswas, „Innate immune recognition of microbial cell wall components and microbial strategies to evade such recognitions,“ *Microbiol Res.*, Izv. 168, št. 7, pp. 396-406, 2013.
- [12] K. H. Schleifer in O. Kandler, „Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications,“ *Microbiol Rev.*, Izv. 36, št. 4, p. 407, 1972.
- [13] W. Vollmer, D. Blanot in M. A. De Pedro, „Peptidoglycan structure and architecture,“ *FEMS Microbiol. Rev.*, Izv. 32, št. 2, pp. 149-167, 2008.
- [14] M. Netea, G. Ferwerda, D. de Jong, T. Jansen, L. Jacobs, M. Kramer, T. Naber, J. Drenth, S. Girardin, B. Kullberg in G. Adema, „Nucleotide-binding oligomerization domain-2 modulates specific TLR pathways for the induction of cytokine release.,“ *J. Immunol.*, Izv. 174, št. 10, pp. 6518-6523, 2005.
- [15] T.-D. Kanneganti, M. Lamkanfi in G. Núñez, „Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease,“ *Immunity*, Izv. 27, št. 4, pp. 549-559, 2007.
- [16] M. Kaparakis-Liaskos, „The intracellular location, mechanisms and outcomes of NOD1 signaling,“ *Cytokine*, Izv. 74, št. 2, pp. 207-212, 2015.
- [17] D. J. Philpott, M. T. Sorbara, S. J. Robertson, K. Croitoru in S. E. Girardin, „NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease,“ *Nat. Rev. Immunol.*, Izv. 14, št. 1, pp. 9-23, 2014.
- [18] S. Traub, S. von Aulock, T. Hartung in C. Hermann, „MDP and other mucopeptides—direct and synergistic effects on the immune system,“ *J. Endotoxin Res.*, Izv. 12, št. 2, pp. 69-85, 2006.
- [19] J. H. M. Van Der Meer, M. G. Netea in C. A. Dinarello, „Modulation of muramyl dipeptide stimulation of cytokine production by blood components,“ *Clin. Exp. Immunol.*, Izv. 156, št. 3, pp. 428-433, 2009.
- [20] C. L. Grimes, L. D. Z. Ariyananda, J. E. Melnyk in E. K. O’Shea, „The innate immune protein Nod2 binds directly to MDP, a bacterial cell wall fragment,“ *J. Am. Chem. Soc.*, Izv. 134, št. 33, pp. 13535-13537, 2012.
- [21] A. Laman, R. Lathe, G. Savinov, A. Shepelyakovskaya, K. Boziev, L. Baidakova, A. Chulin, F. Brovko, E. Svirshchevskaya, Y. Kotelevtsev in I. Eliseeva, „Innate immunity: Bacterial cell-wall muramyl peptide targets the conserved transcription factor YB-1,“ *FEBS Lett.*, Izv. 589, št. 15, pp. 1819-1824, 2015.

- [22] M. Gobec, I. Mlinarič-Raščan, D. M.S in Ž. Jakopin, „Structural requirements of acylated Gly-l-Ala-d-Glu analogs for activation of the innate immune receptor NOD2,“ *Eur. J. Med. Chem., Izv.* 116, pp. 5223-5234, 2016.
- [23] W. Strober, P. J. Murray, A. Kitani in T. Watanabe, „Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2,“ *Nat. Rev. Immunol., Izv.* 6, št. 1, pp. 9-20, 2006.
- [24] N. Zhao, Y. Ma, S. Zhang, X. Fang, Z. Liang in G. Liu, „New muramyl dipeptide (MDP) mimics without the carbohydrate moiety as potential adjuvant candidates for a therapeutic hepatitis B vaccine (HBV),“ *Bioorg. Med. Chem. Lett., Izv.* 21, št. 14, pp. 4292-4295, 2011.
- [25] Z. Jakopin, M. Gobec, I. Mlinarič-Raščan in M. Sollner Dolenc, „Immunomodulatory properties of novel nucleotide oligomerization domain 2 (Nod2) agonistic desmuramyldipeptides,“ *J. Med. Chem., Izv.* 55, št. 14, pp. 6478-6488, 2012.
- [26] S. Huang, L. Zhao, K. Kim, D. S. Lee in D. H. Hwang, „Inhibition of Nod2 signaling and target gene expression by curcumin,“ *Mol. Pharmacol., Izv.* 74, št. 1, pp. 274-281, 2008.
- [27] L. Zhao, M. J. Kwon, S. Huang, J. Y. Lee, K. Fukase, N. Inohara in D. H. Hwang, „Differential modulation of Nods signaling pathways by fatty acids in human colonic epithelial HCT116 cells,“ *J. Biol. Chem., Izv.* 282, št. 16, pp. 11618-11628, 2007.
- [28] D. J. Rickard, C. A. Sehon, V. Kasparcova, L. A. Kallal, X. Zeng, M. N. Montoute in P. M. Eidam, „Identification of benzimidazole diamides as selective inhibitors of the nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2) signaling pathway,“ *PLoS one, Izv.* 8, št. 8, p. e69619, 2013.
- [29] E. Guénin, M. Monteil, N. Bouchemal, T. Prangé in M. Lecouvey, „Syntheses of phosphonic esters of alendronate, pamidronate and neridronate,“ *Eur. J. Org. Chem., Izv.* 2007, št. 20, pp. 3380-3391, 2007.
- [30] C. Y. Fiakpui in E. E. Knaus, „Fiakpui, C. Y., & Knaus, E. E. (1987). An improved synthesis of 1, 3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2 H-pyrido [3, 4-e]-1, 4-diazepin-2-one via ortho-directed lithiation of 3-tert-butyl and 3-tert-butoxycarbonylaminopyridine,“ *Can. J. Chem., Izv.* 65, št. 6, pp. 1158-1161, 1987.

- [31] E. Garnier-Amblard, S. Mays, R. Arrendale, M. Baillie, A. Bushnev, D. Culver, T. Evers, J. Holt, R. Howard, L. Liebeskind in D. Menaldino, „ovel synthesis and biological evaluation of enigmols as therapeutic agents for treating prostate cancer.,“ *ACS Med. Chem. Lett.*, Izv. 2, št. 6, pp. 438-443, 2011.
- [32] M. Naps in I. B. Johns, „ptically Active Mono-substituted Succinic Acids and Derivatives,“ *J. Am. Chem. Soc.*, Izv. 62, št. 9, pp. 2450-2457, 1940.
- [33] P. Cherkupally, S. Ramesh, B. G. de la Torre, T. Govender, H. G. Kruger in F. Albericio, „Immobilized Coupling Reagents: Synthesis of Amides/Peptides,“ *ACS Comb. Sci.*, Izv. 16, št. 11, pp. 579-601, 2014.
- [34] W. König in R. Geiger, „Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazolen,“ *Chem. Ber.*, Izv. 103, št. 3, pp. 788-798, 1970.
- [35] W. König in R. Geiger, „Racemisierung bei peptidsynthesen,“ *Chem. Ber.*, Izv. 103, št. 7, pp. 2024-2033, 1970.
- [36] C. Inc, „Reagents & Reactions,“ [Elektronski]. Available: http://www.chempep.com/ChemPep-Generic-Term_Reagents_Reactions.htm. [Poskus dostopa 5 junij 2016].
- [37] O. C. Portal, „Synthesis of imidazoles and benzimidazoles,“ [Elektronski]. Available: <http://www.organic-chemistry.org/synthesis/heterocycles/imidazoles.shtm>. [Poskus dostopa 5 junij 2016].
- [38] L. Kenneth in H. Samuel, „Friedel-Crafts alkylation,“ *J. Chem. Educ.*, Izv. 40, št. 4, pp. 214-215, 1963.
- [39] X. Meng, X. Li, W. Chen, Y. Zhang, W. Wang, J. Chen, J. Song, H. Feng in B. Chen, „Facile One-Pot Synthesis of N-Alkylated Benzimidazole and Benzotriazole from Carbonyl Compounds,“ *J. Heterocyclic Chem.*, Izv. 51, št. 2, pp. 349-356, 2014.
- [40] Z. G. Le, Z. C. Chen, Y. Hu in Q. G. Zheng, „Organic reactions in ionic liquids: N-alkylation of phthalimide and several nitrogen heterocycles,“ *Synthesis*, Izv. 2, pp. 208-212, 2004.
- [41] V. R. Pattabiraman in J. W. Bode, „Rethinking amide bond synthesis,“ *Nature*, Izv. 480, št. 7378, pp. 471-479, 2011.

Asja Frank:

Načrtovanje in sinteza novih antagonistov receptorjev NOD2 z benzimidazolnim skeletom

- [42] T. A. Medicine, „Immunology I ,THE PHYSIOLOGY OF THE IMMUNE SYSTEM,“ [Elektronski]. Available: <http://theamazingmedicine.blogspot.si/2013/07/immunology-i-physiology-of-immune-system.html>. [Poskus dostopa 5 junij 2016].