

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA GREGORIČ

**VREDNOTENJE SINTEZNEGA POSTOPKA TER SINTEZA DERIVATOV
GVANIDINA IN KROMENO[3,4-D]IMIDAZOL-4(1H)-ONA KOT
POTENCIALNIH LIGANDOV NA TOLLU PODOBNEM RECEPTORJU 4 IN 7**

**EVALUATION OF SYNTHETIC PROCEDURE AND SYNTHESIS OF
GUANIDINE AND CHROMENO[3,4-D]IMIDAZOL-4(1H)-ONE DERIVATIVES
AS POTENTIAL LIGANDS OF TOLL LIKE RECEPTOR 4 AND 7**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sove, mag. farm. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo in Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani (Center za masno spektrometrijo). Testi na celičnih linijah so bili opravljeni na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino.

ZAHVALA

Najprej bi se rada zahvalila mentorju doc. dr. Mateju Sovi, mag. farm., za vse napotke, potrpežljivost, predano znanje in vodenje pri pripravi magistrske naloge. Prav tako se zahvaljujem tudi vsem ostalim strokovnim sodelavcem, ki so kakorkoli pripomogli k nastajanju te magistrske naloge. Posebna zahvala gre tudi staršem in prijateljem, ki so me v času študija vedno podpirali.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja doc. dr. Mateja Sove, mag. farm.

Maja Gregorič

Ljubljana, 2016

Predsednik komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin

Član komisije: asist. dr. Meta Kokalj Ladan

VSEBINA

KAZALO SLIK.....	I
KAZALO PREGLEDNIC.....	II
POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV.....	V
UVOD.....	1
1. IMUNSKI SISTEM	1
2. PRIROJENA IMUNOST.....	2
2.1. RECEPTORJI PRIROJENE IMUNOSTI.....	2
3. TLR RECEPTORJI.....	4
3.1. TLR4	7
3.1.1. LPS, SEPSA IN ANTAGONISTI TLR4	7
3.2 TLR7	11
3.2.1. BOLEZNI, POVEZANE S TLR7	12
3.2.2. SPOJINE Z AGONISTIČNIM IN ANTAGONISTIČNIM DELOVANJEM NA TLR7.....	14
NAMEN DELA.....	16
MATERIALI IN METODE	17
1. MATERIALI	17
2. METODE.....	18
EKSPERIMENTALNI DEL	21
1. Sinteza spojine 3	21
1. stopnja: sinteza spojine 1.....	21
2.stopnja: sinteza spojine 2.....	23
3.stopnja: sinteza spojine 3.....	24
2. Sinteza spojine 5	25

1.stopnja: sinteza spojine 4.....	25
2. stopnja: sinteza spojine 5.....	26
3. Sinteza spojine 7	27
1. stopnja: sinteza spojine 6.....	27
2. stopnja: sinteza spojine 7.....	28
4. Sinteza spojine 9	29
1. stopnja: sinteza spojine 8.....	29
2. stopnja: sinteza spojine 9.....	30
5. Sinteza spojine 11	31
1. stopnja: sinteza spojine 10.....	31
2. stopnja: sinteza spojine 11.....	32
6. Sinteza spojine 13	33
1. stopnja: sinteza spojine 12.....	33
2. stopnja: sinteza spojina 13.....	34
9. Sinteza spojine 19	35
1. stopnja: sinteza spojine 18.....	35
2. stopnja: sinteza spojine 19.....	36
REZULTATI IN RAZPRAVA	38
1.1. Spojine s potencialnim delovanjem na receptor TLR4.....	38
1.1.1 Rezultati biološkega testiranja spojin s potencialnim delovanjem na receptor TLR4	44
1.2. Spojine s potencialnim delovanjem na receptor TLR7	45
1.2.1 Rezultati biološkega testiranja spojin s potencialnim delovanjem na receptor TLR7	48
SKLEP	49
LITERATURA	50

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz receptorja TLR, povzeto po (11)	4
Slika 2: Strukturna formula TAK-242; povzeto po (23)	9
Slika 4: Strukturna formula spojine A (povzeto po 23).....	10
Slika 3: Strukturni prikaz Eritorana, povzeto po (23)	10
Slika 5: Strukturna formula spojine B (povzeto po 23).....	11
Slika 6: Strukturna formula imikvimoda, povzeto po (36).....	14
Slika 7: Strukturna formula 1-izobutilkromeno[3,4- <i>d</i>]imidazol-4(1 <i>H</i>)-ona, povzeto po (46)	15
Slika 8: Spojina B, povzeto po (23).....	16
Slika 9: Strukturna formula 1-izobutilkromeno[3,4- <i>d</i>]imidazol-4(1 <i>H</i>)-ona, povzeto po (27)	16
Slika 10: Reakcijska shema sinteze spojine 1	21
Slika 11: Reakcijska shema sinteze spojine 2	23
Slika 12: Reakcijska shema sinteze spojine 3	24
Slika 13: Reakcijska shema sinteze spojine 4	25
Slika 14: Reakcijska shema sinteze spojine 5	26
Slika 15: Reakcijska shema sinteze spojine 6	27
Slika 16: Reakcijska shema sinteze spojine 7	28
Slika 17: Reakcijska shema sinteze spojine 8	29
Slika 18: Reakcijska shema sinteze spojine 9	30
Slika 19: Reakcijska shema sinteze spojine 10	31
Slika 20: Reakcijska shema sinteze spojine 11	32
Slika 21: Reakcijska shema sinteze spojine 12	33
Slika 22: Reakcijska shema sinteze spojine 13	34
Slika 23: Reakcijska shema sinteze spojine 18	35
Slika 24: Reakcijska shema sinteze spojine 19	36
Slika 25: Nastanek Vilsmeier-Hacckovega reagenta s trifosgenom, povzeto po (47)	38
Slika 26: Nastanek Vilsmeier-Hacckovega reagenta z oksalil kloridom, povzeto po (47) .	38
Slika 27: Mehanizem nastanka produkta prve stopnje, povzeto po (48).....	38
Slika 28: Mehanizem reakcije druge stopnje, povzeto po (54, 55)	41
Slika 29: Pretvorba 3-formilkromona, povzeto po (54)	41
Slika 30: Mehanizem nastanka produkta 3. stopnje, povzeto po (51).....	43

Slika 31: Predpostavljen mehanizem reakcije sinteze 1.stopnje, povzeto po (57)	46
Slika 32: Mehanizem reakcije sinteze 2. stopnje, povzeto po (62)	47

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Primeri PAMP in vrsta mikrobov, pri katerih so prisotni, povzeto po (1).....	3
Preglednica II: Primeri DAMP; povzeto po (1)	3
Preglednica III: seznam PRR-jev, njihova lokacija, primeri le-teh in PAMP oz. DAMP, ki jih prepoznajo, povzeto po (1).....	4
Preglednica IV: Seznam TLR-jev in nekaterih njihovih ligandov, povzeto po (3, 4, 5, 8, 10)	6
Preglednica V: Tabela izkoristkov prve stopnje sinteze.....	39
Preglednica VI: preglednica izkoristkov druge stopnje sinteze.....	42

POVZETEK

Živimo v svetu, v katerem smo obkroženi z mikrobi, patogenimi in nepatogenimi. Za zaščito pred patogenimi mikrobi imamo v telesu razvito obrambo, ki se imenuje imunski sistem. Imunski sistem delimo na prirojenega in pridobljenega. Ko pride do vdora patogenega mikroorganizma v telo, ga prepoznajo receptorji naravne imunosti oz. PRR receptorji. Eni pomembnejših receptorjev v tej skupini so TLR oz. Toll-u podobni receptorji. Pri človeku so do sedaj odkrili 10 različnih TLR-jev. TLR4 in TLR7 sta dva od najbolj znanih in raziskanih receptorjev. Prvi se nahaja na plazemski membrani celic imunskega sistema, drugi pa v njihovih intracelularnih veziklih. Spremenjen, prekomeren ali prešibek odziv omenjenih receptorjev na prepoznane PAMP ali DAMP je povezan s številnimi boleznimi. Napake v delovanju TLR4 lahko povežemo s sepsa, aterosklerozo, infekcijskimi boleznimi, vnetnimi črevesnimi boleznimi in nevropatsko bolečino. Napake v delovanju TLR7 pa z avtoimunskimi boleznimi, astmo, nekaterimi rakavimi obolenji in virusnimi boleznimi. Gre za širok spekter bolezni, ki bi jih z ustreznimi agonisti oz. antagonisti TLR4 in 7 lahko uspešno zdravili.

Magistrska naloga je sestavljena iz dveh delov. V prvem smo sintetizirali derivate 1-(4-fluorofenil)-2-(5-(2-hidroksi-5-metoksibenzoil)pirimidin-2-il)gvanidina kot potencialne antagoniste TLR4. Uporabljene sintezne postopke smo med seboj primerjali in jih ovrednotili z vidika izkoristkov, porabe časa in topil ter zapletenosti izvedbe reakcije in končne izolacije. Izmed sintetiziranih derivatov nas je še posebej zanimal 4,5-dimetoksi derivat, saj smo zaradi prisotnosti dveh metoksi skupin pričakovali večjo aktivnost kot pri že sintetiziranih monometoksi derivatih na mestih 4 in 5. Na žalost se je spojina izkazala za citotoksično.

V drugem delu naloge pa smo se usmerili k sintezi derivatov izobutilkromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-ona, katerim smo ovrednotili tako potencialno agonistično kot tudi antagonistično delovanje na TLR7. Zanimale so nas spojine z bazičnim centrom na mestu 7. Za bazični center smo si izbrali dietilamino skupino in po dvostopenjski sintezni poti smo sintetizirali spojino **19**. Na koncu smo jo biološko ovrednotili in izkazalo se je, da je spojina **19** agonist TLR7 z EC₅₀ vrednostjo okrog 30 µM.

ABSTRACT

We live in a world surrounded by microbes, pathogenic and non-pathogenic. To protect us against pathogenic microbes, our body developed a defence called the immune system. The immune system can be divided into innate and acquired. When it comes to the invasion of the pathogen into the body, the body recognizes it with the help of the pathogen recognition receptors (-PRR's). One of the most important receptors in this group is the Toll like receptors or TLR's. So far scientists have discovered 10 different TLR's in humans. TLR4 and TLR7 are two of the best known and most studied receptors. The former is located on the plasma membrane of the immune system cells and the latter in their intracellular vesicles. Modified, excessive or poor response of these receptors to identified PAMP or DAMP is associated with many diseases. Malfunctions of TLR4 can be associated with sepsis, atherosclerosis, infectious diseases, inflammatory bowel disease and neuropathic pain.. Malfunctions of TLR7 can be associated with autoimmune diseases, asthma, certain cancerous diseases and infectious diseases. Therefore a broad spectrum of diseases could be successfully treated with TLR4 and/or 7 agonists or antagonists.

Master's thesis consists of two parts. In the first part we synthesized derivatives of 1-(4-fluorophenyl)-2-(5-(2-hydroxy-5-methoxybenzoyl)-pyrimidin-2-yl)guanidine as potential TLR4 antagonists. Furthermore, we compared the synthetic procedures and evaluated it in terms of yields, reaction time, solvents, the complexity of the reaction and the final isolation. Among the synthesized products we were particularly interested in the 4,5-dimethoxy derivative because we expected, due to the presence of two methoxy groups, higher potency compared to already synthesized 4- or 5-monomethoxy derivatives. Unfortunately, this compound was proved to be cytotoxic.

In the second part of the study, we focused on the synthesis of of isobutylchromeno[3,4-*d*]imidazole-4(1H)-one derivatives, which were furthermore evaluated for potential TLR7 agonist or antagonist activity. We were interested in the preparation of compounds with a basic centre on the position 7. Diethylamino group was chosen as the basic centre and compound **19** was synthesized in a two-step synthetic pathway. Finally, the biological evaluation showed that the compound **19** is a TLR7 antagonist with the EC₅₀ value around 30 µM.

SEZNAM OKRAJŠAV

ACCP/SCCM	ameriški kolidž medicine prsnega koša/združenje za zdravstvene oskrbe kritičnih stanj (<i>angl.</i> American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine)
AIM2	odsotni pri melanomu-2 (<i>ang.</i> : absent in melanoma-2)
angl.	angleško
AP-1	aktivacijski protein 1
ATP	adenozin trifosfat (<i>ang.</i> : adenosine triphosphate)
BTC	bis(triklorometil) karbonat-trifosgen
CD14	diferenciacijski faktor 14 (<i>angl.</i> cluster of differentiation 14)
CD36	diferenciacijski faktor 36 (<i>ang.</i> :cluster of differentiation 36)
CDCl ₃	devteriran kloroform
CDS	citosolni DNA-senzorji (<i>ang.</i> : cytosolic DNA sensors)
CLR	receptorji lektina tipa C (<i>angl.</i> C-type lectin receptors)
CpG	C-citozin, G-gvanin, p-fosfodiester (<i>ang.</i> : C-cytosine, G-guanine, p-phosphodiester)
DAMP	molekulski vzorci povezani z nevarnostjo (<i>ang.</i> danger associated molecular patterns)
DC	dendritične celice (<i>angl.</i> : dendritic cells)
DKM	diklorometan
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO (- <i>d</i> ₆)	(devterirani) dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina (<i>angl.</i> : deoxyribonucleic acid)
dsRNA	dvoverižna RNA (<i>angl.</i> : double-stranded RNA)
EC ₅₀	srednja efektivna koncentracija
ESI-MS	masna spektrometrija z ionizacijo z elektrorazprševanjem

FPR	formil peptidni receptor (ang.: formyl peptide receptors)
FPRL1	formil peptidnem receptorju podobni receptor 1 (ang.: formyl peptide receptor-like 1)
G ⁻ bakterije	po Gramu negativne bakterije
G ⁺ bakterije	po Gramu pozitivne bakterije
HCV	Virus hepatitisa C
HEK 293	celična linija, pridobljena iz človeških embrionalnih ledvičnih celic (angl.: human embryonic kidney cell line)
HMGB1	skupina visokomobilnih beljakovin B1(angl. high-mobility group protein B1)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HPV	Humani papiloma virus
HRMS	visoko ločljiva masna spektrometrija
HSP	stresni proteini (omenjeni HSP-60/70/72/22/96) (angl. heat-shock proteins)
IFN	interferon (omenjeni IFN- α , IFN- β in IFN- γ)
I κ B	inhibitor kinaze kapa B (angl. inhibitor of κ B)
IL	interlevkin (omenjeni IL-1, IL-4, IL-6, IL-13, IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-8, IL-10, IL-12p40, IL-23)
iPrOH	izopropanol
IR	infrardeča spektroskopija
IRAK	kinaza, aktivirana z receptorjem IL-1 (angl.: IL-1 receptor-activated (omenjena IRAK1, IRAK4)
IRF	interferon-regulatorni faktor (omenjena IRF-3 in IRF-7) (angl. IFN-regulatory factor 3)
LBP	LPS-vezavni protein (angl. LPS-binding protein)
LPS	lipopolisaharid, tudi endotoksin (angl. lipopolysaccharide)

LRR	z levcinom bogata regija (angl.: leucin rich repeats)
LTA	lipotehoična kislina (ang.: Lipoteichoic acid)
MAP	kinaze aktivirane z mitogenom (angl. mitogen-activated protein kinase)
MD-2	mieloidni diferenciacijski protein 2 (angl. myeloid differentiation protein 2)
MDA-5	z diferenciacijo melanoma povezan antigen 5 (ang.: melanoma differentiation-associated gene 5)
MF	mobilna faza
MIP	makrofagni vnetni protein (ang.: macrophage inflammatory protein), (omenjena MIP-1 α in MIP-1 β)
mRNA	informacijska RNA (ang.: messenger RNA)
MW	molekulska masa
MyD88	diferenciacijski mielodni protein 88 (angl. myeloid differentiation primary-response protein 88)
NET	neutrofilne ekstracelularne pasti (ang.: neutrophil extracellular traps)
NF- κ B	jedrni faktor kapa B (angl.: nuclear factor κ B)
NK	celice ubijalke (angl.: natural killer cells)
NKT	naravne T celice ubijalke (ang.: natural killer T cells)
NLR	NOD-u podobni receptor (angl.: NOD like receptor)
NMR	jedrska magnetna resonanca
NOD1/2	nukleotid-vezavna oligomerizacijska domena 1/2 (ang.: nucleotide-binding oligomerization domain 1/2)
PAMP	molekulski vzorci povezani s patogenom (angl.: pathogen-associated molecular pattern)
pDC	plazmacitoidne dendritične celice (ang.: plasmacytoid dendritic cells)
PG	peptidoglikan

PRR	receptorji, ki prepoznavajo določene molekulske vzorce (angl. pattern-recognition receptors)
Rf	retencijski faktor
RIG-1	z retinojsko kislino inducibilni gen (ang.: retinoic acid-inducible gene I)
RLR	RIG-1 podobni receptorji (angl. RIG-1-like receptors)
RNA	ribonukleinska kislina (angl.: ribonucleic acid)
SeV	Virus parainfluence tipa 1(ang.: Sendai virus)
siRNA	majhna interferenčna RNA (ang.: Small interfering RNA)
SLE	Sistemski lupus eritematozus
ssRNA	enoverižna RNA (angl.: single-stranded RNA)
STING	stimulator interferonskih genov (ang.: stimulator of interferon genes)
THF	tetrahidrofuran
TIR	domena Toll-interlevkinskega receptorja (angl. Toll-interleukin receptor domain)
TIRAP	adaptorski protein podoben MyD88 (angl. TIR-domain-containing adaptor protein)
TLR	Toll-u podoben receptor (angl.: Toll like receptor)
TMS	tetrametilsilan
TMSCl	tetrametilsilil klorid
TNF- α	dejavnik tumorske nekroze α (angl. tumor necrosis factor α)
TPK	tankoplastna kromatografija
TRAF	s TNF-receptorjem povezan faktor (angl.: TNF receptor-associated factor) (omenjena TRAF3 in 6)
TRAM	adaptorski protein soroden TRIF (angl. TRIF-related adaptor molecule)
TRIF	adapterski protein, ki vključuje domeno TIR in faktor IFN- β (angl.: TIR-domain-containing adaptor-including IFN- β -factor)

T_{tal} temperatura tališča

VSV Virus vezikularnega stomatitisa (ang.: vesicular stomatitis Indiana virus)

UVOD

1. IMUNSKI SISTEM

Naše telo je v vsakem trenutku ogroženo, saj nas obdaja svet poln patogenih mikrobov. Prav zaradi tega je naše telo razvilo obrambo, ki jo imenujemo imunski sistem. Imunski sistem je sistem celic in molekul, ki so odgovorne za imunost, njihov skupen in usklajen odgovor na telesu tujo substanco pa imenujemo imunski odgovor. V večini primerov se imunski odgovor sproži le v primeru stika s telesu tujo substanco (npr. LPS ali antigen). Obstajajo tudi primeri, ko imunski sistem ne deluje pravilno in telesu lastno molekulo prepozna kot tujo. Takemu odgovoru pravimo avtoimunski odgovor. Ta vodi v avtoimunske bolezni. Imunski odziv na neko substanco pa je lahko tudi premočen ali neprimeren, kar vodi v pojav hipersenzitivnosti (1, 2).

Poznamo dva tipa imunosti, prirojena ali naravna imunost ter pridobljena ali specifična imunost. **Prirojena imunost** predstavlja prvo linijo obrambe pred patogeni. Komponente prirojene imunosti so stalno prisotne na mestih, kjer je možna infekcija in tako omogočajo takojšen odgovor. Odziv je ob ponavljajočih izpostavitvah vedno enak, mehanizem prepoznavanja mikrobov in poškodovanih celic pa temelji na prepoznavanju značilnih struktur PAMP in DAMP. Komponente prirojene imunosti so fizične in kemične pregrade (npr. epitelij), fagocitirajoče celice (nevtrofilci in makrofagi), dendritične celice, celice ubijalke ter krvni proteini (sistem komplementa in drugi mediatorji vnetja). Glavna mehanizma delovanja prirojenega imunskega odgovora sta vnetje in protivirusna zaščita (1, 2, 3). **Pridobljeno imunost** pa v nasprotju s prirojeno, kot že samo ime pove, pridobimo. Pridobimo jo ob izpostavitvah različnim patogenom in z vsako uspešno izpostavitvijo postane odziv močnejši, hitrejši in uspešnejši v boju proti patogenim mikrobom. Zanje so značilne specifičnost, spomin, velika raznolikost, klonska ekspanzija in specializiranost. Celice pridobljenega imunskega sistema so limfociti B in limfociti T. Limfociti B proizvajajo protitelesa in so temelj humoralne imunosti. Limfocite T, ki so temelj celično posredovane imunosti, delimo na T-pomagalko, T-zaviralke, citotoksične T limfocite in NK celice. Pridobljen spomin je tudi osnova za cepljenje proti nalezljivim boleznim (1, 4).

2. PRIROJENA IMUNOST

Prirojena imunost predstavlja evolucijsko star del imunskega sistema, v nasprotju s pridobljeno imunostjo, ki se je razvila šele pri vretenčarjih, saj lahko določene mehanizme delovanja najdemo tako pri rastlinah, kot pri ljudeh (5). Gre za pomemben del imunskega sistema, saj se ob njeni nezadostnosti, inhibiciji ali odsotnosti znatno poveča občutljivost na infekcije, kljub temu, da je pridobljen imunski sistem popolnoma dejaven. Mehanizmi prirojenega imunskega sistema prepoznajo in se odzovejo na molekule, ki se akumulirajo, nastanejo ali se sprostijo iz poškodovanih, oslabeledih ali mrtvih celic. Poškodovane celice odstranijo in začnejo proces obnove poškodovanega tkiva (1). Prirojena imunost ima tudi pomembno funkcijo pri aktivaciji in oblikovanju odgovora pridobljenega imunskega sistema na prisotno okužbo, tako, da je ta najbolj optimalen (1, 6).

Torej, da do okužbe sploh pride, je nujen vdor patogenih organizmov v naše telo. Pri tem patogene ovirajo številne fizikalne pregrade kot so koža in sluznice. Celice sluznic so prekrte s filmom lepljive sluzi, v katero se ujamejo patogeni mikroorganizmi in drugi tujki. Sluz se nato odstrani s ciliarnim transportom v respiratornem traktu ali s peristaltiko v prebavnem traktu. Prav tako vrednosti pH na koži, v želodcu in urogenitalnem traktu niso ugodne za razvoj mikroorganizmov. Velik pomen pripisujejo tudi spiranju površin s solzami, slino in urinom (1, 7). Če patogenom kljub pregradam uspe vdreti v naše telo, se z njimi najprej spopadejo celice prirojenega imunskega sistema.

2.1. RECEPTORJI PRIROJENE IMUNOSTI

Celice prirojenega imunskega sistema prepoznajo patogene mikroorganizme preko molekulskih vzorcev povezanih s patogenom, krajše **PAMP**. Primeri le-teh so predstavljeni v Preglednici I. Različni tipi mikrobov (virusi, bakterije, glive, praživali) izražajo različne PAMP (1).

Kot je razvidno iz Preglednice I, so strukture patogenov, ki jih prepozna prirojen imunski sistem, večinoma esencialnega pomena za njihovo preživetje. To pomeni, da se patogeni ne morejo izogniti uničenju s strani prirojenega imunskega sistema tako, da bi se znebili ali spremenili katero izmed zgoraj naštetih struktur, kot je npr. RNA ali LPS, saj bi s tem ogrozili svoj obstoj (1, 3). Prirojen imunski sistem pa ne prepozna samo PAMP, ampak tudi endogene molekule, ki jih proizvajajo ali sproščajo poškodovane in umirajoče celice. Te molekule imenujemo DAMP (molekulski vzorci povezani z nevarnostjo) (1). Primeri DAMP so predstavljeni v Preglednici II.

Preglednica I: Primeri PAMP in vrsta mikrobov, pri katerih so prisotni, povzeto po (1)

PAMP		VRSTA MIKROBA
Nukleinska kislina	• ssRNA • dsRNA • CpG	• virusi • virusi • virusi, bakterije
Proteini	• pilin • flagelin	• bakterije • bakterije
Lipidi celične stene	• LPS • lipotehoična kislina	• G⁻ bakterije • G⁺ bakterije
Ogljikovi hidrati	• manan • gluklan	• glive, bakterije • glive

Preglednica II: Primeri DAMP; povzeto po (1)

Stresni proteini	HSP
Kristali	Mononatrijev urat
Jedrni proteini	HMGB1

PAMP in DAMP prepozna veliko različnih receptorjev, ki jih s skupnim imenom imenujemo **PRR** (ang. pattern recognition receptors) oz. receptorji prirojene imunosti. Ti receptorji se nahajajo v fagocitih (primarno makrofagih in nevtrofilcih), dendritičnih celicah, epiteljskih celicah in mnogih drugih. Najdemo jih na celičnih membranah, v fagocitnih veziklih, citosolu in plazmi (1). V preglednici III so predstavljeni posamezni PRR, njihova lokacija ter PAMP in DAMP, ki jih prepoznavajo.

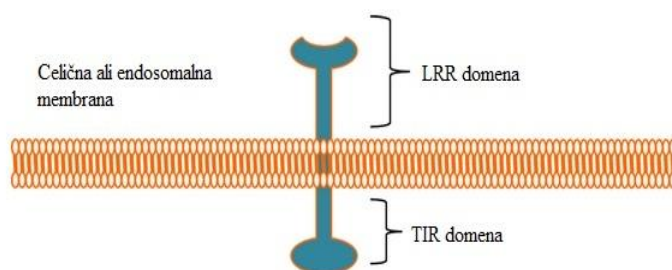
Ko pride do povezave PAMP oz. DAMP z receptorjem se sprožijo različne signalne poti, ki pripeljejo do sproščanja različnih molekul (npr. citokinov, IFN tipa I,...), ki sodelujejo pri vnetnem in imunskem odgovoru (1, 3, 4.). Sprožitev signalnih poti prek PRR sočasno inducira zorenje dendritičnih celic, kar predstavlja alarm za aktivacijo pridobljene imunosti (8).

Preglednica III: seznam PRR-jev, njihova lokacija, primeri le-teh in PAMP oz. DAMP, ki jih prepoznajo, povzeto po (1)

PRR	Lokacija	Primer	PAMP/DAMP
TLR	plazmalema in membrana endosoma dendritičnih celic, fagocitov, B celic, endotelijskih celic, itd	TLR 1-10	LPS, peptidoglikani, nukleinske kisline, itd.
NLR	citoplazma fagocitov, epitelijskih in drugih celic	NOD1/2 Družina NLRP	Peptidoglikani bakterijske celične stene, intracelularni kristali (urati, silikati), sprememba v citoplazmi ATP in koncentraciji ionov, itd.
RLR	citoplazma fagocitov in drugih celic	RIG-1, MDA-5	Virusna RNA
CDS	citoplazma mnogih celic	AIM2; STING- povezani CDS	Bakterijska in virusna DNA
CLR	plazmalema fagocitov	Manozni receptor, dectin	Ogljikovi hidrati, na površini mikrobov s terminalnimi manozami in fruktozami Glukani v celičnih stenah gliv
Odstranjevalni receptor	plazmalema fagocitov	CD36	Mikrobni triacilgliceridi
N-formilmet-leu-phe receptorji	plazmalema fagocitov	FPR in FPRL1	Peptidi z N-formilmetionilnim ostankom

3. TLR RECEPTORJI

Toll-u podobni receptorji so evolucijsko ohranjeni receptorji vse od črvov *Caenorhabditis elegans* do sesalcev (3, 6). Ime so dobili zaradi svoje homologije s Toll receptorjem pri muhi *Drosophila*, ki je odgovoren



Slika 1: Shematski prikaz receptora TLR, povzeto po (11)

za imunsko zaščito muhe pred glivami (3, 4, 6). Gre za integralne membranske glikoproteine tipa I (slika 1) za katere je značilna signalizirajoča citoplazemska

Tool/interleukin-1 (TIR) homologna domena ter ekstracelularna domena, ki je sestavljena iz različnega števila z levcinom bogatih ponavljajočih se zaporedji (angl. LRR), odgovornih za prepoznavanje ligandov ter prenos signala (1, 4, 6, 9, 10). Pri človeku so do sedaj odkrili 10 različnih TLR-jev, pri miših pa 12. Znani so naravni ligandi za vse človeške TLR-je razen za TLR10 (5, 12). Za večino TLR-jev vemo, katero endogeno molekulo prepozna (4).

TLR-je najdemo v različnih celicah imunskega sistema: makrofagih, nevtrofilcih, dendritičnih celicah, limfocitih B, nekaterih vrstah limfocitov T, pa tudi v drugih vrstah celic, kot so na primer epiteljske celice, nevroni, astrociti in fibroblasti (3, 5). TLR1, 2, 4, 5, 6 in 10 se nahajajo na plazemski membrani, medtem ko so TLR3, 7, 8 in 9 izraženi v znotrajceličnih veziklih (endoplazemskem retikulumu, endosomih, lizosomih in endolizosomih) (8, 12). Ta porazdelitev TLR-jev, še posebej TLR3, 7, 8 in 9, ki prepoznavajo tujo DNA in RNA, je pomembna zato, da ne pride do prepoznavne lastne RNA oz. DNA, kar bi lahko vodilo v avtoimunske bolezni. Lastna RNA in DNA se namreč ponavadi ne nahajata v znotrajceličnih veziklih, kjer so izraženi omenjeni TLR (5). Prav tako je pomembno, da se receptorji, ki prepoznajo HSP in HMGB1 nahajajo na plazemski membrani in prepoznajo ligande, ki se nahajajo ekstracelularno. Tako prepoznajo HSP in HMGB1 le takrat, ko se ta sprostita iz poškodovanih ali mrtvih celic in tako opozorita na neko abnormalno stanje (1, 6). Različni TLR-ji običajno prepoznajo različne ligande. Poznamo pa tudi ligande, ki jih prepozna več TLR-jev (npr. ssRNA) in TLR-je, ki prepoznajo več strukturno različnih ligandov (npr. TLR4, ki prepozna tako LPS kot virusne komponente) (6). V preglednici IV so predstavljeni ligandi posameznih TLR-jev.

Po vezavi endogenega ali eksogenega liganda na TLR pride do dimerizacije receptorja. TLR2 tvori heterodimere s TLR1 in TLR6, ostali TLR-ji pa najverjetneje tvorijo homodimere (10). Poleg dimerizacije pride tudi do sprememb v konformaciji receptorjev. S tako preoblikovanimi TLR se nato preko TIR domen povežejo adaptorski proteini MyD88, TRIF, TIRAP in TRAM (3, 5). Po vezavi adaptorskih proteinov pride do aktivacije signalnih poti, ki na koncu privedejo do sproščanja vnetnih citokinov (IL-1, IL-6, TNF- α), kemokinov, endotelijskih adhezijskih molekul in interferonov tipa 1 (INF- α in INF- β) (1, 3, 5). Poznamo dve poti: od MyD88-odvisno pot in od TRIF-odvisno oz. od MyD88-neodvisno pot (10). Vsi TLR z izjemo TLR3 delujejo prek od MyD88-odvisne poti, ki vodi v produkcijo pro-vnetnih citokinov. Pri TLR2 in 4 je potreben še dodaten

adaptorski protein TIRAP, ki povezuje omenjena receptorja z MyD88, da lahko pride do aktivacije te signalne poti (3, 13). Prek MyD88-neodvisne poti pa delujeta TLR3 in 4 kar vodi v produkcijo interferonov tipa 1 in pro-vnetnih citokinov. Signaliziranje preko TLR4 tudi tukaj zahteva še dodaten adaptorski protein TRAM (3, 8).

Preglednica IV: Seznam TLR-jev in nekaterih njihovih ligandov, povzeto po (3, 4, 5, 8, 10)

Receptor	Eksogeni ligand	Izvor liganda	Endogeni ligand
TLR2/1 in TLR2/6	Lipopeptidi, lipoproteini, PG, LTA , lipoarabinomanan, glikozilfosfatidinoinozitol,...	Gram-pozitivne in gram-negativne bakterije, glive, praživali	HSP-60, -70, -96; HMGB 1
TLR3	dsRNA	Virusi	mRNA
TLR4	LPS , manan, glikoinozitolfosfolipidi, proteini virusne ovojnice	Gram-negativne bakterije, glive, virusi	HSP-60, -70; HMGB 1, fibrinogen, oligosaharidi hialuronske kisline,...
TLR5	flagelin	Bakterije z bički	/
TLR7	ssRNA	RNA virusi	ssRNA
TLR8	ssRNA	RNA virusi	ssRNA
TLR9	Nemetilirana DNA, CpG DNA	Virusi, bakterije	DNA

Aktivacija TLR je torej tisti del prirojenega imunskega sistema, ki poskrbi za vnetno reakcijo ob izpostavitvi mikrobom ali lastnim molekulam, sproščenim iz poškodovanih ali mrtvih celic (5, 9). Prav tako pa aktivacija TLR v antigen predstavitvenih celicah, kot so npr. dendritične celice, vpliva na naravo in jakost pridobljenega imunskega odziva (4). Aktivirane dendritične celice izražajo kostimulatorne molekule, ki so esencialnega pomena za aktivacijo T celic in ki lahko usmerijo diferenciacijo naivnih CD4⁺ T celic v Th1 ali Th2 celice. Th1 celice proizvajajo IFN- γ in sodelujejo pri protibakterijskem in protivirusnem odgovoru, Th2 pa IL-4 in IL-13 in so udeležene pri alergijskih reakcijah ter odgovoru na helminte. Stimulacija večine TLR vodi v diferenciacijo CD4⁺T celic v Th1 celice (3, 7). Vnetni odziv igra v boju proti patogenim mikroorganizmom pomembno vlogo in je zato življenjskega pomena. Po drugi strani pa prekomeren vnetni odziv povzroči več škode kot koristi in je lahko tudi usoden (9). Zato mora biti vnetni odziv nadzorovan in uravnovešen. Če se pojavijo motnje v regulaciji, to lahko vodi v različne bolezni kot so sepsa, astma, alergijski rinitis, kronična vnetja, nevropatična bolečina, avtoimunske bolezni (sistemski

eritematozni lupus, revmatoidni artritis,...), rakave bolezni, itd. Ena od možnosti zdravljenja teh bolezni je agonistično ali antagonistično delovanje na TLR.

3.1. TLR4

TLR4 je prvi iz družine Toll-like receptorjev, ki so ga odkrili (10). Gre za integralni membranski glikoprotein tipa 1, ki ga najdemo na celičnih membranah makrofagov, monocitov, dendritičnih celic, mastocitov, adipocitov, astrocitov, mikroglijskih celic, oligodendrocitov, črevesnih epitelijskih celic, kupferjevih celic in mnogih drugih (14, 15). TLR4 je receptor z zelo širokim spektrom ligandov. Prepozna LPS G⁻ bakterij, manan in glukuronoksilomanan gliv, glikoinozitolfosfolipid parazitov, proteine virusnih ovojnic, ter telesu lastne molekule kot so HSP60/70/72/22, HMGB1, fibrinogen, fragmente hialuronske kisline in fragmente heparan sulfata (3, 10, 14).

Po aktivaciji TLR4 z ligandom se lahko sproži od MyD88-odvisna ali od TRIF-odvisna pot. Ti dve poti imata različno kinetiko. TLR4 najprej aktivira adaptorska proteina MyD88 in TIRAP, kar po kaskadi dogodkov pripelje do zgodnje faze aktivacije NF- κ B in MAP-kinaz. Sledi endocitoza TLR4 in njegova mobilizacija v fagosom. Tam TLR4 aktivira adaptorska proteina TRAM in TRIF, kar pripelje do aktivacije IRF 3 in pozne faze aktivacije NF- κ B in MAP-kinaz (8). Vse to vodi v nastanek inducibilne NO sintetaze, vnetnih citokinov, kemokinov in njihovih receptorjev, vključno z TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, IL-23, MIP-1 α in MIP-1 β , IFN- β , in kemokina RANTES. Zgoraj naštet faktorji začnejo vnetni odgovor, povečajo permeabilnost žilja, povzročijo migracijo DC in makrofagov iz periferije v centralne limfoidne organe in nadzorujejo razvoj pridobljenega imunskega sistema (16).

Receptorji TLR4 igrajo pomembno vlogo pri velikem številu bolezni: sepsi, ishemični/reperfuzijski poškodbi miokarda, aterosklerozi, infekcijskih boleznih, odpovedi ledvic, boleznih jeter, vnetnih črevesnih boleznih, nevropatski bolečini in drugih. Na vse te bolezni lahko vplivamo z antagonisti TLR4 (17). Agonisti pa so uporabni kot učinkovine za zdravljenje alergijskega rinitisa in kot adjuvansi v cepivih. Monofosforil lipid A je odobren s strani FDA in kot adjuvans nastopa v cepivih, prisoten je npr. v cepivu za hepatitis B (4, 12).

3.1.1. LPS, SEPSA IN ANTAGONISTI TLR4

Eni glavnih ligandov, ki se vežejo na TLR4, so lipopolisaharidi (LPS), endotoksini iz celične stene G⁻ bakterij. LPS sprožijo nastajanje številnih vnetnih citokinov TNF- α , IL-1 β

in IL-6 ter so tako vzrok številnim patološkim procesom; od blagih, kot je povišana telesna temperatura do smrtnih, kot so septični šok in odpoved organov (17). Sestavljeni so iz treh domen: lipida A, osrednjega oligosaharida in O-antigena. Lipid A je tisti del proteina, ki je ohranjen med različnimi LPS in tako odgovoren za vezavo na TLR4 in posledično sprožitev imunskega odgovora. Da do vezave na TLR sploh lahko pride, se mora LPS najprej sprostiti iz celične stene bakterij in se nato s pomočjo dveh dodatnih proteinov LBP in CD14 prenesti do kompleksa TLR4-MD-2, ki je odgovoren za njegovo prepoznavo. Pet od šestih lipidnih verig LPS interagira z velikim hidrofobnim žepom v MD-2, šesta veriga pa tvori hidrofobne interakcije s fenilalaninom na TLR4. Tvori se dimer sestavljen iz dveh TLR4-MD-2-LPS kompleksov, kar vodi v aktivacijo že opisanih signalnih poti, ki vodijo v sproščanje pro-vnetnih molekul (18).

Sepsa, kljub zmanjšanju smrtnosti v zadnjem desetletju, ostaja deseti najpogostejši razlog smrti v zahodnih državah in eden izmed najpogostejših vzrokov smrti v intenzivnih enotah (19). Po definiciji, ki jo je podal ACCP/SCCM, je sepsa zgodnji sindrom, ki lahko napreduje v patološko stanje, ki se manifestira s hipotenzijo in hipoperfuzijo, znano kot septični šok (17). Poglavitna težava pri sepsi je, da se ob okužbi krvi z bakterijo sproži premočen in s protivnetnimi mehanizmi neustrezno uravnovešen sistemski vnetni citokinski odziv, ki lahko vodi tudi v smrt (17, 19, 20). Če bi znali uravnovesiti ali omiliti ta citokinski odziv, bi se izboljšala tudi prognoza sepse.

Zmanjšanje morbidnosti in smrtnosti pri pacientih s hudo sepsa in v septičnem šoku lahko dosežemo na več načinov: a) nevtralizacija LPS, b) blokiranje intracelularnega signaliziranja in sinteze citokinov in drugih celičnih mediatorjev, c) zaviranje sproščanja citokinov in celičnih mediatorjev, d) blokiranje TNF- α in IL-1 receptorjev in e) preprečevanje patofizioloških dogodkov, kot sta sindrom dihalne stiske in diseminirana intravaskularna koagulacija (17).

Blokiranje signaliziranja in sinteze citokinov poteka na več ravneh:

1. Zaviranje TLR4, MD-2, CD 14, LBP, kompleksa TLR4-MD-2
2. Zaviranje adaptorskih proteinov (TRAM, TRIF, TIRAP, MyD88)
3. Negativna regulacija signalirajočih molekul (TRAF 3, TRAF 6, IRAK 1, ...)
4. Zaviranje transkripcijskih faktorjev (13)

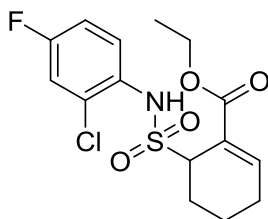
V nadaljevanju se bomo osredotočili le na zaviranje TLR4, MD-2, in kompleksa TLR4-MD-2.

- *Protitelesa usmerjena proti TLR4*

NI-0101, proizvajalca Novimmune SA je prvo humanizirano monoklonsko protitelo usmerjeno proti TLR4, ki ga razvijajo za zdravljenje revmatoidnega artritisa. To protitelo zavira dimerizacijo TLR4 in signaliziranje, ki ga sproži LPS ter endogeni in kemični ligandi. Leta 2014 so zaključili s prvo fazo kliničnih testiranj, v katerih se je protitelo izkazalo kot zelo uspešno, saj je v primerjavi s placebom preprečilo vse klinične in laboratorijske znake, ki jih sproži LPS po vezavi na receptor. Prav tako se je protitelo izkazalo za varno. (21, 22).

- *Učinkovine, ki se vežejo direktno na TLR4 ALI MD-2*

Resatorvid ali TAK-242, cikloheksenski derivat, so najprej odkrili kot zaviralca produkcije NO in citokinov iz mišjih makrofagov stimuliranih z LPS in med endotoksičnim šokom pri miših. V kasnejših študijah so ugotovili, da zavira intracelularno signaliziranje z zmanjšano fosforilacijo MAP-kinaz in I κ B degradacijo. TAK-242 se veže na cistein 747 v intracelularni domeni TLR4 in tako prepreči njegovo interakcijo z adaptorskimi molekulami. Pri morskih prašičkih, ki so bili izpostavljeni LPS so ugotovili signifikantno izboljšanje simptomov septičnega šoka, zmanjšanje sistemskega nivoja HMGB1 in povečano preživetje. Sledila je tudi študija na ljudeh, vendar je bila prekinjena zaradi premajhne učinkovitosti (12, 19, 20).



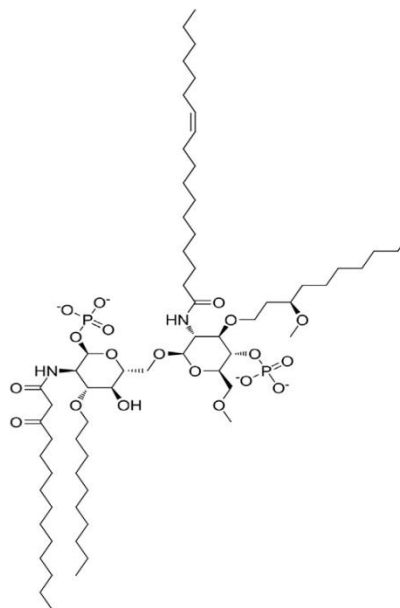
Slika 2: Strukturna formula TAK-242; povzeto po (23)

- *Analogi lipida A*

Analogi lipida A tekmujejo z lipidom A iz lipopolisaharida za njegovo vezavno mesto v hidrofobnem žepu MD-2, ki je del kompleksa TLR4-MD-2. Lahko gre za agoniste ali antagoniste. Razlike med njimi se kažejo v razliki med številom, dolžino, simetrijo in nasičenjem maščobnih kislin (18, 24). Antagonisti onemogočijo dimerizacijo dveh TLR4-MD-2 kompleksov in tako preprečijo aktivacijo signalnih poti. Poznamo več antagonistov in sicer lipid IVa, ki je biosintetični prekurzor lipida A v *E. coli* in nepatogen lipid A iz *R.*

sphaeroides, ki je služil kot izhodišče za sintezo učinkovine Eritoran (E5564) za zdravljenje sepse (25).

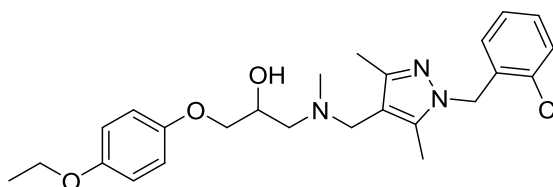
E5564 ali Eritoran je sintetični analog lipida A iz *R. sphaeroides*, antagonist LPS druge generacije. Eritoran blokira produkcijo citokinov, spodbujeno s strani LPS, *in vitro* in v eksperimentalnih živalskih modelih. V prvi fazi kliničnih testiranj je Eritoran blokiral produkcijo provnetnih citokinov in zmanjšal simptome sepse, kot so vročina, mrzlica, tahikardija in glavobol. Prišlo je tudi do signifikantnega znižanja nivoja C-reaktivnega proteina in števila belih krvnih celic. V drugi fazi se je pokazal trend zmanjševanja smrtnosti. Po končani tretji fazi pa so ugotovili, da ni dovolj učinkovit in tako končali s testiranjem (19, 20).



Slika 3: Strukturni prikaz Eritorana, povzeto po (23)

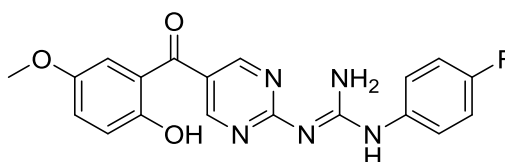
- *Učinkovine, ki inhibirajo nastanek kompleksa TLR4-MD-2*

S pomočjo virtualnega rešetanja so raziskovalci odkrili β -amino alkohole, ki motijo nastanek kompleksa med TLR4 in MD-2. β -amino alkoholi naj bi tekmovali z MD-2 za vezavno mesto na TLR4. Te spojine so bile učinkovite pri zaviranju aktivacije transkripcijskega faktorja NF- κ B v celicah HEK293, z dodatno izraženim TLR4, in pri zaviranju z LPS inducirane vnetne odgovora v makrofagih in v polni človeški krvi v *ex-vivo* modelih. Kljub obetavnim rezultatom pa je najbolj aktivna izmed spojin (spojina A) izkazovala signifikantno citotoksičnost za HEK293 celice (23, 26).



Slika 4: Strukturna formula spojine A (povzeto po 23)

Na Fakulteti za farmacijo so se zaradi še vedno velike potrebe po identifikaciji TLR4 antagonistov, ki bi bili učinkovita zdravila za zdravljenje bolezni kot sta npr. sepsa in nevropatska bolečina, lotili njihovega iskanja. S pomočjo virtualnega rešetanja so prišli do 18 potencialnih učinkovin, od katerih so jih 14 testirali za antagonistično delovanje na TLR4. Le tri od 14 so izkazovale dobro antagonistično aktivnost. Najboljši antagonist je bila spojina **B**, **1-(4-fluorofenil)-2-(5-(2-hidroksi-5-metoksibenzoil)pirimidin-2-il)gvanidin** z vrednostjo IC_{50} 16,6 μ M. Motila naj bi nastanek kompleksa TLR4-MD-2, in sicer, naj bi se vezala na vezavno mesto za MD-2 na TLR4. Njena neposredna vezava na TLR4 je bila dokazana s pomočjo površinske plazmonske resonance (SPR). Sekretijo TNF- α iz človeških PBMC je pri koncentraciji 100 μ M zmanjšala za 12,6 % (23).



Slika 5: Strukturna formula spojine **B** (povzeto po 23)

3.2 TLR7

TLR7 spada v skupino intracelularnih TLR. Gre za integralni membranski glikoprotein tipa 1, ki se nahaja na membranah intracelularnih veziklov - endoplazemskega retikuluma, endosomov, lizosomov in endolizosomov - monocitov, makrofagov, dendritičnih celic in celic B (8, 14). Prepozna enoverižno RNA (ssRNA) virusov kot so virus HIV, virus influence in VSV. Natančneje, TLR7 prepozna z gvanozinom in uridinom bogate ssRNA, zato so sintetični poliuridini potencialni ligandi. Od sintetičnih molekul prepozna imidazokinolinske derivate, kot sta resikvimod (R848) in imikvimod in gvaninske analoge, kot je loksoribin. Poleg naštetega prepozna tudi nekatere siRNA in *Borrelia burgdoferi*. Prav tako je TLR7 odgovoren za prepoznavo lastnih ribonukleoproteinskih kompleksov, kar lahko ima patološke posledice (27). Lokacija znotraj intracelularnih veziklov omogoča TLR7 prepoznavanje virusnih nukleinskih kislin, ki se v vezikle prenesejo s pomočjo endocitoze, fagocitoze ali pinocitoze. Na ta način je preprečen kontakt z lastnimi nukleinskimi kislinami, kar bi lahko vodilo v pojav avtoimunskih bolezni (8, 27).

Aktivacija receptorja poteče samo v določeni stopnji zrelosti endosoma in ob njegovi acidifikaciji (27). Po vezavi TLR7 z ligandom se sproži od MyD88 odvisna pot, ki vodi v

aktivacijo transkripcijskih faktorjev NF- κ B, AP-1 in IRF. Pri tem pride do nastanka in sproščanja proinflammatory citokinov, kot so TNF- α , IL-6 in IL-12. To se zgodi, ko pride do vezave liganda na receptor v makrofagih, B celicah, cDC in pDC. V pDC pa poleg opisane poti obstaja še ena, prav tako od MyD88-odvisna pot, ki vodi v aktivacijo transkripcijskega faktorja IRF7 in posledično sproščanja ogromnih količin IFN tipa 1 (IFN- α in IFN- β), ki igra zelo pomembno vlogo pri antivirusni zaščiti (8, 9, 27).

3.2.1. BOLEZNI, POVEZANE S TLR7

Receptor TLR7 lahko povežemo s številnimi boleznimi. Vpleten je v nastanek avtoimunskih bolezni kot je npr. sistemski lupus eritematosus. Z agonističnim delovanjem nanj lahko vplivamo na potek astme, nekaterih rakavih bolezni npr. bazalnega celičnega karcinoma in zdravimo virusne bolezni, ki jih povzročajo virusi influence, HCV, VSV, SeV, HIV-1 in drugi ssRNA vsebujoči virusi (28-31).

- *Astma*

Astma je bolezen, za katero je značilna povratna zožitev dihalnih poti, kronično vnetje dihalnih poti in povečana nespecifična odzivnost dihalnih poti na različne dejavnike. Kronično vodi v remodelacijo dihalnih poti. Največkrat imamo opraviti z alergijsko astmo, katere vzor tiči v prekomerno pridobljenem Th2 imunskem odzivu v pljučih.

Receptor TLR7 se nahaja v bronhialnih epitelijskih celicah, gladkih mišicah dihalnih poti, pljučnih pCD, NKT, limfocitih B in eozinofilcih. Aktivacija TLR7 sproži aktivacijo prirojenega imunskega sistema in favorizira Th1 celični odziv. Agonisti TLR7 preprečijo eozinofilno vnetje dihalnih poti, zmanjšajo produkcijo IgE, zmanjšajo količino Th2 celic in povečajo količino Th1 celic, posledično se poveča količina citokinov, ki jih te celice sproščajo. Zmanjša se hiperodzivnost dihalnih poti in preprečeno je njihovo preoblikovanje. Prav tako aktivacija TLR7 zavira virusno replikacijo v pljučih in prepreči z virusi povzročeno hiperodzivnost dihalnih poti. Dokazali so tudi, da pride po stimulaciji TLR7 do relaksacije gladkih mišic v steni dihalnih poti in posledično širitve dihalni poti, kar je posledica hitre produkcije NO, ki kaže na to, da TLR7 deluje še prek nove, do sedaj neodkrite poti. Opisane rezultate so dosegli na živalskih modelih (28, 29).

- *Rak*

Končni cilj imunoterapije raka je odstranitev tumorskih celic s strani imunskega sistema. Obe veji imunskega sistema lahko prispevata k odstranitvi tumorskih celic, pri čemer imajo glavno vlogo naravne celice ubijalke in limfociti T.

Glavni mehanizem protitumornega delovanja agonistov TLR7/8 je stimulacija receptorja na DC, celicah B, makrofagih, monocitih, celicah T in NK celicah, kar vodi v nastajanje proinflamatornih citokinov in kemokinov. Našteto ima za posledico močan Th1 voden protitumorni celični imunski odgovor in zmožnost DC, da delujejo kot citotoksične celice. Sami agonisti delujejo tudi kot zaviralci angiogeneze, inducirajo apoptozo tumorskih celic, zavirajo njihovo rast, povečajo njihovo imunogenost in povečajo njihovo občutljivost na kemoterapijo in citotoksične limfocite T.

Po drugi strani pa lahko aktivacija TLR7/8 s strani agonistov spodbudi proliferacijo, invazivnost in preživetje tumorskih celic, kar je odvisno predvsem od vrste tumorja, zato je potrebna velika previdnost pri njihovi uporabi. TLR7/8 agonisti veliko obetajo tudi kot adjuvansi pri cepivih proti raku (32, 33).

- *Sistemski lupus eritematozus*

Sistemski lupus eritematozus je kronična avtoimunska bolezen, za katero je značilna izguba tolerance do lastnih jedrnih antigenov. Gre za poligensko bolezen, na katero močno vplivajo spol, rasa in okoljski dejavniki. Trenutno se za zdravljenje uporabljajo NSAID, glukokortikoidi, hidrosiklorokini in imunosupresivi, ki pa poleg zmerne učinkovitosti prinašajo tudi resne neželene učinke. Posledično je potreba po drugih učinkovinah, s katerimi bi dosegli boljšo učinkovitost in manj neželenih učinkov, velika (31).

Za SLE je značilen nastanek imunskih kompleksov, sestavljenih iz lastnih nukleinskih kislin (DNA/RNA) in avtoprotiteles, posledica česar je škodljiva aktivacija endosomalnih TLR receptorjev v odsotnosti tujih molekul. Imunski kompleksi aktivirajo TLR7 in 9 na limfocitih B, cDC, pDC, makrofagih in neutrofilcih. Po aktivaciji limfociti B tvorijo avtoprotitelesa, cDC sproščajo citokine, neutrofilci NET in pDC IFN- α . K nastanku protijedrnih protiteles prispeva tudi slabše odstranjevanje apoptotičnih celic pri pacientih s SLE. Poleg avtoprotiteles so za SLE značilni tudi povišani nivoji IFN- α in povečana ekspresija genov reguliranih z IFN- α . IFN- α igra centralno in glavno vlogo, saj njegov serumski nivo korelira z aktivnostjo bolezni, njeno progresivnostjo in klinično

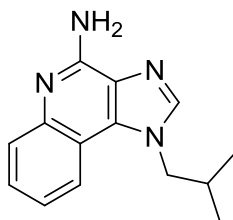
manifestacijo. V bistvu pride do kronične aktivacije IFN tipa 1, ki vodi v kronično vnetje in poškodbo organov. Da bi zavrla produkcijo IFN- α in aktivacijo avtoimunskih celic B raziskovalci razvijajo učinkovine, ki bi z vezavo na TLR7 in 9 preprečile njihovo aktivacijo (30, 31).

3.2.2. SPOJINE Z AGONISTIČNIM IN ANTAGONISTIČNIM DELOVANJEM NA TLR7

Poleg receptorja TLR7, na katerega lahko delujemo z agonisti oz. antagonisti, ki so opisani v nadaljevanju, terapevtsko tarčo predstavljajo tudi proteini, vključeni v signalno pot (npr. MyD88, TRAF6, IRAK1, IRAK4,...) in končni produkti, ki nastanejo pri signaliziranju preko TLR7, kot je IFN- α , na katerega lahko delujemo z monoklonskimi protitelesi. Lahko pa aktiviramo tudi naravne inhibitorne molekule (30).

- *Imidazolkinolinski derivati*

Imidazokinolinski amini, kot sta imikvimod in resikvimod, odkriti v osemdesetih letih prejšnjega stoletja, so sedaj znani kot prvi nizkomolekularni modulatorji imunskega odziva, ki delujejo na TLR receptorje. Gre za agonistično delovanje, pri čemer pride do sproščanja provnetnih in regulatornih citokinov, kar vodi v protivirusni in protitumorni odgovor imikvimoda. Poleg delovanja na TLR7 in TLR8 pa imikvimod deluje še na signalne poti adenozijskega receptorja. FDA je leta 1997 odobril zdravilo Aldara[®] z zdravilno učinkovino imikvimod za lokalno zdravljenje zunanjih bradavic na spolovilu in v okolici zadnjične odprtine, ki so posledica okužbe s papiloma virusom, aktične keratoze in karcinomov bazalnih celic. To zdravilo se uporablja še danes. Resikvimod so začeli razvijati kot zdravilno učinkovino druge generacije, vendar so njen razvoj ustavili (34, 35, 36).



Slika 6: Strukturna formula imikvimoda, povzeto po (36)

- **GSK 2245035**

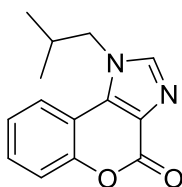
GSK 2245035 je visoko selektiven TLR7 agonist, ki preferenčno inducira nastajanje IFN- α in ne TNF- α . Znano je, da aktivacija receptorja TLR7 vodi v nastajanje proinflammatory citokinov, ki premaknejo imunski odgovor v smer Th1 celičnega odziva in posledično se zmanjša Th2 celični odziv. Na podlagi tega predvidevajo, da intranazalna aplikacija GSK 2245035 povzroči imunske spremembe v zgornjih dihalnih poteh, ki lahko spremenijo imunski odziv na alergene v zraku in tako prispevajo k zmanjšanju alergijskega odziva pri osebah z respiratornimi alergijami. Po uspešni prvi fazi kliničnih testiranj so avgusta 2014 uspešno zaključili tudi z drugo fazo kliničnih testiranj (37-40).

- **IMO-8400**

IMO-8400 je sintezni oligonukleotidni antagonist endosomalnih receptorjev TLR7, 8 in 9, druge generacije. IMO-8400 blokira aktivacijo imunskega sistema prek omenjenih receptorjev. Učinkovina je uspešno prestala prvo fazo kliničnih testiranj. Marca 2014 so zaključili z drugo fazo kliničnih testiranj pri pacientih s psoriazo, kjer se je IMO-8400 izkazala za varno in učinkovito zdravilo brez resnih neželenih učinkov (41-43). Trenutno poteka druga faza kliničnih testiranj pri pacientih z rakom limfocitov B: difuzni velikocelični B limfom in Waldenstromova makroglobulinemija (43-45).

- **1-izobutilkromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-on**

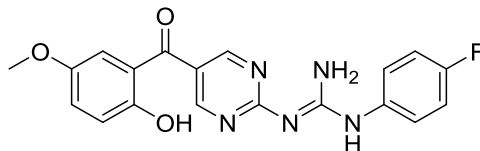
Na Fakulteti za Farmacijo so s pomočjo virtualnega rešetanja na osnovi liganda odkrili nove antagoniste receptorja TLR7. Od 25 najboljših zadetkov je bilo 11 spojin takšnih, ki so bile topne v celičnem mediju in niso izkazovale citotoksičnosti na hTLR7-HEK293 celicah. Med temi 11 spojinami je 1-izobutilkromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-on pokazal najmočnejšo antagonistično delovanje. Njegova vrednost IC₅₀ je znašala 23 μ M (46).



Slika 7: Strukturna formula 1-izobutilkromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-ona, povzeto po (46)

NAMEN DELA

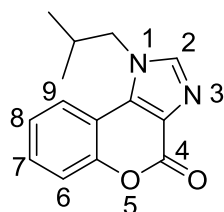
1. Primerjali in vrednotili bomo različne sintezne postopke za sintezo analogov znane strukture antagonista TLR-4 receptorja-spojine **B**.



Slika 8: Spojina **B**, povzeto po (23)

Sintezne postopke bomo primerjali glede na izkoristek, zahtevnost izolacije, porabo topil in časovno komponento. Opazovali bomo tudi vpliv položaja in narave substituenta na benzoilnem delu molekule na potek in izkoristek reakcije.

2. Sintetizirali bomo dimetoksi derivat spojine **B**, saj menimo, da bi dve metoksi skupini povečali jakost delovanja. Nato bomo sintetiziranemu derivatu določili topnost v celičnem mediju, njegovo citotoksičnost in potencialno antagonistično delovanje na TLR4.
3. Sintetizirali bomo derivat spojine 1-izobutilkromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-ona z bazičnim centrom, in sicer z dietilamino skupino na mestu sedem.



Slika 9: Strukturna formula 1-izobutilkromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-ona, povzeto po (27)

Sintetizirani spojini bomo določili topnost v celičnem mediju, ovrednotili njeno potencialno citotoksičnost na celični liniji HEK293 in ji določili tudi potencialno agonistično oz. antagonistično delovanje na TLR7.

MATERIALI IN METODE

1. MATERIALI

Pri delu smo uporabljali reagente in topila različnih proizvajalcev.

Uporabljeni reagenti so bili: 2-hidroksi-4,5-dimetoksiacetofenon (>98%, TCI, H1206), oksalil klorid ($\geq 99\%$, Aldrich, 221015), Na_2SO_4 ($\geq 99,0\%$, Alkaloid), bis(triklorometil)karbonat (>98%, TCI, T1467), NaHCO_3 (99,5-100,5%, Merck, 172577), cianogvanidin ($\geq 95\%$, Fluka, 41924), KOH (p.a., Kemika, 1158806), brezvodna očetna kislina (100%, Merck, 100066), 4-fluoroanilin (98%, Acros, 119290250), TMSCl ($\geq 99,0\%$, Fluka), etil 2-izocianoacetat (>98%, Acros, 118280010), 2-metilpropan-1-amin (99%, Aldrich, I14150), 2-hidroksi-1-naftaldehid ($\geq 98,0\%$, Aldrich, H45353), CuI (99,995%, Acros, 194902500), piridin ($\geq 99,0\%$, Sigma Aldrich, 437611), 4-(dietilamino)salicilaldehid (>98,0%, TCI, D1752), konc. HCl (Merck, 37%, 100317), 1-acetil-2-naftol (99%, Alfa aesar, A18537), 2-hidroksi-4-metoksiacetofenon (99%, Sigma Aldrich, H35803), 2-hidroksiacetofenon (99%, Acros, 120930050), 2-hidroksi-5-metoksiacetofenon (99%, Sigma Aldrich, 114995) in 2-hidroksi-6-metoksiacetofenon (97%, Sigma Aldrich, 303046).

Topila, ki smo jih uporabljali pri sintezi in čiščenju: THF (sveže predestiliran, $\geq 99,9\%$, Merck, 1081071000), DMF (99,8%, Acros, 423645000), heksan (95%, Panreac, 163242), EtOAc (Carlo Erba, 341503), DKM ($\geq 99,8\%$, Merck, 1060502500), 1,2-dikloroetan ($\geq 99,5\%$, Merck, 109551000), EtOH (Carlo Erba, 3086022), eter (99,0%, Acros, 615080010), petroleter (Merck, 1017691000), acetonitril (99,9%, Acros, 364315000), izopropanol ($\geq 99,5\%$, Merck, 8187661000), MeOH (Carlo Erba, 309201), aceton (99,8%, Acros, 326800010).

Priprava raztopin:

1 M HCl : V 1L merilno bučko smo odmerili 100 ml prečiščene vode, dodali 82,81 ml koncentrirane HCl (37%, Merck) in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.

3 M NaOH : V 1L merilno bučko smo odmerili 500 ml prečiščene vode, dodali 120 g trdnega NaOH in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.

70% H_2SO_4 : V 100 ml merilno bučko smo odmerili 25 ml prečiščene vode, dodali 63,6 ml 96,5% H_2SO_4 in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.

Ostala laboratorijska oprema :

- Laboratorijska tehnica Mettler toledo PB403-S,
- grelna pištola Skil 8000,
- rotavapor Buchi waterbath B-480,
- magnetno mešalo IKA RTC basic,
- UV-svetilka Lamag cabinet II.

2. METODE

Kromatografske metode

- Tankoplastna kromatografija (TPK)

Za izvedbo TPK smo uporabili plošče Silikagel 60 F254 proizvajalca Merck z 0,2 mm nanosom silikagela na aluminijskem nosilcu, ki mu je bil dodan fluorescenčni indikator. Uporabili smo različne mobilne faze, ki so opisane pri posameznih sintezah. Za detekcijo spojin na kromatografski ploščici smo uporabljali UV svetlobo valovne dolžine 254 nm ali 366 nm.

- Kolonska kromatografija

Pri čiščenju spojin s »flash« kolonsko kromatografijo, smo za stacionarno fazo uporabili Silikagel 60 z velikostjo delcev 0,040-0,063 mm, proizvajalca Merck. Mobilne faze so se razlikovale in so navedene pri posameznih sintezah.

- Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Za določevanje čistosti spojin smo uporabili reverzno-fazno HPLC analizo na sistemu Agilent 1100 opremljenem s kvarterno črpalko in detektorjem večih valovnih dolžin. Uporabljena kolona Agilent Eclipse Plus C18 je 5 μ m (4,6 x 150 mm) kolona s pretokom 1.0 mL/min in detekcijo pri valovni dolžini 254 nm. Za elucijo smo uporabili topilo A (0,1 % trifluorocetna kislina v vodi) in B (acetonitril) in sledeči gradient: 0-15 minut 20 % B → 80 % B v A, med 15-17,5 minut 80 % B v A, 17,5-18 minut 80 % B → 20 % B v A ter 18-22 minut 20 % B v A. Kolona je bila ves čas termostatisirana pri 25°C. Določena relativna čistoča vseh testiranih spojin je presegala zahtevanih 95,0 %.

Spektroskopske metode

- Jedrska magnetna resonanca

^1H -NMR in ^{13}C -NMR spektre smo posneli na Bruker Avance III 400 MHz spektrometru na Fakulteti za farmacijo. Za snemanja smo uporabili devterirana topila: aceton, CDCl_3 in DMSO- d_6 . Za interni standard je služil tetrametilsilan (TMS). Kemijske premike smo podali v »parts per million« (ppm) in sklopitvene konstante (J) v hertzih (Hz). Spektre smo analizirali z računalniškim programom MestReNova 8.1 proizvajalca Mestrelab Research S.L. V posnetih spektrih smo dobili več različnih vrst signalov: razširjen singlet (bs), dublet (d), dublet dubleta (dd), dublet dublet dubleta (ddd), dublet dublet tripleta (ddt), multiplet (m), singlet (s), triplet (t) in kvartet (q).

- Masna spektroskopija

Masni spektri spojin so bili posneti na masnem spektrometru Q-TOF Premier, proizvajalca Micromass z ESI in HR-MS tehniko, v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani.

Določanje temperatura tališča

Temperature tališč smo določali z Kofflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico proizvajalca Leica in so nekorrigirane.

Mikrovalovni reaktor

Za izvedbo nekaterih reakcij smo uporabili mikrovalovni reaktor CEM Discover z IR in optičnim načinom merjenja temperature.

Risanje in poimenovanje struktur spojin

Za risanje in poimenovanje struktur spojin ter za risanje slik in shem reakcij smo uporabili računalniški program ChemDraw Ultra 13.0 proizvajalca CambridgeSoft.

Biološko testiranje

1. Spojine s potencialnim delovanjem na receptor TLR4

In vitro testiranja so bila opravljena na Zavodu za transfuzijsko medicino v Ljubljani s strani doc. dr. Urbana Švajgerja, mag. farm. Najprej smo določili topnost in sicer tako, da smo 25 mM raztopino naše spojine v DMSO dodali k celičnemu mediju in opazovali, ali so prisotni precipitati spojine. Temu je sledilo določanje citotoksičnosti spojine na celični liniji HEK 293 (Invivogen), pri tem je DMSO služil kot negativna kontrola. Za testiranje antagonističnega delovanja smo uporabili celično linijo HEK-Blue™-hTLR4 (Invivogen), ki selektivno izraža TLR4 in aktivira reporterski gen (alkalna fosfataza) preko TLR4 agonistov. Kot negativna kontrola je služil LPS (Sigma-Aldrich), kot pozitivna pa komercialno dostopni TLR4 antagonist TAK-242 (Invivogen). Vrednosti IC_{50} smo izračunali glede na upad izmerjene absorbance kot posledica zaviranja izražanja alkalne fosfataze.

2. Spojine s potencialnim delovanjem na receptor TLR7

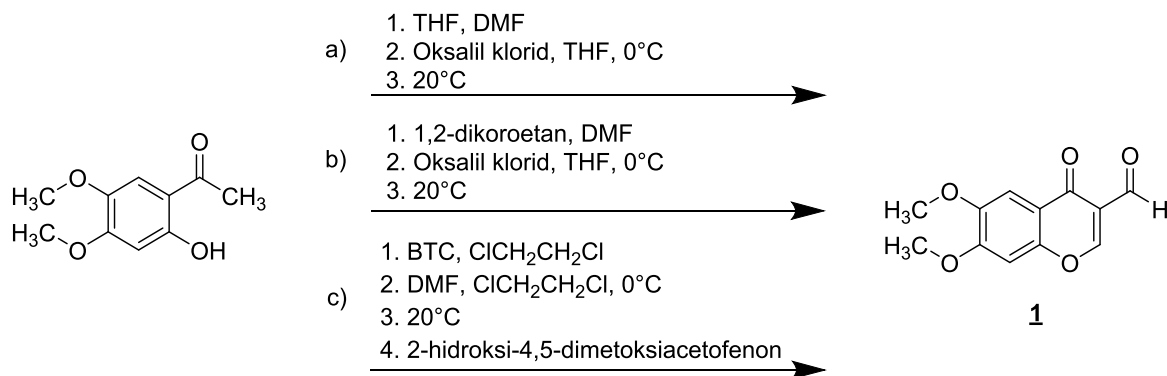
In vitro testiranja so bila opravljena na Zavodu za transfuzijsko medicino v Ljubljani s strani diplomantke Urške Jug pod mentorstvom doc. dr. Urbana Švajgerja, mag. farm. Najprej smo določili topnost in sicer tako, da smo 50 mM raztopino naše spojine v DMSO dodali k celičnemu mediju in opazovali, ali so prisotni precipitati spojine. Temu je sledilo določanje citotoksičnosti spojine na transgenih celicah HEK-Blue™ hTLR7 (Invivogen), ki izražajo humani TLR7 in reporterski gen za alkalno fosfatazo pod nadzorom interferonskega promotorja, DMSO pa je služil kot negativna kontrola. Enako celično linijo smo uporabili tudi za testiranje agonističnega in antagonističnega delovanja. Pri testiranju agonističnega delovanja je kot pozitivna kontrola služil imikvimod (Invivogen), kot negativna kontrola pa DMSO. Pri testiranju antagonističnega delovanja pa je kot pozitivna kontrola služil DMSO, kot negativna kontrola pa imikvimod (Invivogen). Vrednosti IC_{50} oz. EC_{50} smo izračunali glede na porast oz. upad izmerjene absorbance kot posledice aktivacije oz. zaviranja izražanja alkalne fosfataze.

EKSPERIMENTALNI DEL

1. Sinteza spojine 3

1. stopnja: sinteza spojine 1

Spojino 1 smo sintetizirali po treh različnih postopkih.



Slika 10: Reakcijska shema sinteze spojine 1

Sinteza po postopku (a)

V suho bučko prepihano z argonom smo zatehtali 2-hidroksi-4,5-dimetoksiacetofenon (1,295 g; 6,60 mmol), ga raztopili v brezvodnem THF (25 ml) in dodali DMF (5 ml). Dobro premešano zmes smo ohladili na 0 °C na ledeni kopeli, in nato smo med mešanjem, po kapljicah začeli dodajati oksalil klorid (3,1 ml; 36,6 mmol), raztopljen v brezvodnem THF (10 ml). Po dodatku celotnega oksalil klorida smo reakcijsko zmes pustili na ledeni kopeli še 15 min in nato mešali še 12 ur pri sobni temperaturi. Celoten postopek smo izvedli v argonovi atmosferi. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes zlili v zmes zdrobljenega ledu in vode. Nato smo izvedli ekstrakcijo z diklorometanom (3x50 ml). Združene organske faze smo nato sprali z nasičeno raztopino NaCl (50 ml), sušili z Na₂SO₄ in filtrirali. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom in dobili oljnat zaostanek. Sledilo je čiščenje s kolonsko kromatografijo (začeli smo s heksan:EtOAc=2:1, nato heksan:EtOAc=1:1 in končali smo s heksan:EtOAc=1:2).

Sinteza po postopku (b)

V suho z argonom prepihano bučko smo zatehtali 2-hidroksi-4,5-dimetoksiacetofenon (0,589 g; 3,0 mmol), ga raztopili v brezvodnem 1,2-dikloroetanu (15 ml), ter dodali DMF (1,623 ml). Dobro premešano zmes smo ohladili na 0 °C na ledeni kopeli, in nato smo med mešanjem, po kapljicah začeli dodajati oksalil klorid (1,33 ml; 15,7 mmol) raztopljen v

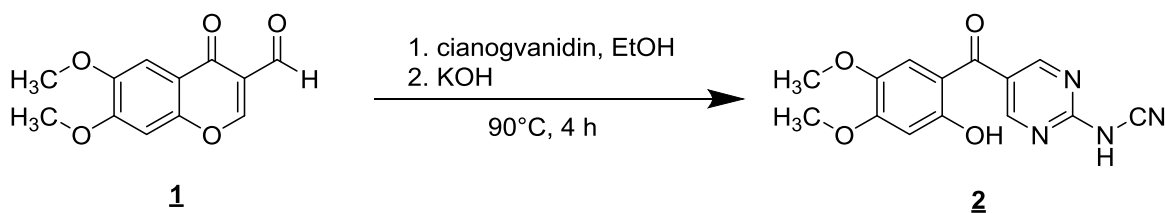
brezvodnem THF (10 ml). Po dodatku celotnega oksalil klorida smo reakcijsko zmes pustili na ledeni kopeli še 15 min in nato mešali še 12 ur pri sobni temperaturi. Celoten postopek smo izvedli v argonovi atmosferi. Reakcijsko zmes smo nato zlili na mešanico ledu in vode ter naredili ekstrakcijo z DKM (3x50 ml) Združene organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl (50 ml), sušili z Na₂SO₄ in filtrirali. Dobljeni produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (EtOAc:heksan=1:1).

Sinteza po postopku (c)

V suho bučko (prežarjeno in prepihano z argonom) smo zatehtali bis(triklorometil)karbonat (BTC ali trifosgen; 7,85 mmol; 2,33 g) ga raztopili v ClCH₂CH₂Cl (23,3 ml), nato pa to raztopino kapljali v zmes topil DMF/ClCH₂CH₂Cl (11,5 ml/3,6 ml) na ledeni kopeli. Po končanem dodatku smo reakcijsko zmes mešali še 20 minut pri 0 °C in nato ledeno kopel odstranili. Pustili smo, da se je reakcijska zmes segrela na sobno temperaturo in pri sobni temperaturi mešali še pol ure, da je nastal Vilsmeierjev reagent. 2-hidroksi-4,5-dimetoksiacetofenon (1,373 g; 7,0 mmol) smo raztopili v dikloroetanu (11,5 ml) in ga dodali mešanici pri 0-5 °C, nastalo zmes smo nato počasi segreli na sobno temperaturo in pustili mešati 12 ur. Nato smo reakcijsko zmes zlili na mešanico ledu in vode ter mešali pol ure. Sledila je ekstrakcija z DKM (3x25 ml). Združene organske faze smo sprali z 10% NaHCO₃ (2x25 ml) in nasičeno raztopino NaCl (3x25 ml). Sledilo je čiščenje s kolonsko kromatografijo (začeli smo z EtOAc:heksan=2:1 in nato EtOAc:heksan=9:1).

IUPAC ime	6,7-dimetoksi-4-okso-4 <i>H</i> -kromen-3-karbaldehid
M	234,21 g/mol
Izgled	Svetlo rjava amorfna snov
Izkoristek reakcije	Postopek (a): 19 % Postopek (b): 14 % Postopek (c): 8 %
MF	EtOAc:heksan=2:1
R _f	0,50
T _{tal}	226-228 °C (v literaturi (59): 226-226,5 °C)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 4,00 (s, 6H, 2xOCH ₃); 6,93 (s, 1H, Ar-H); 7,60 (s, 1H, Ar-H); 8,49 (s, 1H, Ar-H); 10,40 (s, 1H, CHO)

2.stopnja: sinteza spojine 2

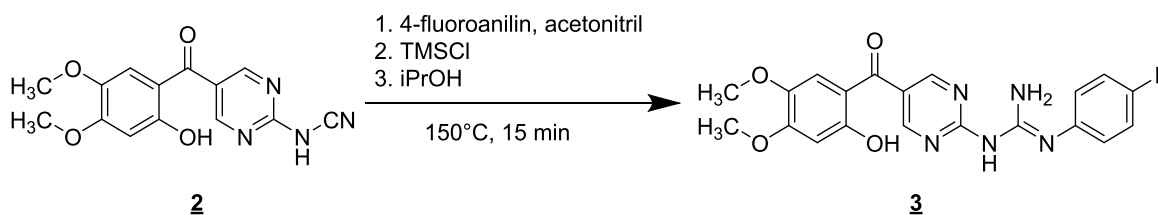


Slika 11: Reakcijska shema sinteze spojine 2

V suho bučko smo zatehtali produkt prve stopnje - spojino 1 (6,7-dimetoksi-4-okso-4H-kromen-3-karbaldehid; 0,280 g; 1,196 mmol) in cianogvanidin (0,15 g; 1,784 mmol), ju raztopili v brezvodnem etanolu (15 ml) ter dodali še zdrobljen KOH (0,200 g; 3,564 mmol). Zmes smo segrevali 4 ure pri 90 °C. Celoten postopek smo izvedli v argonovi atmosferi. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes zlili na mešanico ledu in vode in nakisali z ledocetom do pH=4-5. Ker nam produkt ni izpadel, smo ga ekstrahirali z diklorometanom (3x50 ml). Združene organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl (50 ml), sušili z Na₂SO₄ in filtrirali. Sledilo je čiščenje s kolonsko kromatografijo (heksan:EtOAc=1:2). Po kolonski kromatografiji smo produkt izoborili iz mešanice eter/petroleter.

IUPAC ime	<i>N</i> -(5-(2-hidroksi-4,5-dimetoksibenzoil)pirimidin-2-il)cianamid
M	300,27 g/mol
Izgled	Rumeni kristali
Izkoristek reakcije	28 %
MF	EtOAc:H=2:1
R _f	0,30
T _{tal}	209-212 °C
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ (ppm) = 3,71 (s, 3H, OCH ₃); 3,76 (s, 3H, OCH ₃); 6,60 (s, 2H, Ar-H); 8,76 (s, 2H, 2 x pirimidin-H); 10,00 (s, 1H, OH); 11,17 (s, 1H, NH)
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₄ H ₁₁ N ₄ O ₄ (m/z): 299,0780 [M-H] ⁻ Izmerjena vrednost (m/z): 299,0779

3.stopnja: sinteza spojine 3



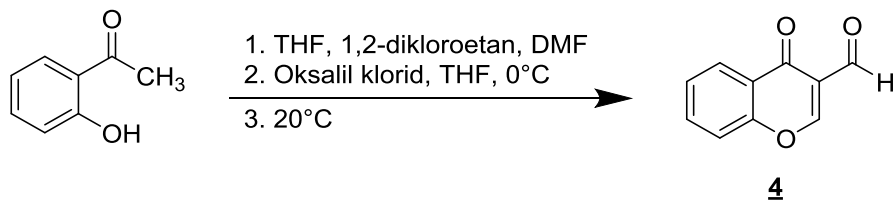
Slika 12: Reakcijska shema sinteze spojine 3

V suho vialo za mikrovalovni reaktor smo natehtali produkt druge stopnje - spojino 2 (0,100 mg; 0,33 mmol) in 4-fluoroanilin (0,067 ml; 0,698 mmol) ter ju raztopili v acetonitrilu (3 ml; 57,51 mmol). Nazadnje smo dodali TMSCl (0,067 ml; 0,524 mmol) in izvedli reakcijo v mikrovalovnem reaktorju (150 °C, 15 min). Reakcijo smo ustavili tako, da smo dodali izopropanol in nato segrevali v mikrovalovnem reaktorju še 30 sekund pri 125 °C. Po končani reakciji je sledilo čiščenje s kolonsko kromatografijo (EtOAc:MeOH=5:1), vendar ločba ni uspela. Zato smo večino frakcij ponovno združili in naalkalili z NaHCO₃ in dvakrat ekstrahirali. Združene organske faze smo nato sprali z nasičeno raztopino NaCl, sušili z Na₂SO₄ in filtrirali. Sledilo je še eno čiščenje s kromatografsko kolono (najprej EtOAc:MeOH=60:1 in postopno do EtOAc:MeOH=30:1). Na koncu smo produkt izoborili iz mešanice eter/petroleter.

IUPAC ime	2-(4-fluorofenil)-1-(5-(2-hidroksi-4,5-dimetoksibenzoil)pirimidin-2-il)gvanidin
M	411,39 g/mol
Izgled	Kristali temno rjave barve
Izkoristek reakcije	11 %
MF	EtOAc:MeOH=5:1
R _f	0,56
T _{tal}	136-139 °C
¹ H-NMR (400 MHz, acetone)	δ (ppm) = 2,89 (bs, 2xgvanidinski H in 1H od OH); 3,76 (s, 3H, OCH ₃); 3,96 (s, 3H, OCH ₃); 6,64 (s, 1H, Ar-H); 7,17 (s, 1H, Ar-H); 7,21 (t, J=8,8 Hz, 2H, Ar-H); 7,55-7,59 (m, 2H, Ar-H); 8,96 (s, 2H, Ar-H)
ESI-HRMS	Izračunano za C ₂₀ H ₁₉ N ₅ O ₄ F (m/z): 412,1421 [M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z): 412,1413
IR	3290, 3193, 3135, 3060, 1661, 1597, 1554, 1499, 1487, 1433, 1367, 1320, 1262, 1039, 1013, 906, 751, 692, 605 cm ⁻¹

2. Sinteza spojine 5

1.stopnja: sinteza spojine 4

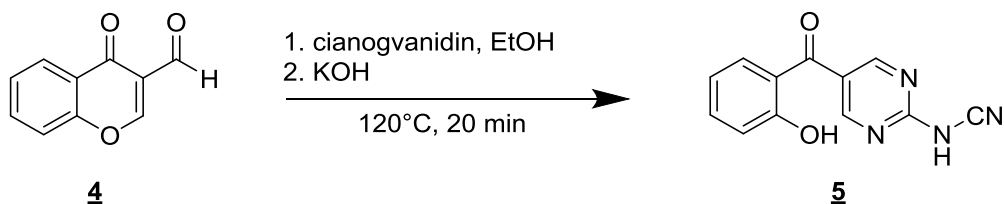


Slika 13: Reakcijska shema sinteze spojine 4

V suho bučko, prepihano z argonom smo natehtali 2-hidroksiacetofenon (0,361 ml; 3 mmol), ga raztopili v brezvodnem THF (10 ml) mu dodali brezvodni 1,2-dikloroetan (10 ml) in DMF (2 ml). Dobro premešano zmes smo ohladili na ledeni kopeli in nato smo v argonovi atmosferi, po kapljicah začeli dodajati oksalil klorid (1,623 ml; 19,16 mmol) raztopljen v brezvodnem THF (10 ml). Po dodatku celotnega oksalil klorida smo reakcijsko zmes pustili na ledeni kopeli še 15 min in nato mešali še 12 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes zlili na mešanico ledu in vode ter naredili ekstrakcijo z DKM (3x50 ml). Združene organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl (50 ml), sušili z Na₂SO₄ in filtrirali. Pri odparevanju topila so izpadli kristali, ki smo jih ločili s filtracijo z odsesavanjem. TPK analiza je pokazala, da je v matičnici še prisoten produkt, zato smo jo čez noč pustili pri sobni temperaturi in ponovno so izpadli kristali, ki smo jih ločili s filtracijo z odsesavanjem.

IUPAC ime	4-okso-4H-kromen-3-karbaldehid
M	174,15 g/mol
Izgled	Beli »kvadratni« kristali
Izkoristek reakcije	64 %
MF	EtOAc:heksan=2:1
R _f	0,78
T _{tal}	151°-154 °C (v literaturi (56): 154-155 °C)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ (ppm) = 7,59 (ddd, <i>J</i> = 8,1; 7,2; 1,1 Hz, 1H, Ar-H); 7,77 (dd, <i>J</i> = 8,5; 0,6 Hz; 1H, Ar-H); 7,90 (ddd, <i>J</i> = 8,8; 7,2; 1,7 Hz, 1H, Ar-H); 8,15 (ddd, <i>J</i> = 7,9; 1,7; 0,4 Hz, 1H, Ar-H); 8,94 (s, 1H, CH); 10,13 (s, 1H, CHO)

2. stopnja: sinteza spojine 5



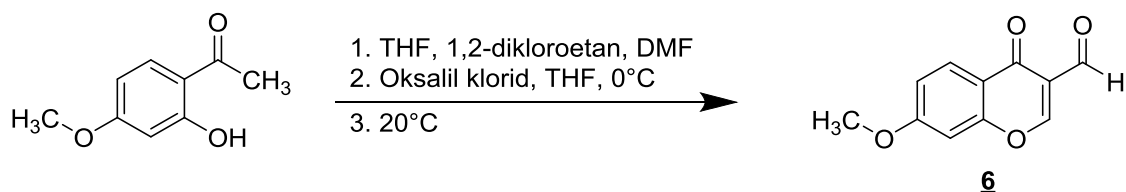
Slika 14: Reakcijska shema sinteze spojine 5

V suho vialo za mikrovalovni reaktor smo natehtali produkt prve stopnje - spojino 4 (0,139 g; 0,8 mmol) in cianogvanidin (0,102 g; 1,210 mmol), ju raztopili v brezvodnem etanolu (5 ml) ter dodali še zdrobljen KOH (0,128 g; 2,283 mmol). Zmes smo segrevali v mikrovalovnem reaktorju pri 120°C 20 minut. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes zlili v vodo in nakisali z ledocetom do pH=4. Izpadli so kristali produkta, ki smo jih izolirali s filtracijo z odsesavanjem.

IUPAC ime	<i>N</i> -(5-(2-hidroksibenzoil)pirimidin-2-il)cianamid
M	240,22 g/mol
Izgled	Rumeni kristali
Izkoristek reakcije	50 %
MF	EtOAc:MeOH=3:1
R _f	0,45
T _{tal}	203-205 °C (v literaturi (61): 207 °C)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ (ppm) = 6,97 (d, <i>J</i> = 2,1 Hz, 1H, Ar-H); 6,98 – 7,00 (m, 1H, Ar-H), 7,46 – 7,43 (m, 1H, Ar-H), 7,49 – 7,46 (m, 1H, Ar-H), 8,71 (s, 2H, Ar-H), 10,48 (bs, 1H, OH), 1H od NH je izmenjan

3. Sinteza spojine 7

1. stopnja: sinteza spojine 6

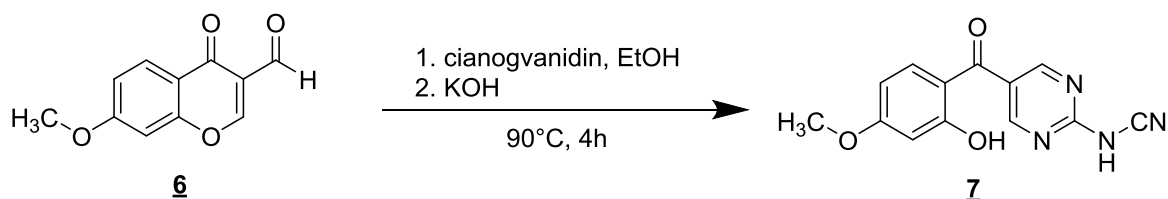


Slika 15: Reakcijska shema sinteze spojine 6

V suho bučko, preprihano z argonom, smo natehtali 2-hidroksi-4-metoksiacetofenon (0,499 g; 3 mmol) ga raztopili v brezvodnem THF (10 ml) mu dodali brezvodni 1,2-dikloroetan (10 ml) in DMF (2 ml). Dobro premešano zmes smo ohladili na ledeni kopeli in nato smo v argonovi atmosferi, po kapljicah začeli dodajati oksalil klorid (1,623 ml; 19,16 mmol) raztopljen v brezvodnem THF (10 ml). Po dodatku celotnega oksalil klorida smo reakcijsko zmes pustili na ledeni kopeli še 15 min in nato mešali še 12 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes zlili na mešanico ledu in vode ter naredili ekstrakcijo z DKM (3x50 ml). Združene organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl (50 ml), sušili z Na₂SO₄ in filtrirali. Produkt smo očistili s kromatografsko kolono (EtOAc:heksan=1:2).

IUPAC ime	7-metoksi-4-okso-4H-kromen-3-karbaldehid
M	204.18 g/mol
Izgled	Rumena amorfna snov
Izkoristek reakcije	18%
MF	EtOAc:heksan=1:2
R _f	0,28
T _{tal}	188-189 °C (v literaturi (56): 188 °C)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 3,93 (s, 3H, OCH ₃); 6,91 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 1H, Ar-H); 7,04 (dd, <i>J</i> ₁ = 8,8 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,0 Hz, 1H, Ar-H); 8,19 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 1H, Ar-H); 10,37 (s, 1H, CHO)
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₁ H ₉ O ₄ (m/z): 205,0501 [M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z): 205,0498

2. stopnja: sinteza spojine 7



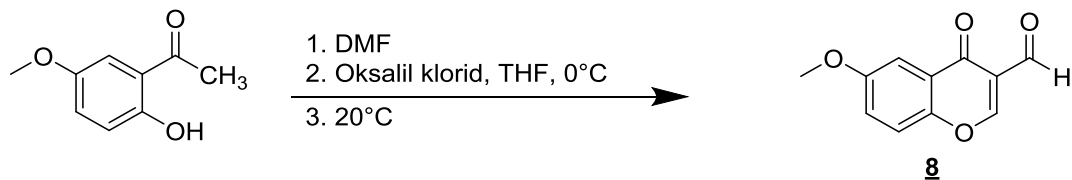
Slika 16: Reakcijska shema sinteze spojine 7

V suho bučko smo natehtali produkt prve stopnje - spojino **6** (7-metoksi-4-okso-4*H*-kromen-3-karbaldehid; 20 mg; 0,098 mmol), ga raztopili v brezvodnem etanolu (15 ml) in dodali cianogvanidin (0,0124 g; 0,147 mmol). Na koncu smo dodali še zdrobljen KOH (0,0157 g; 0,280 mmol). Zmes smo segrevali 4 ure pri 90 °C. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes zlili v vodo in nakisali z ledocetom do pH=5, odparili topilo pod znižanim tlakom in produkt očistili s kolonsko kromatografijo (začnemo z EtOAc:heksan=1:1, potem EtOAc in na koncu EtOAc:MeOH=3:1).

IUPAC ime	<i>N</i> -(5-(2-hidroksi-4-metoksibenzoil)pirimidin-2-il)cianamid
M	270,25 g/mol
Izgled	Rumeni kristali
Izkoristek reakcije	30%
MF	EtOAc
R _f	0,10
T _{tal}	> 300 °C
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ (ppm) = 3,81 (s, 3H, OCH ₃); 6,49-6,53 (m, 2H, Ar-H); 7,48 (d, <i>J</i> =8,8 Hz, 1H, Ar-H); 8,43 (s, 2H, Ar-H); 11,75 (s, 1H, NH)
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₃ H ₁₁ N ₄ O ₃ (m/z): 271,0831 [M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z): 271,0839

4. Sinteza spojine 9

1. stopnja: sinteza spojine 8

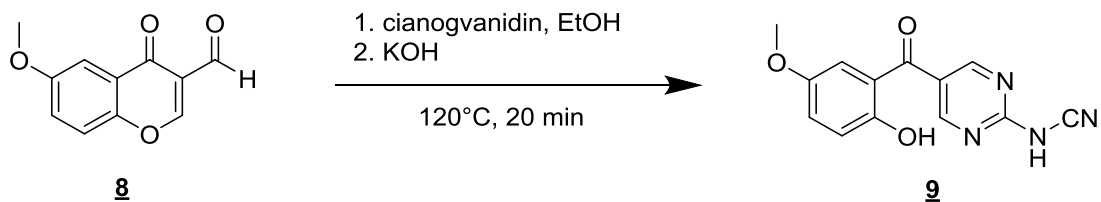


Slika 17: Reakcijska shema sinteze spojine 8

V suho bučko, preprihano z argonom smo natehtali 2-hidroksi-5-metoksiacetofenon (1,740 g; 10,5 mmol) in ga raztopili v DMF (7,5 ml). Dobro premešano zmes smo ohladili na ledeni kopeli in nato smo v argonovi atmosferi, po kapljicah začeli dodajati oksalil klorid (4,65 ml; 54,89 mmol), raztopljen v brezvodnem THF (30 ml). Po dodatku celotnega oksalil klorida smo reakcijsko zmes pustili na ledeni kopeli še 30 min in nato mešali še 12 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes zlili na mešanico ledu in vode ter naredili ekstrakcijo z DKM (3x50 ml). Združene organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl (50 ml), sušili z Na₂SO₄ in filtrirali. Nato smo pod znižanim tlakom odparili topilo, pri čemer so nam začeli izpadati kristali. Le-te smo ločili s filtracijo z odsesavanjem. TPK analiza nam je pokazala, da je v matičnici še prisoten produkt, zato smo ga izoborili z etrom.

IUPAC ime	6-metoksi-4-okso-4 <i>H</i> -kromen-3-karbaldehid
M	204,18 g/mol
Izgled	Pastelno zeleni kristali
Izkoristek reakcije	65%
MF	EtOAc:MeOH=3:1
R _f	0,76
Ttal	162-165 °C (v literaturi (56): 158-159 °C)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ (ppm) = 3,88 (s, 3H, OCH ₃); 7,46 (dd, <i>J</i> = 9,0; 3,2 Hz, 1H, Ar-H); 7,49 (d, <i>J</i> =2,8 Hz, 1H, Ar-H); 7,72 (dd, <i>J</i> = 9,0; 0,5 Hz, 1H, Ar-H); 8,90 (s, 1H, CH); 10,13 (s, 1H, CHO)

2. stopnja: sinteza spojine **9**



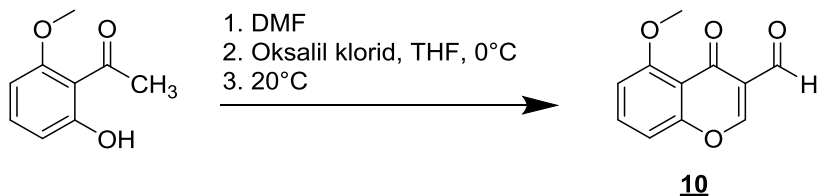
Slika 18: Reakcijska shema sinteze spojine **9**

V suho vialo smo natehtali produkt prve stopnje - spojino **8** (6-metoksi-4-okso-4H-kromen-3-karbaldehyd, 1,024 g; 5,00 mmol) in cianogvanidin (0,634 g; 7,54 mmol), ju raztopili v brezvodnem etanolu (6,5 ml) ter dodali še zdrobljen KOH (0,805 g; 14,35 mmol). Zmes smo segrevali v mikrovalovnem reaktorju pri 120 °C 20 minut. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes zlili v vodo in nakisali z ledocetom do pH=4-5. Izpadli so nam kristali produkta, ki smo jih izolirali s filtracijo z odsesavanjem.

IUPAC ime	<i>N</i> -(5-(2-hidroksi-5-metoksibenzoil)pirimidin-2-il)cianamid
M	270,25 g/mol
Izgled	Rumeni kristali
Izkoristek reakcije	64%
MF	EtOAc:MeOH=3:1
R _f	0,17
T _{tal}	>300°C
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ (ppm) = 3,77 (s, 3H, OCH ₃); 6,92 (d, <i>J</i> = 1 Hz, 1H, Ar-H); 7,06 (dd, <i>J</i> =9,0; 3,4 Hz, 1H, Ar-H); 7,22 (d, <i>J</i> = 2,1 Hz, 1H, Ar-H); 8,65 (s, 2H, 2 x Ar-H); 9,91 (s, 1H, OH), 1H od NH je izmenjan

5. Sinteza spojine 11

1. stopnja: sinteza spojine 10

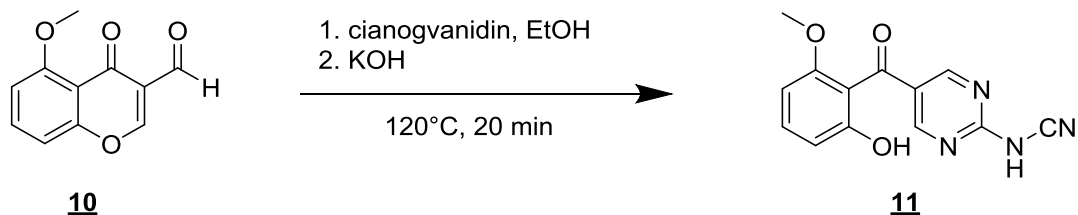


Slika 19: Reakcijska shema sinteze spojine 10

V suho bučko, preprihano z argonom smo natehtali 2-hidroksi-6-metoksiacetofenon (0,663 g; 3,99 mmol) in ga raztopili v DMF (3 ml). Dobro premešano zmes smo ohladili na ledeni kopeli in nato smo v argonovi atmosferi, po kapljicah začeli dodajati oksalil klorid (1,80 ml; 21,25 mmol), raztopljen v brezvodnem THF (25 ml). Po dodatku celotnega oksalil klorida smo reakcijsko zmes pustili na ledeni kopeli še 30 min in nato mešali še 12 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes zlili na mešanico ledu in vode ter naredili ekstrakcijo z DKM (3x50 ml). Združene organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl (50 ml), sušili z Na₂SO₄ in filtrirali. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom na 5-10 ml, vendar kristali niso izpadli, zato smo dodali 10 ml etra in nato izoborili z petroletrom. TLC analiza je pokazala, da smo dobili čist produkt in da je v matičnici ostalo še nekaj produkta. Zato smo pustili, da topilo čez noč odpari, pri čemer so ponovno izpadli kristali. Te smo prelili z mešanico eter/petroleter=10/1 in ločili s filtracijo z odsesavanjem.

IUPAC ime	5-metoksi-4-okso-4 <i>H</i> -kromen-3-karbaldehid
M	204,18 g/mol
Izgled	Zeleni kristali
Izkoristek reakcije	75 %
MF	EtOAc:MeOH=3:1
R _f	0,65
T _{tal}	135-136 °C (v literaturi (66): 128 °C)
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ (ppm) = 3,89 (s, 3H, OCH ₃); 7,09 (dd, <i>J</i> =8,4 Hz; 0,6 Hz, 1H, Ar-H); 7,20 (dd, <i>J</i> = 8,4; 0,9 Hz, 1H, Ar-H); 7,75 (t, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H, Ar-H); 8,71 (s, 1H, CH); 10,07 (s, 1H, CHO)
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₁ H ₉ O ₄ (m/z): 205,0501 [M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z): 205,0501

2. stopnja: sinteza spojine **11**



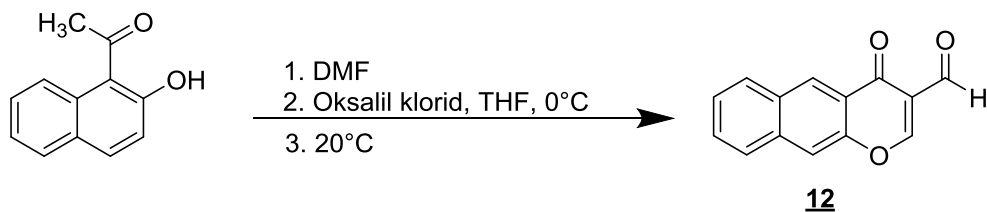
Slika 20: Reakcijska shema sinteze spojine **11**

V suho vialo za mikrovalovni reaktor smo natehtali produkt prve stopnje - spojino **10** (5-metoksi-4-okso-4*H*-kromen-3-karbaldehid, 0,307 g; 1,50 mmol) in cianogvanidin (0,190 g; 2,262 mmol), ju raztopili v brezvodnem etanolu (3,0 ml) ter dodali še zdrobljen KOH (0,241 g; 4,295 mmol). Zmes smo segrevali v mikrovalovnem reaktorju pri 120 °C 20 minut. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes zlili v vodo in nakisali z ledocetom do pH=4-5. Izpadli so kristali produkta, ki smo jih ločili s filtracijo z odsesavanjem. TPK analiza je pokazala, da je v matičnici še prisoten naš produkt. Matičnico smo zato pustili na sobni temperaturi in po enem tednu so iz nje izpadli kristali produkta.

IUPAC ime	<i>N</i> -(5-(2-hidroksi-6-metoksibenzoil)pirimidin-2-il)cianamid
M	270,25 g/mol
Izgled	Rumeni kristali
Izkoristek reakcije	80 %
MF	EtOAc:MeOH=3:1
R _f	0,40
T _{tal}	>300°C
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ (ppm) = 3.67 (s, 3H, OCH ₃), 6.57 (dd, <i>J</i> = 8.2, 0.6 Hz, 1H, Ar-H), 6.60 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.28 (t, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H, Ar-H), 8.66 (s, 2H, 2 x Ar-H), 9.98 (s, 1H, OH), 1H od NH je izmenjan

6. Sinteza spojine 13

1. stopnja: sinteza spojine 12

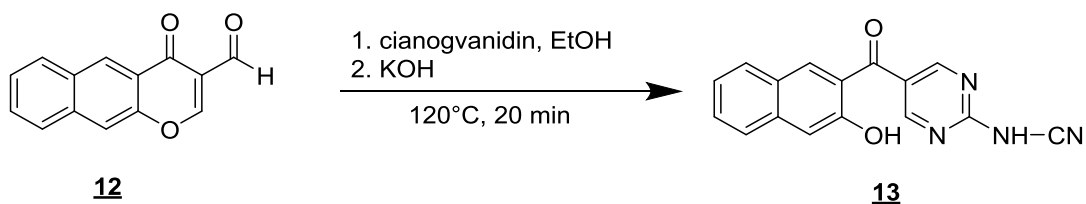


Slika 21: Reakcijska shema sinteze spojine 12

V suho bučko, preprihano z argonom smo natehtali 1-acetil-2-naftol (1,303 g; 7 mmol) in ga raztopili v brezvodnem DMF (5 ml). Dobro premešano zmes smo ohladili na ledeni kopal in nato smo v argonovi atmosferi, po kapljicah začeli dodajati oksalil klorid (4,1 ml; 47 mmol), raztopljen v brezvodnem THF (20 ml). Po dodatku celotnega oksalil klorida smo reakcijsko zmes pustili na ledeni kopeli še 30 min in nato mešali še 12 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes zlili na mešanico ledu in vode ter naredili ekstrakcijo z DKM (3x50 ml). Združene organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl (50 ml), sušili z Na₂SO₄ in filtrirali. Topilo smo nato odpareli pod znižanim tlakom, pri čemer so začeli izpadati kristali. To izpadanje smo pospešili tako, da smo dodali dietileter. Kristale smo izolirali s filtracijo z odsesavanjem. Čez noč so iz matičnice izpadli dodatni kristali našega produkta, ki smo jih izolirali s filtracijo z odsesavanjem.

IUPAC ime	4-okso-4H-benzo[g]kromen-3-karbaldehid
M	224,21 g/mol
Izgled	Rumeni igličasti kristali
Izkoristek reakcije	89 %
MF	EtOAc:heksan=2:1
Rf	0,63
Ttal	180°-183 °C
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 7,56 (d, J=9,0 Hz, 1H, Ar-H); 7,69 (ddd, J=8,1; 7,0; 1,2 Hz, 1H, Ar-H); 7,81 (ddd, J=8,6; 7,0; 1,5 Hz, 1H, Ar-H); 7,94-7,96 (m, 1H, Ar-H); 8,17 (d, J=9,0 Hz, 1H, Ar-H); 8,56 (s, 1H, Ar-H); 9,99 (ddt, J=8,7; 1,3; 0,7 Hz, 1H, Ar-H); 10,51 (s, 1H, Ar-H)
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₄ H ₉ O ₃ (m/z): 225,0552 [M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z): 225,0558
IR	3071, 2852, 2360, 1644, 1581, 1561, 1510, 1437, 1414, 1369, 1341, 1283, 1261, 1208, 1188, 1143, 992, 936, 885, 821, 759, 743, 631 cm ⁻¹

2. stopnja: sinteza spojine 13



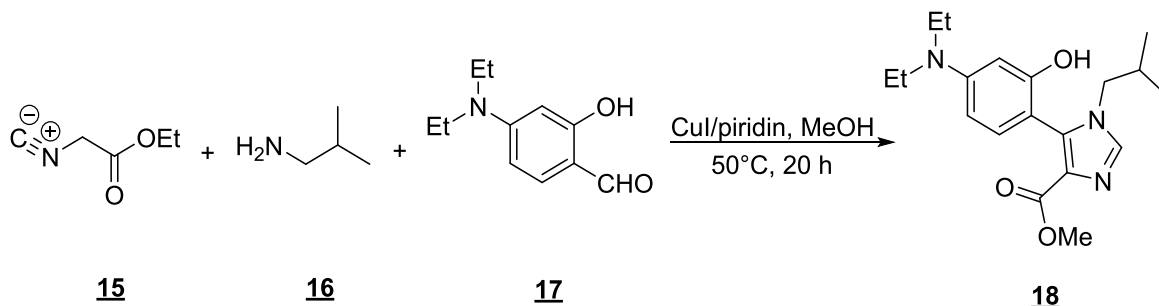
Slika 22: Reakcijska shema sinteze spojine 13

V suho vialo za mikrovalovni reaktor smo natehtali produkt prve stopnje 4-okso-4H-benzo[g]kromen-3-karbaldehid - spojino 12 (0,448 g; 2 mmol) in cianogvanidin (0,254 g; 3,024 mmol), ju raztopili v brezvodnem etanolu (5 ml) in na koncu dodali še zdrobljen KOH (0,320 g; 5,707 mmol). Zmes smo segrevali v mikrovalovnem reaktorju pri 120 °C 20 minut. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes zlili v vodo in nakisali z ledocetom do pH=5. Izpadli so kristali produkta, ki pa niso bili čisti, zato smo jih prekristalizirali iz acetona. V matičnici je po prekristalizaciji ostal še želen produkt, zato smo pustili, da topilo odhlapi in nato ostanek ponovno suspendirali v acetonu (10 ml) in dobljene kristale izolirali s filtracijo z odsesavanjem.

IUPAC ime	N-(5-(3-hidroksi-2-naftoil)pirimidin-2-il)cianamid
M	290,28 g/mol
Izgled	Bledo-rumeni igličasti kristali
Izkoristek reakcije	60%
MF	EtOAc:MeOH=3:1
R _f	0,48
T _{tal}	>300 °C
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ (ppm) = 7,26 (d, <i>J</i> =9,0 Hz, 1H, Ar-H); 7,36 (ddd, <i>J</i> =8,0; 6,9; 1,2 Hz, 1H, Ar-H); 7,45 (ddd, <i>J</i> =8,4; 6,9; 1,4 Hz, 1H, Ar-H); 7,58 (d, <i>J</i> =8,0 Hz, 1H, Ar-H); 7,90 (d, <i>J</i> =7,8 Hz, 1H, Ar-H); 7,99 (d, <i>J</i> =8,9 Hz, 1H, Ar-H); 8,76 (s, 2H, Ar-H); 10,49 (s, 1H, OH), 1H od NH je izmenjan
¹³ C-NMR (100 Mz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ (ppm) = 108,27; 118,24; 123,54; 125,20; 125,63; 129,30; 129,51; 131,09; 131,58; 137,76; 153,64; 158,21; 180,64; 191,56
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₆ H ₉ N ₄ O ₂ (m/z): 289,0726 [M-H] ⁻ Izmerjena vrednost (m/z): 289,0727
IR	3177, 3048, 2195, 1684, 1638, 1593, 1563, 1493, 1435, 1373, 1316, 1207, 1149, 1076, 1006, 987, 952, 931, 895, 849, 819, 786, 751, 713, 634 cm ⁻¹

9. Sinteza spojine 19

1. stopnja: sinteza spojine 18

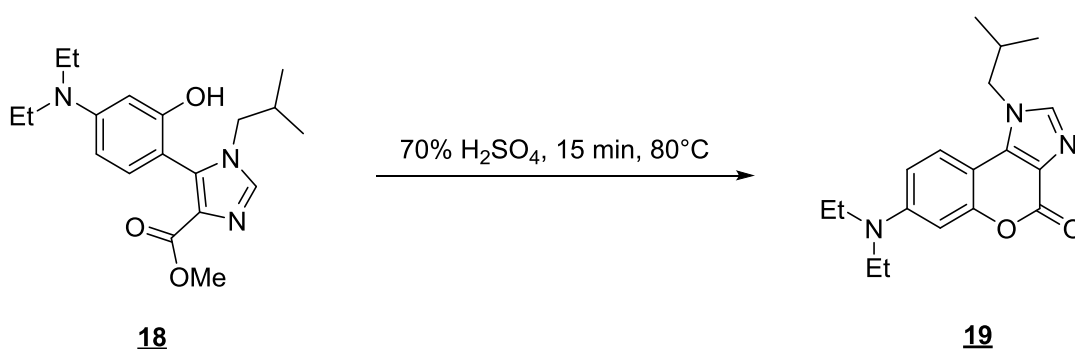


Slika 23: Reakcijska shema sinteze spojine 18

Raztopini etil 2-izocianoacetata (15) (1,54 ml, 14 mmol) smo pri sobni temperaturi med mešanjem dodali 2-metilpropan-1-amin (16) (1,405 ml, 14 mmol), brezvodni MeOH (50 ml), 4-(diethylamino)salicilaldehid (17) (2,705 g, 14 mmol), piridin (1,133 ml, 14 mmol) in bakrov jodid (0,272 g, 1,4 mmol). Reakcijsko mešanico smo nato mešali pri 50°C 21 ur. Po končani reakciji smo reakcijski zmesi dodali DKM (150 ml) in ekstrahirali z 1M HCl (150 ml). Organsko fazo smo sprali z 1M HCl (150 ml), združene vodne faze pa z DKM (250 ml). Združene vodne faze smo naalkalili z 3M NaOH do $\text{pH}=13-14$. Nato smo jih ekstrahirali z DKM (2x300 ml). Združenim vodnim fazam smo nato uravnali pH na 7 s koncentrirano HCl (37 %). Izoboril se je produkt, ampak je analiza z NMR pokazala, da ni čist, zato je sledilo čiščenje s kolonsko kromatografijo (DKM:MeOH=20:1). Ker nismo dobili zadovoljivo čistega produkta, je sledilo še dodatno čiščenje s kolonsko kromatografijo (DKM:aceton:MeOH=100:1:3).

IUPAC ime	Metil 5-(4-(dietilamino)-2-hidroksifenil)-1-izobutil-1H-imidazol-4-karboksilat
M	345,44 g/mol
Izgled	Rjava amorfna snov
Izkoristek reakcije	31 %
MF	DKM:MeOH=20:1
Rf	0,38
Ttal	94-97 °C
¹ H-NMR (400 MHz, (CD ₃) ₂ CO)	δ (ppm) = 0,73 (s, 3H, CH ₃); 0,75 (s, 3H, CH ₃); 1,17 (t, J=7.0 Hz, 6H, 2xCH ₃); 1,81-1,88 (m, 1H, CH); 3,39 (q, J=7.0 Hz, 4H, 2xCH ₂); 3,63 (s, 3H, CH ₃); 3,73 (d, J=7.5 Hz, 2H, CH ₂); 6,28-6,36 (m, 2H, Ar-H); 6,93-6,98 (m, 1H, Ar-H); 7,63 (s, 1H, Ar-H); 1H od OH se ne vidi
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₉ H ₂₈ N ₃ O ₃ (m/z): 346,2131 [M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z): 346,2138
IR	2966, 1712, 1619, 1572, 1512, 1435, 1355, 1302, 1270, 1223, 1195, 1163, 1130, 1042, 943, 815, 785, 708, 660, 606 cm ⁻¹

2. stopnja: sinteza spojine 19



Slika 24: Reakcijska shema sinteze spojine 19

Produkt prve stopnje - spojino 15 (0,093 g; 0,269 mmol) smo natehtali v epruveto za mikrovalovni reaktor, dodali 70% H₂SO₄ (2 ml) in jo segrevali v mikrovalovnem reaktorju 15 minut pri 80 °C. Surovo reakcijsko zmes smo nato ekstrahirali z EtOAc (3x40 ml). TPK analiza je pokazala, da reakcija ni potekla, zato smo topilo odparili, preostanek dali v bučko, nakisali s 70% H₂SO₄ (20 ml) in dali segrevati med mešanjem na 80 °C za 3 ure. Nato smo reakcijsko zmes naalkalili s 3 M NaOH do pH= 10-12 in ekstrahirali z EtOAc (3x40 ml). Vodne faze smo združili in jih ponovno naalkalili do pH=12 in ekstrahirali z DKM:MeOH=9:1 (1x100 ml). Vse organske faze smo združili, sprali z nasičeno raztopino NaCl (2x200 ml), sušili z Na₂SO₄ in filtrirali. Temu je sledilo čiščenje s kolonsko kromatografijo (DKM:MeOH=20:1). Ker produkta nismo dobili v zadovoljivi čistoti, smo ga dodatno očistili še s kromatografsko kolono (DKM:MeOH=50:1).

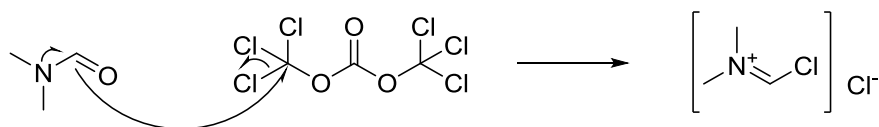
IUPAC ime	<i>N,N</i> -Dietil-1-izobutil-1,4-dihidrochromen[3,4- <i>d</i>]imidazol-7-amin
M	313,40 g/mol
Izgled	Rumeni kristali
Izkoristek reakcije	17 %
MF	DKM:MeOH=9:1
R _f	0,54
T _{tal}	166-169°C
¹ H-NMR (400 MHz, (CD ₃) ₂ CO)	δ (ppm) = 1,01 (d, <i>J</i> =6,7 Hz, 6H, 2xCH ₃); 1,21 (t, <i>J</i> =7,1 Hz, 6H, 2xCH ₃); 2,17-2,31 (m, 1H, CH); 3,50 (q, <i>J</i> = 7,0 Hz, 4H, 2xCH ₂); 4,31 (d, <i>J</i> =7,5 Hz, 2H, CH ₂); 6,64 (d, <i>J</i> =2,6 Hz, 1H, Ar-H); 6,78 (dd, <i>J</i> =9,0; 2,6 Hz, 1H, Ar-H); 7,73 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 1H, Ar-H); 7,84 (s, 1H, Ar-H)
HPLC Rt	12,145 min (99,9 % čistost)
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₈ H ₂₄ N ₃ O ₂ (m/z): 314,1869 [M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z): 314,1867
¹³ C-NMR (100 Mz, (CD ₃) ₂ CO)	δ (ppm) = 12,76; 19,74; 29,67; 45,04; 54,40; 99,36; 101,95; 109,47; 123,47; 125,01; 137,38; 143,60; 149,80; 155,60; 157,47
IR	3092, 2964, 1717, 1615, 1576, 1547, 1500, 1467, 1441, 1411, 1359, 1263, 1286, 1226, 1203, 1137, 1080, 1036, 948, 925, 875, 853, 822, 790, 70, 671, 649, 626 cm ⁻¹

REZULTATI IN RAZPRAVA

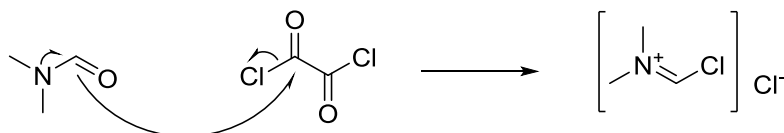
1.1. Spojine s potencialnim delovanjem na receptor TLR4

Za sintezo končnih spojin, derivatov 2-(4-fluorofenil)-1-(5-(2-hidroksibenzoil)pirimidin-2-il)gvanidina, smo uporabili tristopenjsko sintezo. V prvi stopnji smo s pomočjo Vilsmeier-Haackovega reagenta derivate 2-hidroksiacetofenona pretorili v derivate 3-formilkromona. Sledila je ciklokondenzacija in nastanek novega pirimidinskega obroča s pripeto cianamidno skupino. V tretji stopnji pa je potekla nukleofilna adicija amina na aktivirano ciano skupino produkta druge stopnje.

V prvi stopnji sinteze smo uporabili modificirano Vilsmeier-Haackovo reakcijo. To pomeni, da smo za nastanek Vilsmeierjevega reagenta, poleg DMF, uporabili trifosgen (BTC) oz. oksalil klorid in ne POCl_3 , ki se uporablja pri klasični Vilsmeier-Haackovi reakciji.

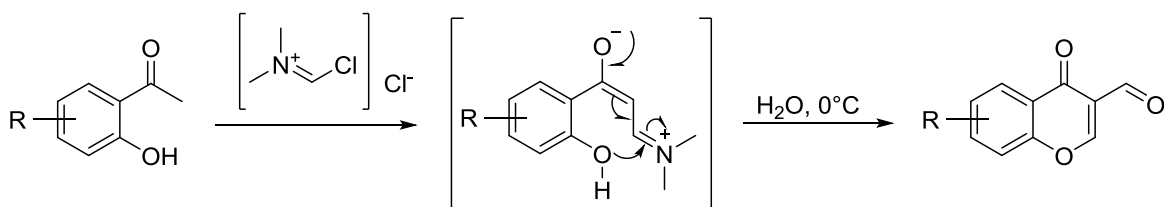


Slika 25: Nastanek Vilsmeier-Haackovega reagenta s trifosgenom, povzeto po (47)



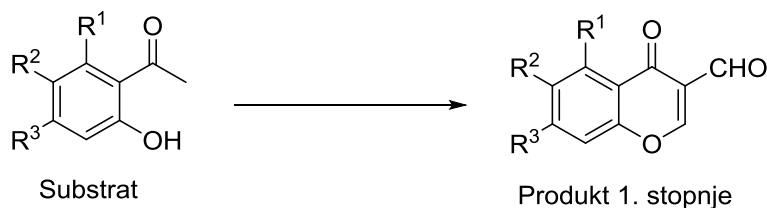
Slika 26: Nastanek Vilsmeier-Haackovega reagenta z oksalil kloridom, povzeto po (47)

V brezvodnih pogojih najprej nastane Vilsmeierjev reagent (sliki 25, 26), elektrofilni iminijev kation, ki nato reagira z acetilno skupino *o*-hidroksiacetofenona. Pri tem pride do nastanka 3-formilkromona, končnega produkta prve stopnje (slika 27).



Slika 27: Mehanizem nastanka produkta prve stopnje, povzeto po (48)

Za pripravo Vilsmeier-Hacckovega reagenta smo trifosgen uporabili le enkrat. Ker gre za nevaren reagent, ki se že ob majhni prisotnosti vode pretvori v strupen plin fosgen, smo ga zamenjali z oksalil kloridom, ki je nekoliko varnejši, a reakcija z njim poteka burneje. Reakcije nismo izvajali po postopku iz članka B. China Raju in soavtorjev (49), ampak smo uporabili modificirani postopek iz magistrske naloge Petra Zajca (50). Poglavitna sprememba je bila ta, da smo oksalil klorid predhodno redčili z brezvodnim THF v kapalniku nad bučko in ga razredčenega počasi kapljali v reakcijsko zmes.



Preglednica V: Tabela izkoristkov prve stopnje sinteze

Produkt 1. stopnje	R ¹	R ²	R ³	Lastni izkoristki [%]	Izkoristki iz literature [%]
Spojina <u>1</u>	H	OCH ₃	OCH ₃	19 ^a (14 ^c , 8 ^d)	12 ^b (51)
Spojina <u>4</u>	H	H	H	64 ^e	95 ^d (52) 71 ^b (53)
Spojina <u>6</u>	H	H	OCH ₃	18 ^e	40 ^b (53)
Spojina <u>8</u>	H	OCH ₃	H	65 ^b	97 ^b (48) 85 ^d (52)
Spojina <u>10</u>	OCH ₃	H	H	75 ^b	83 ^b (48)
Spojina <u>12</u>	H			89 ^b	/
Spojina <u>17</u>	H	Cl	H	/	86 ^b (53) 53 ^d (53)
Spojina <u>19</u>	H	F	H	/	84 ^b (53)

^a DMF, THF, 0°C; raztopina oksalil klorida v brezvodnem THF po kapljicah, 15 min pri 0°C nato 12 ur pri sobni temperaturi

^b DMF, 0°C; raztopina oksalil klorida v brezvodnem THF po kapljicah, 30 min pri 0°C nato 12 ur pri sobni temperaturi

^c DMF, 1,2-dikloroetan, 0°C; raztopina oksalil klorida v brezvodnem THF po kapljicah, 15 min pri 0°C nato 12 ur pri sobni temperaturi

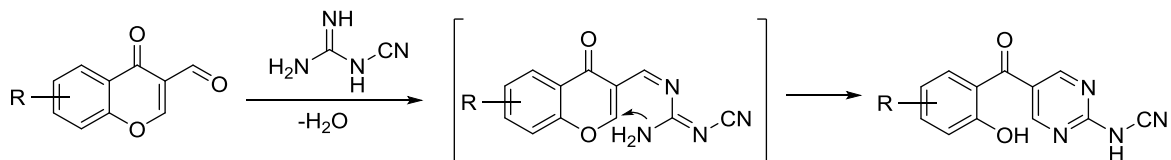
^d BTC, DMF, 1,2-dikloroetan, 20 min pri 0°C nato 30 min pri sobni temperaturi; 30 min pri 0°C nato 12 ur pri sobni temperaturi

^e DMF, THF, 1,2-dikloroetan, 0°C; raztopina oksalil klorida v brezvodnem THF po kapljicah, 30 min pri 0°C nato 12 pri sobni temperaturi

Če pogledamo preglednico V z izkoristki vidimo, da so ti kar dobri. Izstopata le izkoristka spojine **1** (dve metoksi skupini na mestih 4 in 5), od 8% do 19%, kar je odvisno od tega, katere reagente (BTC ali oksalil klorid) in topila (THF, 1,2-dikloroetan) smo uporabili in spojine **6** (metoksi skupina na mestu 4) z 18% izkoristkom. Tudi čiščenje zgoraj omenjenih spojin je bilo težje. Da smo prišli do čistega produkta, smo ju morali očistiti s kolonsko kromatografijo, medtem ko so pri vseh ostalih čisti kristali izpadli ob zlitju reakcijske zmesi na led ali med odparevanjem topila pod znižanim tlakom. Skupna točka spojine **1** in spojine **6** je metoksi skupina na mestu 4, ki je poleg izgub pri čiščenju s kolonsko kromatografijo očitno krivec za nizke izkoristke. Nohara A. s sodelavci v svojem članku (48) ugotavlja, da pride pri 2-hidroksiacetofenonih z vezano metoksi skupino na četrtem mestu, poleg želene reakcije tudi do formiliranja benzenskega obroča in drugih stranskih produktov, ki so vzrok za majhne izkoristke.

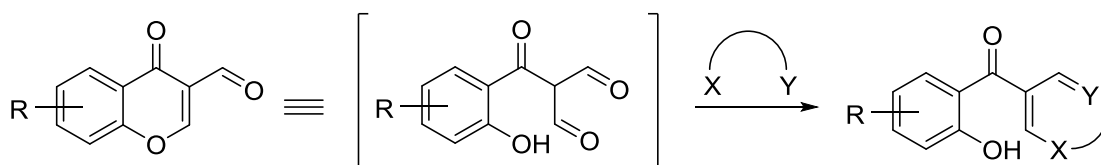
Če med seboj primerjamo sintezne postopke opazimo, da nam uporaba BTC kot reagenta da višje izkoristke le za nesubstituiran 2-hidroksiacetofenonski derivat. Pri vseh ostalih substituiranih derivatih dobimo z oksalil kloridom boljše izkoristke kot z BTC. Prav tako se z uporabo oksalil klorida namesto BTC izognemo čiščenju produkta s kolonsko kromatografijo, saj nam čisti kristali izpadejo pri odparevanju topila pod znižanim tlakom. Uporaba oksalil klorida je torej boljša od uporabe BTC, saj je reagent manj nevaren, pri sintezi dobimo boljše izkoristke in pri izolaciji porabimo manj časa in topil.

V drugi stopnji sinteze cianogvanidin kot dinukleofil reagira s 3-formilkromonom. Točen mehanizem še ni znan, saj še ni razjasnjeno ali najprej poteče nukleofilni napad amino skupine na aldehydno skupino 3-formilkromona ali na C-2 atom 3-formilkromona. Nukleofilni napad povzroči odprtje kromonskega obroča, nato poteče ciklokondenzacija, pri čemer nastane nov pirimidinski obroč s pripeto cianamidno skupino (54).



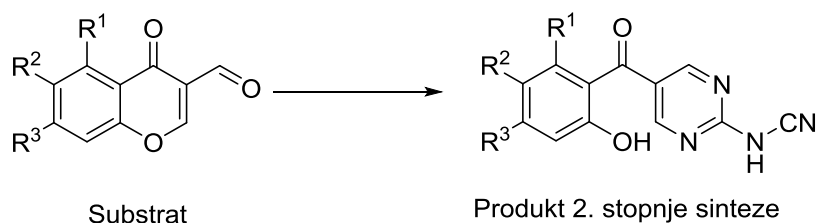
Slika 28: Mehanizem reakcije druge stopnje, povzeto po (54, 55)

Možna pa je tudi pretvorba 3-formilkromona v 2-(2-hidroksibenzoil)malonilaldehid, ki še olajša nukleofilni napad (54).



Slika 29: Pretvorba 3-formilkromona, povzeto po (54)

V literaturi je opisan postopek, pri katerem se uporablja segrevanje reakcijske zmesi v brezvodnih pogojih 4 ure pod refluxom (55). Za ta postopek smo se odločili pri sintezi spojine **2** (*N*-(5-(2-hidroksi-4,5-dimetoksibenzoil)pirimidin-2-il)cianamid), saj dobimo, po ugotovitvah iz magistrske naloge Urške Hertiš (56), za to spojino pri tem postopku boljši izkoristek kot pri modificiranem postopku. Prav tako smo ta postopek uporabili še pri sintezi spojine **7**. Za sintezo vseh ostalih spojin smo uporabili modificiran postopek iz magistrske naloge Petra Zajca (50), ki se od literaturnega razlikuje v tem, da se reakcija izvaja v mikrovalovnem reaktorju pri 120° C.



Preglednica VI: preglednica izkoristkov druge stopnje sinteze

Produkt 2. stopnje	R ¹	R ²	R ³	Lastni izkoristki [%]	Izkoristki iz literature [%]
Spojina <u>2</u>	H	OCH ₃	OCH ₃	28 ^a	46 ^b (51) 75 ^a (51)
Spojina <u>5</u>	H	H	H	50 ^b	70 ^a (52) 75 ^b (53)
Spojina <u>7</u>	H	H	OCH ₃	30 ^a	29 ^a (51) 35 ^b (53)
Spojina <u>9</u>	H	OCH ₃	H	64 ^b	95 ^a (52) 69 ^b (48)
Spojina <u>11</u>	OCH ₃	H	H	80 ^b	64 ^b (48)
Spojina <u>13</u>	H			60 ^b	/
Spojina <u>18</u>	H	Cl	H	/	48 ^a (53) 54 ^b (53)
Spojina <u>20</u>	H	F	H	/	58 ^a (53) 57 ^b (53)

^aSegrevanje reakcijske zmesi 4 ure pod refluxom

^bSegrevanje reakcijske zmesi v mikrovalovnem reaktorju pri 120°C, 20 min

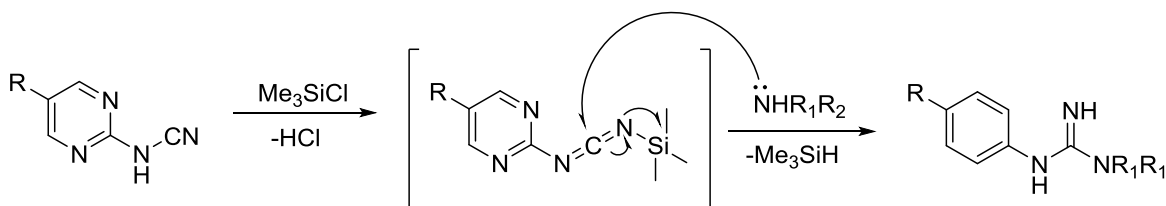
Iz preglednice VI je razvidno, da tako kot v prvi stopnji, tudi v tej najslabše poteka reakcija na 4-metoksi derivatu (spojina 7), neodvisno od tega, ali reakcijo izvajamo v mikrovalovnem reaktorju ali klasično segrevamo pod refluxom.

Če primerjamo izkoristke dobljene pri klasično izvedeni reakciji in reakciji v mikrovalovnem reaktorju vidimo, da so izkoristki pri reakciji v mikrovalovnem reaktorju večji, razen pri spojini 2 in spojini 9. Prav tako je čiščenje spojin sintetiziranih po klasični poti zahtevnejše, saj je potrebno za čiščenje uporabiti kolonsko kromatografijo. Če pa za sintezo uporabimo modificiran postopek je izolacija enostavna, saj nam čisti kristali produkta izpadejo pa nakisanju reakcijske zmesi. Edina izjema je spojina 2, pri kateri

moramo, neglede na to, ali reakcija poteka klasično ali v mikrovalovnem reaktorju, spojino očistiti s pomočjo kolonske kromatografije. Izkoristki pa so odvisni tudi od osebe, ki izvaja reakcijo, saj se moji izkoristki v nekaterih primerih kar precej razlikujejo od izkoristkov iz literature.

Če zaključimo: z uporabo mikrovalovnega reaktorja se čas sinteze skrajša iz 4 ur na 20 minut, zmanjša se poraba topil pri reakciji, izolacija je enostavna, hitra in zanjo porabimo manj topil, kot pri izolaciji s kolono in izkoristki so z nekaj izjemami višji. Reakcija, izvedena v mikrovalovnem reaktorju, je torej smotrnejša in okolju prijaznejša.

Zadnja stopnja tristopenjske sinteze je nukleofilna adicija aromatskega amina, v našem primeru je bil to 4-fluoroanilin, na metoksi derivate *N*-(5-(2-hidroksibenzoil)pirimidin-2-il)cianamida. Najprej je potrebno aktivirati ciano skupino produkta druge stopnje. To smo storili z uporabo aktivatorja TMSCl , ki se veže na dušikov atom ciano skupine in tako olajša nukleofilni napad amina. TMSCl je tudi vir brezvodne HCl , ki je potrebna za pravilen potek reakcije. Po vezavi amina na ciano skupino dobimo gvanidinski derivat, ki je tudi končni produkt (51).



Slika 30: Mehanizem nastanka produkta 3. stopnje, povzeto po (51)

Reakcijo smo izvajali po literaturnem postopku (51) v mikrovalovnem reaktorju. Tretjo stopnjo smo izvedli le pri eni spojini, spojini **3** (2-(4-fluorofenil)-1-(5-(2-hidroksi-4,5-dimetoksibenzoil)pirimidin-2-il)gvanidin). Omenjeno spojino je v svoji magistrski nalogi poskusila sintetizirati tudi Urška Hertiš (56), vendar ji ni uspelo. Nam je uspelo, a je reakcija potekla slabo. Dobili smo mnogo stranskih produktov, zato je bilo čiščenje spojine zahtevno. Narediti smo morali dve kromatografski koloni, da smo dobili produkt v zadovoljivi čistosti. Končni izkoristek je bil le 11%. Vzrok za tako majhen izkoristek lahko pripišemo nastanku mnogih stranskih produktov, izgubam pri čiščenju ter uporabljenemu reagentu. Uporabljeni 4-fluoroanilin ni najboljši nukleofil, saj ima na *para* mestu fluor, ki z negativnim induktivnim učinkom zmanjšuje nukleofilne lastnosti molekule, zaradi česar reakcija slabše poteče.

1.1.1 Rezultati biološkega testiranja spojin s potencialnim delovanjem na receptor TLR4

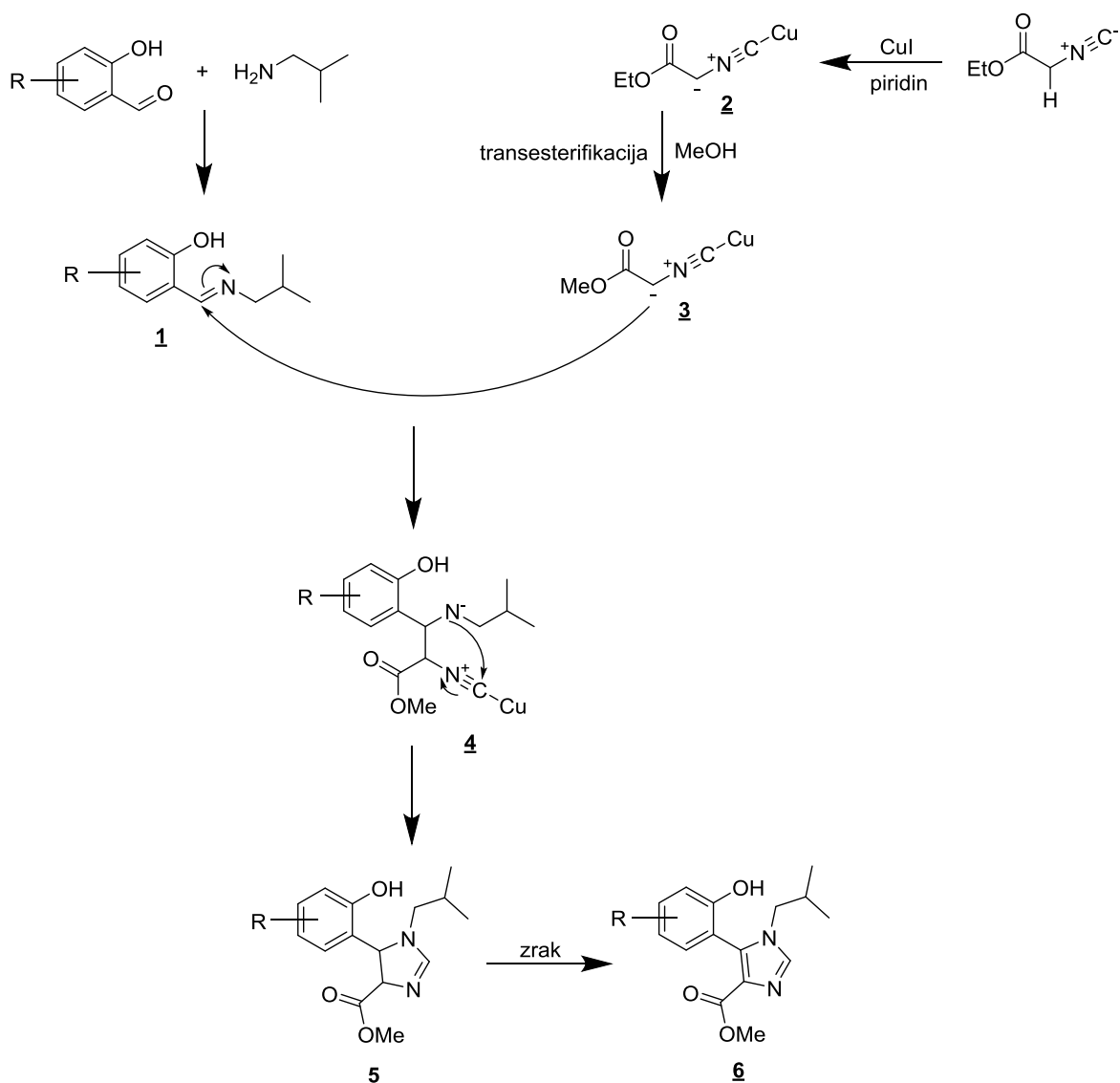
Biološko testiranje smo, v sodelovanju z Zavodom za transfuzijsko medicino Republike Slovenija, izvedli za spojino **3**. Testiranje je izvedel doc. dr. Urban Švajger. Najprej smo preverili topnost spojine v DMSO in celičnem mediju. Topnost smo preverjali pri koncentraciji 25 mM. Opazovali smo prisotnost precipitátov. Precipitátov nismo opazili, zato smo ocenili, da je spojina topna. Topnost spojin se preverja zato, ker netopnost pomeni nižjo koncentracijo spojine in morebitno prisotnost kristalov, posledica česar so lahko lažno negativni oz. lažno pozitivni rezultati nadaljnjih testov. Določanju topnosti je sledilo določanje citotoksičnosti v celičnem mediju. Rezultati so pokazali, da spojina **3** izkazuje citotoksične lastnosti in tako ni bila primerna za nadaljna testiranja.

1.2. Spojine s potencialnim delovanjem na receptor TLR7

Za sintezo končnih spojin, derivatov 1-izobutilkromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-ona, smo uporabili dvostopenjski sintezni postopek (46). Prva stopnja je multikomponentna reakcija (57), kjer smo iz 2-metilpropan-1-amina, etil 2-izocianoacetata, derivata salicilaldehida ob prisotnosti piridina kot baze in bakrovega jodida kot katalizatorja sintetizirali imidazolske derivate. V drugi stopnji pa s pomočjo kislinsko katalizirane transesterifikacije poteče ciklizacija do končnih spojin.

V prvi stopnji sinteze smo uporabili multikomponentno reakcijo, ki se, kot že samo ime pove, od klasičnih eno- in dvo-komponentnih reakcij razlikuje v tem, da uporabimo tri ali več reagentov, ki tvorijo produkt. Multikomponentna reakcija se od klasične razlikuje v tem, da iz strukturno enostavnih vhodnih surovin dobimo kompleksne produkte v kratkem času z relativno malo stranskimi produkti, saj gre za reakcijo, kjer so vsi ali skoraj vsi atomi vhodnih snovi vključeni v na novo nastali produkt. Multikomponentne reakcije so prijazne tudi do okolja, saj gre običajno za mile reakcijske pogoje in manjšo porabo organskih topil. Za razliko od klasičnih reakcij pa je pri multikomponentnih potrebno biti bolj pozoren na izbiro reakcijskih pogojev: topila, katalizatorji, koncentracije, vrsta vhodnih snovi,... saj je potek reakcije od teh dejavnikov močno odvisen (58, 59, 60).

Mi smo za izhodne reagente multikomponentne reakcije uporabili etil 2-izocianoacetat, 2-metilpropan-1-amin in 4-(dietilamino)salicilaldehid. Za potek reakcije je nujna še prisotnost baze-piridin in katalizatorja-bakrov jodid. Natančen mehanizem reakcije še ni znan, predpostavlja pa se naslednje: najprej pride do kondenzacije med primarnim aminom (2-metilpropan-1-amin) in 4-(dietilamino)salicilaldehid, pri čemer nastane imin (**1**). Istočasno pride tudi do nastanka aktiviranega kompleksa Cu(I)-izocianid, ki ga piridin deprotonira in nastane intermediat **2**, na katerem nato ob prisotnosti metanola poteče transesterifikacija do spojine **3**. Nukleofilni ogljikov atom metil 2-izocianatnega derivata (spojina **3**) nato napade elektrofilni ogljikov atom imina (**4**). Sledi ciklizacija do imidazolinkega obroča (**5**), ki nato na zraku hitro oksidira do imidazola (**6**) (57).



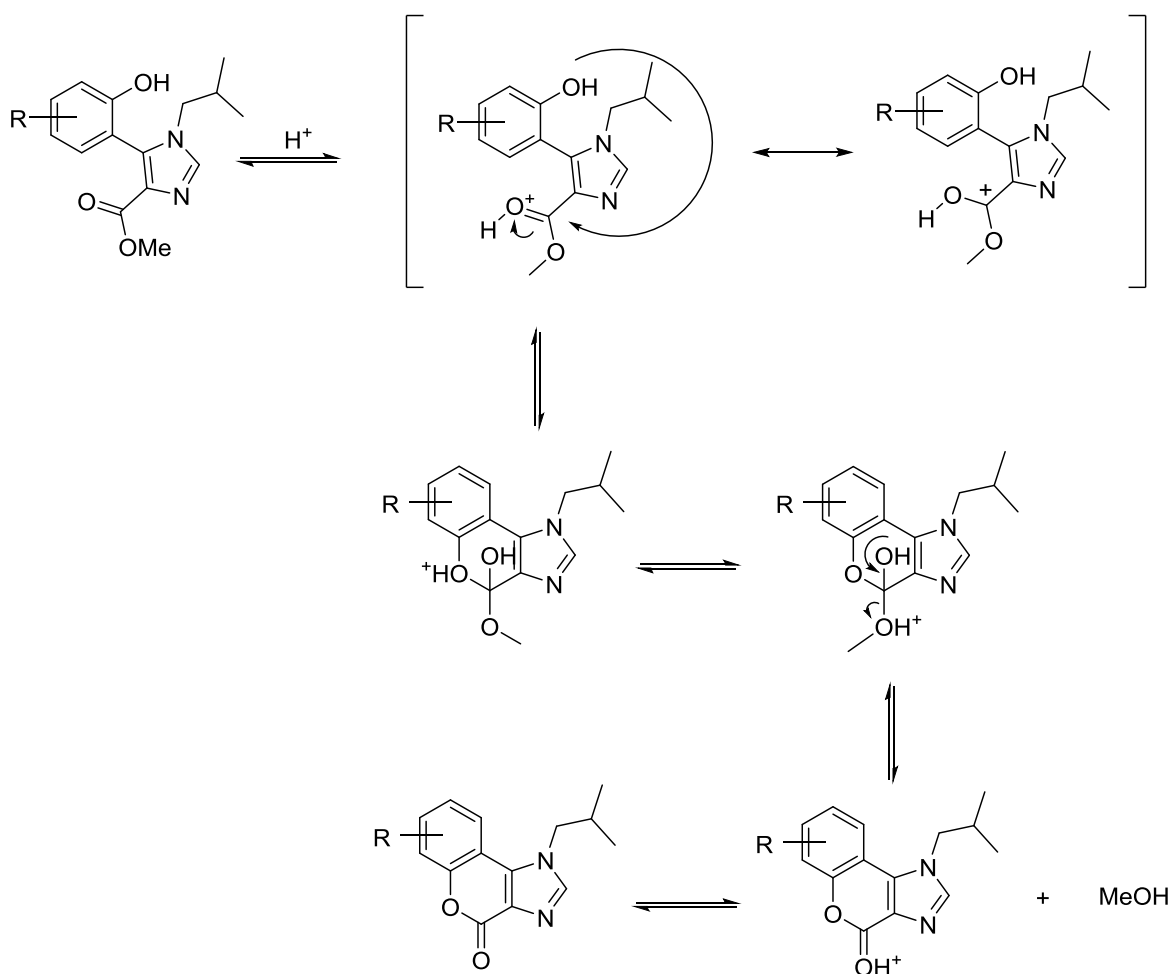
Slika 31: Predpostavljen mehanizem reakcije sinteze 1.stopnje, povzeto po (57)

31% izkoristek pri spojini **18** je precej slab. Vzroke za tak izkoristek lahko pripišemo izgubam zaradi čiščenja na dveh kromatografskih kolonah in dejstvu, da imamo na *para* mestu glede na aldehydno skupino vezano dietilaminsko skupino, ki s svojim pozitivnim resonančnim efektom zmanjšuje elektrofilnost karbonilnega ogljika in s tem njegovo reaktivnost.

V drugi stopnji sinteze je potekla ciklizacija s pomočjo kislinsko katalizirane transesterifikacije. Mehanizem kislinsko katalizirane transesterifikacije je podoben kislinsko katalizirani esterifikaciji. Razlikujeta se le v začetnem reagentu, namesto kisline imamo pri transesterifikaciji ester, in v končni izstopajoči molekuli, ki je pri transesterifikaciji alkohol. Gre za ravnotežno reakcijo. Ravnotežje premaknemo v smer

nastanka produktov tako, da produkt-alkohol odstranjujemo iz reakcijske zmesi s povišano temperaturo ali z uporabo presežka enega od reagentov (61, 62).

Mehanizem reakcije: kislinski katalizator, v našem primeru H_2SO_4 , poveča elektrofilnost karbonilnega ogljikovega atoma, ki ga nato nukleofilni alkohol lažje napade. Pri tem pride do nastanka tetraedričnega intermediata. Sledi odcep alkohola, v našem primeru gre za metanol, in nastanek končnega produkta (61, 62).



Slika 32: Mehanizem reakcije sinteze 2. stopnje, povzeto po (62)

Namesto literaturnega postopka, po katerem bi morali produkt prve stopnje raztopiti v 20 ml 75% H_2SO_4 in nato segrevati pri 80 °C 3 ure (46), smo uporabili optimizirani postopek iz magistrske naloge Mane Gartnar (63), po katerem smo uporabili le nekaj mililitrov 70% H_2SO_4 in reakcijo predstavili v mikrovalovni reaktor, pri čemer se je čas sinteze skrajšal iz 3 ur na 15 minut. Pri Mani Gartnar je optimizacija imela za posledico večje izkoristke (63), v našem primeru pa reakcija ni potekla. Zato smo poskusili reakcijo izvesti po literaturnem

postopku (46). Odločitev se je izkazala za pravilno, saj je reakcija potekla. Izkoristek pri sintezi spojine **19** je bil precej slab, le 17%. Glavni vzrok za tako slab izkoristek lahko pripišemo predvsem izgubam pri izolaciji-dvojno čiščenje s kolonsko kromatografijo.

1.2.1 Rezultati biološkega testiranja spojin s potencialnim delovanjem na receptor TLR7

Biološko testiranje smo, v sodelovanju z Zavodom za transfuzijsko medicino Republike Slovenija, izvedli za spojino **19**. Testiranje je izvedla diplomantka Urška Jug pod mentorstvom doc. dr. Urbana Švajgerja. Najprej smo preverili topnost spojine v DMSO in celičnem mediju. Topnost spojine v DMSO je 50 mmol/l. Topnost spojine se preverja zato, ker netopnost pomeni nižjo koncentracijo spojine in morebitno prisotnost kristalov, kar ima lahko za posledico lažno negativne oz. lažno pozitivne rezultate nadaljnjih testov. Določanju topnosti je sledil test citotoksičnosti v celičnem mediju. Rezultati so pokazali, da spojina pri koncentraciji 62,5 $\mu\text{mol/l}$ ne izkazuje več citotoksičnih lastnosti. V nadaljevanju smo, z namenom določitve vrednosti EC_{50} , izvedli teste agonizma pri koncentracijah nižjih od 62,5 $\mu\text{mol/l}$. Vrednost EC_{50} smo določili dvakrat: $\text{EC}_{50}=29,94 \mu\text{M}$ ($R^2=0,934$) in $\text{EC}_{50}=30,7 \mu\text{M}$ ($R^2=0,923$). Glede na vrednosti EC_{50} lahko rečemo, da je spojina dokaj dober agonist receptorja TLR7.

SKLEP

V okviru magistrske naloge smo primerjali in vrednotili sintezne postopke za pripravo antagonistov TLR4, uspešno smo sintetizirali spojino **3** (2-(4-fluorofenil)-1-(5-(2-hidroksi-4,5-dimetoksibenzoil)pirimidin-2-il)gvanidin) in spojino **19** (*N,N*-Dietil-1-izobutil-1,4-dihidrokromen[3,4-*d*]imidazol-7-amin) ter ju biološko ovrednotili.

1. Za sintezo antagonistov receptorja TLR4 je v prvi stopnji sinteze kot reagent boljše uporabiti oksalil klorid razredčen s THF kot BTC. Pri uporabi oksalil klorida dobimo boljše izkoristke, izognemo se čiščenju produkta s kolonsko kromatografijo, kar pomeni manjšo porabo topil ter krajšo in enostavnejšo izolacijo. Poleg tega je oksalil klorid varnejši od BTC.

V prvi stopnji je opazen tudi vpliv substituentov na benzoilnem delu in sicer poteče reakcija z najslabšim izkoristkom pri derivatih 2-hidroxiacetofenona z metoksi skupino na mestu 4 (spojina **1** in spojina **6**) z najboljšim izkoristkom pa pri nesubstituiranem derivatu (spojina **4**) in 5-metoksi derivatu (spojina **8**).

2. V drugi stopnji se za boljši sintezni postopek izkaže postopek z uporabo mikrovalovnega reaktorja. V primerjavi s klasičnim postopkom se povečajo izkoristki (razen pri redkih izjemah), skrajša se čas reakcije, zmanjša se poraba topil, izognemo se čiščenju s kromatografsko kolono, kar pomeni manjšo porabo topil ter krajšo in enostavnejšo izolacijo.

Tako kot v prvi stopnji, tudi v tej opazimo vpliv substituentov. Ponovno poteče reakcija z najslabšim izkoristkom na 4-metoksi derivatu (spojina **7**).

3. Uspeli smo sintetizirati spojino **3**, vendar v premajhnih količinah za vse analize. Spojino smo tudi biološko ovrednotili in izkazalo se je, da je spojina citotoksična.
4. Uspešno smo sintetizirali spojino **19**. Spojina je zadovoljivo topna, netoksična pri koncentracijah pod 62,5 $\mu\text{mol/l}$ in agonist receptorja TLR7 ($\text{EC}_{50}=29,94 \mu\text{M}$ ($R^2=0,934$) in $\text{EC}_{50}=30,7 \mu\text{M}$ ($R^2=0,923$)). Iz rezultatov lahko sklepamo, da bazična skupina na mestu 7 ugodno vpliva na vezavo na TLR7 in bi bilo smiselno sintetizirati analoge spojine **19** z različnimi bazičnimi skupinami na mestu 7.

Zaključimo lahko, da smo ugotovili, kateri izmed postopkov je boljši oziroma bolj primeren za sintezo antagonistov TLR4 in da spojina **19** predstavlja dobro izhodišče za nadaljnje odkrivanje agonistov TLR7.

LITERATURA

- 1) Abbas A. K., Lichtman A. H., Pillai S.: Cellular and Molecular IMMUNOLOGY, Eight edition, Elsevier Saunders, Philadelphia, 2014: strani 1-9, 51-65
- 2) Male D., Brostoff J., Roitt D. B., Roitt I.: IMMUNOLOGY, Seventh edition, Mosby Elsevier, Philadelphia, 2006: strani 1, 8, 17, 127-128, 140-143
- 3) Akira S., Uematsu S., Takeuchi O.: Pathogen recognition and innate immunity. Cell 2006; 124(4): 783-801
- 4) Kanzler H., Barrat FJ., Hessel EM., Coffman RL.: Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. Nature Medicine 2007; 13(5): 552-9
- 5) Moresco EM., LaVine D., Beutler B.: Toll-like receptors. Current Biology 2011; 21(13): R488-93
- 6) Janssens S., Beyaert R.: Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. Clinical Microbiology Reviews 2003; 16(4): 637-46
- 7) Vozelj M.: Temelji imunologije, DZS, Ljubljana, 2000: strani 1-3
- 8) Kawai T., Akira S.: Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. Immunity 2011; 34(5): 637-50
- 9) Kaisho T., Akira S.: Toll-like receptor function and signaling. The Journal of Allergy and Clinical Immunology 2006; 117(5): 979-87
- 10) Takeda K., Akira S.: Toll-like receptors in innate immunity. International Immunology 2005 ; 17(1): 1-14
- 11) Dostopno na <http://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/642141/fig1/> (9.11.2015, 13:30)
- 12) Wang X., Smith C., Yin H.: Targeting Toll-like receptors with small molecule agents. Chemical Society Reviews 2013; 42(12): 4859-66
- 13) Krishnan J., Lee G., Choi S.: Drugs targeting toll-like receptors. Archives of Pharmacol Research 2009; 32(11): 1485-502
- 14) Narayanan KB., Park HH.: Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-mediated cellular signaling pathways. Apoptosis 2015; 20(2): 196-209

- 15) Vaure C., Liu Y.: A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Frontiers in Immunology* 2014; 5: 316
- 16) Trotta T., Porro C., Calvello R., Panaro MA.: Biological role of Toll-like receptor-4 in the brain. *Journal of Neuroimmunology* 2014; 268(1-2): 1-12
- 17) Leon CG., Tory R., Jia J., Sivak O., Wasan KM.: Discovery and development of toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists: a new paradigm for treating sepsis and other diseases. *Pharmaceutical Research* 2008; 25(8): 1751-61
- 18) Park BS., Song DH., Kim HM., Choi BS., Lee H., Lee JO.: The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 2009; 458(7242): 1191-5
- 19) Wittebole X., Castanares-Zapatero D., Laterre PF.: Toll-like receptor 4 modulation as a strategy to treat sepsis. *Mediators of Inflammation* 2010; 2010: 568396
- 20) Savva A., Roger T.: Targeting toll-like receptors: promising therapeutic strategies for the management of sepsis-associated pathology and infectious diseases. *Frontiers in Immunology* 2013; 4: 387
- 21) Novimmune reports successful completion of Phase I trial for NI-0101, dostopno na <http://www.novimmune.com/news/pr140805.html> (8.11.2015;18:47)
- 22) Monnet E., Shang L., Lapeyre G., deGraaf K., Hatterer E., Buatois V., Elson G., Ferlin W., Gabay C., Sokolove J., Jones S.A., Choy E.H., McInnes I.B., Kosco-Vilbois M., de Min C.: AB0451 NI-0101, a Monoclonal Antibody Targeting Toll Like Receptor 4 (TLR4) Being Developed for Rheumatoid Arthritis (RA) Treatment with a Potential for Personalized Medicine. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2015, 74: 1046
- 23) Švajger U., Brus B., Turk S., Sova M., Hodnik V., Anderluh G., Gobec S.: Novel toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists identified by structure- and ligand-based virtual screening. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2013; 70: 393-9
- 24) Teghanemt A., Zhang D., Levis EN., Weiss JP., Gioannini TL.: Molecular basis of reduced potency of underacylated endotoxins. *Journal of Immunology* 2005; 175(7): 4669-76

- 25) Artner D., Oblak A., Ittig S., Garate JA., Horvat S., Arrieumerlou C., Hofinger A., Oostenbrink C., Jerala R., Kosma P., Zamyatina A.: Conformationally constrained lipid A mimetics for exploration of structural basis of TLR4/MD-2 activation by lipopolysaccharide. *ACS Chemical Biology* 2013; 8(11): 2423-32
- 26) Chavez SA., Martinko AJ., Lau C., Pham MN., Cheng K., Bevan DE., Mollnes TE., Yin H.: Development of β -amino alcohol derivatives that inhibit Toll-like receptor 4 mediated inflammatory response as potential antiseptics. *Journal of Medicinal Chemistry* 2011; 54(13): 4659-69
- 27) Blasius AL., Beutler B.: Intracellular toll-like receptors. *Immunity* 2010; 32(3): 305-15
- 28) Drake MG., Kaufman EH., Fryer AD., Jacoby DB.: The therapeutic potential of Toll-like receptor 7 stimulation in asthma. *Inflammation & Allergy - Drug Targets* 2012; 11(6): 484-91
- 29) Temelji patološke fiziologije, 2. izdaja, UL MF Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2011: strani 214-217
- 30) Horton CG., Pan ZJ., Farris AD.: Targeting Toll-like receptors for treatment of SLE. *Mediators of Inflammation* 2010;2010.pii:498980
- 31) Celhar T., Fairhurst AM.: Toll-like receptors in systemic lupus erythematosus: potential for personalized treatment. *Frontiers in Pharmacology* 2014; 5: 265
- 32) Smits EL., Ponsaerts P., Berneman ZN., Van Tendeloo VF.: The use of TLR7 and TLR8 ligands for the enhancement of cancer immunotherapy. *The Oncologist* 2008; 13(8): 859-75
- 33) Schön MP., Schön M.: TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy. *Oncogene* 2008; 27(2): 190-9
- 34) Czarniecki M.: Small molecule modulators of toll-like receptors. *Journal of Medicinal Chemistry* 2008; 51(21): 6621-6
- 35) Priloga I, Povzetek glavnih značilnosti zdravila, dostopno na http://www.ema.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/EPAR_Product_Information/human/000179/WC500023122.pdf (13.11.2015; 9:23)
- 36) Schön MP., Schön M.: Imiquimod: mode of action. *The British Journal of Dermatology* 2007; 157 Suppl 2: 8-13

- 37) An Investigation of the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of GSK2245035 in Healthy Volunteers and Allergic Rhinitics, dostopno na <https://clinicaltrials.gov/ct2/show?term=GSK+2245035&rank=4> (25.11.2015;10:53)
- 38) A Study to Investigate the Safety, Pharmacodynamics and Efficacy Against Allergic Reactivity of Repeat Intranasal Administration of the TLR7 Agonist GSK2245035 in Subjects With Respiratory Allergies, dostopno na <https://clinicaltrials.gov/ct2/show?term=GSK+2245035&rank=1>(25.11.2015; 10:57)
- 39) To Investigate the Safety, Pharmacodynamics and Effect on Allergic Reactivity of the Toll-like Receptor 7 (TLR7) Agonist GSK2245035 in Subjects With Respiratory Allergies, dostopno na <https://clinicaltrials.gov/ct2/show?term=2245035&rank=2> (25.11.2015; 10:58)
- 40) 116958 Clinical Study Result Summary, dostopano na <https://gsk.sylogent.com/files/116958-Clinical-Study-Result-Summary.pdf> (26.11.2015; 11:45)
- 41) A 12-week Dose-Ranging Trial in Patients With Moderate to Severe Plaque Psoriasis (8400-201), dostopno na <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/study?term=imo-8400&rank=3> (24.11.2015; 14:40)
- 42) Idera Pharmaceuticals Announces Positive Top-line Data in Phase 2 Trial of IMO-8400, dostopno na <http://ir.iderapharma.com/phoenix.zhtml?c=208904&p=irol-newsArticle&ID=1913216> (24.11.2015; 14:33)
- 43) 3101 IMO-8400, an Antagonist of Toll-like receptors 7,8 and 9, in Development for Genetically Defined B-Cell Lymphomas: Safety and Activity in Phase 1 and Phase 2 Clinical trials, dostopno na <https://ash.confex.com/ash/2014/webprogram/Paper75944.html> (24.11.2015; 15:44)
- 44) Phase 1/2 Dose Escalation Study in Patients With Relapsed or Refractory Waldenstrom's Macroglobulinemia (8400-401), dostopno na <https://clinicaltrials.gov/ct2/show?term=imo8400+phase+1&rank=1>(24.11.2015; 15:46)
- 45) Dose Escalation Study in Patients With Relapsed or Refractory DLBCL and MyD88L265P Mutation, dostopno na <https://clinicaltrials.gov/ct2/show?term=imo-8400+phase+1&rank=2> (24.11.2015; 15:57)

- 46) Švajger U., Horvat Ž., Knez D., Rožman., Turk S., Gobec S.: New antagonists of toll-like receptor 7 discovered through 3Dligand-based virtual screening. *Medicinal Chemistry Research* 2015; 24: 362-371
- 47) Su W. K., Li Z. H., Zhao L. Y.: One pot synthesis of 3-formylchromones from bis-(trichloromethyl) carbonate/DMF. *Organic Preparations and Procedures International: The New Journal of Organic Synthesis*, 2007; 39; 495-502
- 48) Nohara A., Umetani T., Sanno Y.: Studies on antianaphylactic agents-I: A facile synthesis of 4-oxo-4*H*-1-benzopyran-3-carboxaldehydes by Vilsmeier reagents. *Tetrahedron*, 1974; 30: 3553-3561
- 49) Raju B. C., Nageswara Rao R., Suman P., Yogeewari P., Sriram D., Shaik T. B., Vardhan Kalivendi S.: Synthesis, structure–activity relationship of novel substituted 4*H*-chromen-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylates as potential anti-mycobacterial and anticancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2011; 21: 2855-2859
- 50) Zajc P. Sinteza in vrednotenje pirimidino-gvanidinskih antagonistov toll-u podobnega receptorja 4. Magistrska naloga. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, 2013
- 51) Sachdeva N., Dolzhenko A. V., Keung Chui W.: Regioselective synthesis of pyrimido [1,2-*a*] [1,3,5] triazin-6-ones via reaction of 1-(6-oxo-1,6-dihidropyrimidin-2-yl)guanidines with triethylorthoacetate: observation of an unexpected rearrangement. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2012; 10: 4586-4596
- 52) Sova M., Rožman K., Švajger U., Rožman P., Gobec S.: Synthesis and Biological Evaluation of N-Aryl-N'-(5-(2-hydroxybenzoyl)pyrimidin-2-yl)guanidines as Toll-Like Receptor 4 Antagonists. *Medicinal Chemistry*, 2016; 12 (E-pub ahead of print); doi: 10.2174/1573406412666160314151900
- 53) Dückert H.; Khedkar V., Waldmann H., Kumar K.: Lewis base catalyzed [4+2] annulation of electron-deficient chromone-derived heterodienes and acetylenes. *Chemistry-A European Journal*, 2011; 17(18): 5130-5137
- 54) Plaskon A. S., Grygorenko O. O., Ryabukhin S. V.: Recyclizations of 3-formylchromones with binucleophiles. *Tetrahedron*, 2012; 68: 2743-2757

- 55) Randhavane P. V., Kale S. B., Jaghani S. G., Karale B. K.: Conversion of 3-formylchromone into biologically important pyrimidines and pyrazoles. *Indian Journal of Heterocyclic Chemistry*, 2007; 17: 153-156
- 56) Hertiš U. Sinteza in vrednotenje derivatov 2-(5-benzoilpirimidin-2-il) gvanidina kot potencialnih antagonistov toll-u podobnega receptorja 4. Magistrska naloga. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, 2014
- 57) Meng T., Zou Y., Khorec O., Jin Y., Zhou H., Zhang, Y., Hu D., Ma L., Wang X., Shen J.: Simple and Efficient Copper(I)-Catalyzed Access to Three Versatile Aminocoumarine-Based Scaffolds using Isocynoacetate. *Advanced Synthesis & Catalysis* 2011, 353: 918-24
- 58) Weber L.: Multi-component reactions and evolutionary chemistry. *Drug Discovery Today* 2002; 7(2): 143-7
- 59) Dömling A.: The discovery of new isocyanide-based multi-component reactions. *Current Opinion in Chemical Biology* 2000; 4(3): 318-23.
- 60) Ruijter E., Orru R. V. A.: Multicomponent reactions—opportunities for the pharmaceutical industry. *Drug Discovery Today: Technologies* 2013, 10: e15-20
- 61) Solomons T.W.G., Fryhle C.B.: *Organic chemistry* 7E, John Wiley & Sons, New York, 2000:829-831
- 62) Clayden J., Greeves N., Warren S., Wothers P.: *Organic Chemistry* 1E, Oxford University Press, New York, 2001: 288-290
- 63) Gartnar M. Sinteza in vrednotenje modulatornega delovanja derivatov kromeno [3,4-d]imidazol-4-ona na Toll-u podobnem receptorju 7. Magistrska naloga. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, 2015.