

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA JUG

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA JUG

**SINTEZA IN VREDNOTENJE POTENCIALNIH LIGANDOV  
TOLL-U PODOBNEGA RECEPTORJA 7, ODKRITIH Z  
VIRTUALNIM REŠETANJEM NA OSNOVI LIGANDA**

**SYNTHESIS AND EVALUATION OF TOLL LIKE  
RECEPTOR 7 POTENTIAL LIGANDS, DISCOVERED  
WITH LIGAND-BASED VIRTUAL SCREENING**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Laboratorijski del magistrske naloge sem opravila na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani ter na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino pod **mentorstvom doc. dr. Mateja Sove, mag. farm.** in **somentorstvom doc. dr. Urbana Švajgerja, mag. farm.** Določene spektroskopske meritve so bile izvedene tudi v Centru za masno spektrometrijo Inštituta Jožef Štefan v Ljubljani.

### **ZAHVALA**

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Mateju Sovi, mag. farm. in somentorju doc. dr. Urbanu Švajgerju, mag. farm. za organizacijo, vodenje, dostopnost, potrpežljivost in pomoč pri vseh segmentih nastajanja magistrske naloge ter za nova znanja in spretnosti, ki sem jih pri tem razvila in pridobila. Moja velika zahvala za vso podporo, pomoč in spodbudo gre seveda tudi mojim staršem in starim staršem ter kolegicam, predvsem Lei, Kaji, Sari, Diani in Urški, s katerimi smo skupaj premagovale ovire, sodelovale in si tekom študijskih let delile veliko lepih trenutkov.

### **IZJAVA**

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

**Urška Jug**

**Predsednica komisije: prof. dr. Julijana Kristl, mag. farm.**

**Član komisije: doc. dr. Bojan Doljak, mag. farm.**

# KAZALO VSEBINE

KAZALO SLIK.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
POVZETEK .....	VIII
ABSTRACT .....	IX
SEZNAM OKRAJŠAV .....	XI
1. UVOD.....	1
1.1 IMUNSKI SISTEM (IS).....	1
1.1.1 URAVNOVEŠENOST IMUNSKEGA SISTEMA .....	1
1.1.2 PRIROJENI IN PRIDOBLJENI IMUNSKI SISTEM .....	2
1.1.2.1 PREPOZNAVANJE PATOGENOV JE DEL PRIROJENEGA IMUNSKEGA ODZIVA .....	3
1.1.2.2 TOLL-U PODOBNI RECEPTORJI.....	4
1.1.2.3 TLR ZA NUKLEINSKE KISLINE .....	8
1.2 TLR7.....	9
1.2.1 LIGANDI TLR7 .....	9
1.2.1.1 IMIDAZOKINOLINI.....	10
1.2.1.2 GVANOZINSKI ANALOGI .....	10
1.2.1.3 NARAVNI LIGANDI, SINTETIZIRANI OLIGONUKLEOTIDI IN MODIFIKACIJE .....	11
1.2.1.4 OSTALI DIREKTNI IN INDIRECTNI ANTAGONISTI.....	11
1.2.2 INDIKACIJE ZA AGONISTE TLR7 .....	11
1.2.2.1 ASTMA .....	12
1.2.2.2 RAK.....	12
1.2.2.3 INFEKCIJSKE BOLEZNI .....	13
1.2.3 AGONISTI ALI ANTAGONISTI TLR7? .....	14
1.2.4 INDIKACIJE ZA ANTAGONISTE TLR7 .....	15
1.2.4.1 SISTEMSKI ERITEMATOZNI LUPUS .....	15
2. NAČRT ZA DELO.....	16
3. MATERIALI IN METODE .....	17
3.1 MATERIALI – sintezni del.....	17
3.2 LABORATORIJSKA OPREMA – sintezni del.....	17
3.3 METODE – sintezni del .....	18
3.3.1 DOLOČANJE TEMPERATURE TALIŠČA.....	18
3.3.2 KROMATOGRFSKE METODE .....	18
3.3.2.1 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA (TLC) .....	18

3.3.2.2 KOLONSKA KROMATOGRAFIJA .....	18
3.3.2.3 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE ZMOGLJIVOSTI (HPLC) .....	18
3.3.3 SPEKTROSKOPSKE METODE .....	19
3.3.3.1 JEDRSKA MAGNETNA REZONANCA (NMR).....	19
3.3.3.2 INFRARDEČA SPEKTROSKOPIJA (IR) .....	20
3.3.3.3 MASNA SPEKTROMETRIJA (MS).....	20
3.3.4 PRIKAZ REAKCIJSKIH SHEM, POIMENOVANJE SPOJIN PO IUPAC-U IN DOLOČANJE MOLEKULSKIH MAS .....	20
3.4 MATERIALI – biološki del .....	20
3.5 LABORATORIJSKA OPREMA – biološki del .....	21
4. EKSPERIMENTALNO DELO .....	22
4.1 SINTEZA, IZOLACIJA IN ANALITIKA SPOJIN .....	22
4.1.1 SINTEZA 7-hidroksi-1-izobutilkromeno[3,4- <i>d</i> ]imidazol-4(1 <i>H</i> )-ona in njegovega derivata 1-izobutil-4-okso-1,4-dihidrokromeno[3,4- <i>d</i> ]imidazol-7-il acetata .....	22
4.1.2 SINTEZA 7,8-dihidroksi-1-izobutilkromeno[3,4- <i>d</i> ]imidazol-4(1 <i>H</i> )-ona.....	25
4.1.3 SINTEZA 8-hidroksi-1-izobutilkromeno[3,4- <i>d</i> ]imidazol-4(1 <i>H</i> )-ona .....	26
4.2 BIOLOŠKO TESTIRANJE SPOJIN .....	29
4.2.1 PRIPRAVA RAZTOPIN TESTIRANIH SPOJIN V DMSO IN PREVERJANJE TOPNOSTI V CELIČNEM GOJIŠČU .....	29
4.2.2 ROKOVANJE S CELICAMI.....	31
4.2.3 TEST CITOTOKSIČNOSTI .....	34
4.2.4 PRELIMINARNI TEST AGONIZMA .....	36
4.2.5 PRELIMINARNI TEST ANTAGONIZMA .....	38
4.2.6 DOLOČANJE EC <sub>50</sub> AGONISTOV .....	39
4.2.7 DOLOČANJE EC <sub>50</sub> ANTAGONISTOV .....	40
5. REZULTATI IN RAZPRAVA .....	42
5.1 SINTEZA, IZOLACIJA IN ANALITIKA SPOJIN.....	42
5.1.1 SINTEZA 7-hidroksi-1-izobutilkromeno[3,4- <i>d</i> ]imidazol-4(1 <i>H</i> )-ona in njegovega derivata 1-izobutil-4-okso-1,4-dihidrokromeno[3,4- <i>d</i> ]imidazol-7-il acetata .....	43
5.1.2 SINTEZA 7,8-dihidroksi-1-izobutilkromeno[3,4- <i>d</i> ]imidazol-4(1 <i>H</i> )-ona.....	44
5.1.3 SINTEZA 8-hidroksi-1-izobutilkromeno[3,4- <i>d</i> ]imidazol-4(1 <i>H</i> )-ona .....	44
5.2 BIOLOŠKO TESTIRANJE SPOJIN .....	45
5.2.1 TOPNOST SPOJIN .....	46
5.2.2 ROKOVANJE S CELICAMI IN SPLOŠNO O TESTIRANJIH.....	47
5.2.3 CITOTOKSIČNOST SPOJIN .....	48

5.2.4 TESTI AKTIVNOSTI SPOJIN .....	50
5.2.5 AGONIZEM SPOJIN.....	51
5.2.6 ANTAGONIZEM SPOJIN .....	54
5.3 ODNOS MED STRUKTURO IN LASTNOSTMI TER MED STRUKTURO IN DELOVANJEM SPOJIN (SAR).....	55
6. SKLEP.....	59
7. LITERATURA.....	60
PRILOGE .....	66

## KAZALO SLIK

Slika 1: Osnovni mehanizmi prirojene in pridobljene imunosti. ....	2
Slika 2: Struktura TLR. ....	5
Slika 3: TLR signaliziranje. ....	5
Slika 4: Vzбудitev Th1 odgovora po vezavi imidazokinolinov na pDC in mDC. ....	7
Slika 5: Nukleozidi, iz katerih se po fosforilaciji tvorijo gradniki RNA nukleotidi. ....	9
Slika 6: Imikvimod kot spojina vodnica za razvoj novih učinkovin. ....	16
Slika 7: PRVA STOPNJA: Sinteza metil 5-(4-(benziloksi)-2-hidroksifenil)-1-izobutil-1 <i>H</i> -imidazol-4-karboksilata. ....	22
Slika 8: DRUGA STOPNJA: Sinteza 7-hidroksi-1-izobutilkromeno[3,4- <i>d</i> ]imidazol-4(1 <i>H</i> )-ona. ....	23
Slika 9: TRETJA STOPNJA: Sinteza 1-izobutil-4-okso-1,4-dihidrokromeno[3,4- <i>d</i> ]imidazol-7-il acetata. ....	24
Slika 10: PRVA STOPNJA: Sinteza metil 1-izobutil-5-(2,4,5-trihidroksifenil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-karboksilata. ....	25
Slika 11: PRVA STOPNJA: Sinteza metil 5-(2,5-dihidroksifenil)-1-izobutil-1 <i>H</i> -imidazol-4-karboksilata. ....	26
Slika 12: DRUGA STOPNJA: Teoretična sinteza 8-hidroksi-1-izobutilkromeno[3,4- <i>d</i> ]imidazol-4(1 <i>H</i> )-ona. ....	27
Slika 13: Mikroskopski pregled celic na Bürker-Türkovi ploščici. ....	33
Slika 14: Struktura diazo spojine triptanskega modrila z IUPAC poimenovanjem 3,3'-[(3,3'-dimetilbifenil-4,4'-diil)didiazen-2,1-diil]bis(5-amino-4-hidroksinaftalen-2,7-disulfonska kislina). ....	33
Slika 15: Reakcijska shema pretvorbe MTS v formazan v prisotnosti mitohondrijske reduktaze in PMS. ....	35
Slika 16: Dokazna reakcija za določanje aktivnosti spojin potencialnih agonistov TLR7. ....	37
Slika 17: Mehanizem poteka 1. stopnje reakcije izhajajoč iz enostavnega salicilaldehida. ....	42
Slika 18: Reakcija z uporabljenimi reagenti pri navedenih pogojih je neuspešna. ....	44
Slika 19: Dejanski potek sinteze spojine 7 v eni stopnji. ....	45
Slika 20: Citotoksičnost pri C <sub>max</sub> glede na topnost. ....	48
Slika 21: Citotoksičnost pri C <sub>max</sub> /2 glede na topnost. ....	48
Slika 22: Citotoksičnost pri C <sub>max</sub> /4 glede na topnost. ....	49
Slika 23: Agonizem pri preliminarnem testu pri C <sub>max</sub> glede na citotoksičnost. ....	51

Slika 24: Agonizem pri ponovljenem preliminarnem testu pri C <sub>max</sub> glede na citotoksičnost. ....	51
Slika 25: Antagonizem pri preliminarnem testu pri C <sub>max</sub> glede na citotoksičnost. ....	54
Slika 26: Antagonizem pri ponovljenem preliminarnem testu pri C <sub>max</sub> glede na citotoksičnost. ....	54
Slika 27: Strukturna formula IMIKVIMODA. ....	56
Slika 28: Struktura spojine 9 z oštevilčenimi mesti kot osnova za razvoj derivatov 6 in 8. ....	56



## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Toll-u podobni receptorji in njihovi ligandi. ....	6
Preglednica II: Podatki o spojini 2. ....	23
Preglednica III: Podatki o spojini 7. ....	28
Preglednica IV: Strukturne formule testiranih spojin. ....	30
Preglednica V: Največje koncentracije spojin v DMSO oz. koncentracije osnovnih raztopin, pri katerih so spojine še topne pri 25 °C. ....	46
Preglednica VI: Koncentracije spojin v celičnem gojišču, pri katerih ni citotoksičnosti in delež DMSO v celičnem gojišču zaradi različnih volumnov raztopljenih raztopin spojin. ....	50
Preglednica VII: Strukture in analitika aktivnih spojin. ....	52
Preglednica VIII: <sup>1</sup> H-NMR in <sup>13</sup> C-NMR analitika za spojini 712 in 421. ....	53
Preglednica IX: Rezultati EC <sub>50</sub> po dveh testiranjih ter R <sup>2</sup> pripadajočih krivulj. ....	53

## POVZETEK

Toll-u podobni receptorji (TLR) so namenjeni prepoznavi specifičnih vzorcev mikrobov in posledični vzbuditvi imunskega odziva. Nahajajo se predvsem v/na celicah imunskega sistema ter na področjih organizma, ki prihajajo prva v stik z zunanjimi mikrobi. Človeški organizem ima 10 različnih funkcionalnih TLR (TLR1–TLR10), ki prepoznavajo različne ligande širokega spektra patogenov. Po aktivaciji teh receptorjev se prek kaskadnih reakcij aktivirajo geni, ki nosijo zapis za provnetne proteine. Pri boleznih, ko je potrebno imunski sistem spodbuditi (infekcije, tumorji), je smiselno zdravljenje z agonisti. V primeru prekomerne imunske aktivacije, ko TLR npr. zaznavajo gostiteljeve lastne komponente (eritematozni lupus, revmatoidni artritis), pa je smiselno zdravljenje z antagonisti.

V magistrskem delu smo se osredotočili na ligande znotrajceličnih TLR7, katerih naravni ligand je enoverižna RNA. Kristalna struktura TLR7 še ni bila določena, zato smo obravnavali spojine, poiskane z virtualnim reševanjem na osnovi že znanega agonista imikvimoda. Načrtovanje novih učinkovin, ki bi bile bolj selektivne, z manj neželenimi učinki kot dosedanje in ki bi jih lahko vnašali *per os*, je glede na njihove številne indikacije zelo zaželeno. V prvem sinteznem delu smo izvedli tri multikomponentne reakcije izhajajoč iz različnih izhodnih benzaldehidov. Z reakcijo, ki je presenetljivo do končnega produkta vodila v le eni stopnji, nam je uspelo sintetizirati novo spojino 8-hidroksi-1-izobutilkromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-on. V drugem delu magistrske naloge smo določili njeno agonistično aktivnost na TLR7 v okviru bioloških testiranj, kjer smo poleg sintetizirane spojine *in vitro* testirali še 24 drugih potencialnih agonistov oz. antagonistov. Izvedli smo teste topnosti, citotoksičnosti, preliminarne teste agonizma in antagonizma ter določili vrednosti EC<sub>50</sub> aktivnih spojin. Agonistično delovanje so izkazovale še štiri druge spojine, antagonistično pa dve. Tri spojine so se z zelo nizkimi vrednostmi EC<sub>50</sub> v mikromolarnem območju izkazale za močne agoniste, pri izračunu EC<sub>50</sub> antagonistov pa smo imeli težave zaradi lažno pozitivnih rezultatov, ki so bili posledica vpliva topila dimetil sulfoksida.

Razlike v strukturi, ki vodijo od agonizma do antagonizma in do neaktivnih spojin, so izjemno majhne in težko določljive, zato bi bila potrebna nadaljnja preučevanja. Pri obravnavanih spojinah smo opazili, da so agonisti v primerjavi z antagonisti bolj lipofilni.

**Ključne besede:** agonisti in antagonisti TLR7, imunomodulacija, virtualno reševanje na osnovi liganda, derivati kromeno(3,4-*d*)imidazol-4(1*H*)-ona.

## ABSTRACT

Toll-like receptors (TLR) are meant for the identification of specific microbial motifs and the resulting activation of the immune response. They are located primarily in/on cells of the immune system, and in the areas of the body that come first in contact with external microbes. The human organism has 10 different functional TLR (TLR1–TLR10), which recognize the different ligands of the broad spectrum of pathogens. After the activation of these receptors, the cascade reactions enhance the transcription of the genes encoding the pro-inflammatory proteins. In diseases that require a stimulation of the immune system (infections, tumors), treatment with agonists is reasonable. In the case of excessive immune activation, for example when TLR detect the host's own components (lupus erythematosus, rheumatoid arthritis), treatment with antagonists is reasonable.

In the thesis, we focused on ligands of intracellular TLR7, that naturally recognises single-stranded RNA. The crystal structure of TLR7 has not yet been determined, therefore, virtual screening based on structure of the already known agonist imiquimod was performed to obtain hit compounds. The design of new compounds, which would be more selective and have less side effects than the previous ones and that may be administered *per os*, is encouraged due to their numerous indications. In the first synthetic part, we performed three multicomponent reactions starting from different benzaldehydes. The reaction, that surprisingly led to the final product in a single step, gave a new compound 8-hydroxy-1-isobutylchromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-one. In the second part of the master's thesis, TLR7 agonist activity was determined in biological assays, where, besides the synthesized compound, 24 other potential agonists or antagonists were tested *in vitro*. We carried out the solubility tests, cytotoxicity evaluation, a preliminary assay for agonism or antagonism and determined the EC<sub>50</sub> values for active compounds. Four other compounds demonstrated agonist activity, whereas two demonstrated antagonistic activity. Three compounds with very low EC<sub>50</sub> values in the micromolar range proved to be potent agonists. On the other hand, we had problems calculating the EC<sub>50</sub> values of antagonists because of false-positive results due to the interference of the dimethyl sulfoxide solvent.

The differences in the structure, leading from agonism to antagonism and to inactive compounds are extremely small and difficult to resolve, therefore, further studies are required. In the present study, we observed that the agonists are more lipophilic in comparison with antagonists.

**Keywords:** TLR7 agonists and antagonists, immunomodulation, ligand-based virtual screening, chromeno(3,4-*d*)imidazol-4(1*H*)-one derivatives.

## SEZNAM OKRAJŠAV

ACN	acetonitril
ANG	angleško
APC	antigene predstavljajoča celica
ATR	oslabljen popolni odboj (ang: attenuated total reflectance)
CD4+	zrela celica T pomagalka, ki izraža CD4 glikoprotein
CD8+	citotoksična celica T, ki izraža CD8 glikoprotein
CpG	sekvence citozinskega in gvaninskega nukleotida v zaporedju v nukleinski kislini
CTL	citotoksični limfocit T
C <sub>max</sub>	najvišja koncentracija glede na topnost oz. citotoksičnost
DAMP	s poškodbo povezani molekularni vzorec / z nevarnostjo povezani molekularni vzorec (ang: damage-associated molecular pattern / danger-associated molecular pattern)
DC	dendritična celica
DKM	diklorometan
DMEM	celično gojišče z visoko vsebnostjo glukoze in glutamina ter brez piruvata (ang: Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang: deoxyribonucleic acid)
DPBS	raztopina fosfatnega pufra (ang: Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)
dUTPaza	deoksiuridin trifosfataza
EC <sub>50</sub>	koncentracija spojine, potrebna za polovični maksimalni biološki odgovor, ki ga vzbudi ista spojina v višjih koncentracijah (srednja efektivna koncentracija; ang: median effective concentration)
ESI	ionizacija z razprševanjem (ang: electrospray ionization)
FBS	goveji serum zarodka (ang: fetal bovine serum)
FC $\gamma$ R	Fc- $\gamma$ receptorji za IgG
FFA	Fakulteta za farmacijo
HEK	celična linija izhajajoča iz človeških embrionalnih ledvičnih celic (ang: human embryonic kidney cell line)
HIV	virus humane imunske pomanjkljivosti (ang: human immunodeficiency virus)

HLA	humani levkocitni antigen na celicah
HMGB1	skupina visokomobilnih beljakovin (ang: high mobility group box 1 protein)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (ang: high performance liquid chromatography)
HRMS	masna spektrometrija visoke ločljivosti (ang: high-resolution mass spectrometry)
HSP	proteini vročinskega šoka (ang: heat shock proteins)
hTLR7	humani Toll-u podobni receptor 7
IFN	interferon
IgG	imunoglobulin G
IL	interlevkin
IR	infrardeč
IRM	modifikatorji imunskega sistema (ang: immune response modifiers)
IS	imunski sistem
IUPAC	mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo (ang: International Union of Pure and Applied Chemistry)
<i>J</i>	sklopitvena konstanta
LAF	laminarni pretok zraka (ang: laminar air flow)
LPS	lipopolisaharidi
mDC	mieloidna dendritična celica
MHC	glavni histokompatibilni kompleks (ang: major histocompatibility complex)
MM	molekulska masa
MS	masna spektrometrija
MTS	barvilo s tetrazolijevo soljo MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfenil)-2 <i>H</i> -tetrazol]
MyD88	diferenciacijski mieloidni protein 88 (ang: myeloid differentiation primary response gene 88)
NADH	reducirana oblika nikotinamid adenin dinukleotida
NADPH	reducirana oblika nikotinamid adenin dinukleotid fosfata
NF-κB	jedrni dejavnik kapa B (ang: nuclear factor kappa B)
NK	celica naravna ubijalka (ang: natural killer cell)
NLR	NOD-u podobni receptor (ang: NOD-like receptor)
NMR	jedrska magnetna resonanca (ang: nuclear magnetic resonance)

NS3	nestrukturni protein 3
ODN	oligodeoksiribonukleotid
OH	hidroksi skupina
ORN	oligoribonukleotid
PAMP	s patogeni povezani molekulski vzorec (ang: pathogen-associated molecular pattern)
pDC	plazmacitoidna dendritična celica
PMS	fenazin metosulfat (ang: phenazine methosulfate)
PRR	receptorji za prepoznavo molekulskih vzorcev (ang: pattern recognition receptors)
Rf	retencijski faktor
RLR	RIG-1 podobni receptor (ang: retinoic acid inducible gene 1-like helicase receptor, RIG-1-like receptor)
RNA	ribonukleinska kislina (ang: ribonucleic acid)
SAR	odnos med strukturo in delovanjem (ang: structure activity relationship)
SEAP	sekretorna embrionska alkalna fosfataza (ang: secreted embryonic alkaline phosphatase)
siRNA	mala interferirajoča RNA (ang: small interfering RNA)
SLE	sistemski eritematozni lupus (ang: systemic lupus erythematosus)
snRNP	mali jedrni ribonukleoprotein (ang: small nuclear ribonucleic protein)
ssRNA	enoverižna RNA (ang: single stranded RNA)
TAA	s tumorji povezani antigeni (ang: tumor associated antigens)
TFA	trifluoroocetna kislina (ang: trifluoroacetic acid)
Th	celica T pomagalka (ang: helper T cell)
TIR	Toll-IL-1 receptorska domena
TLC	tankoplastna kromatografija (ang: thin liquid chromatography)
TLR	Toll-u podobni receptor (ang: Toll-like receptor)
TMS	tetrametilsilan
TNF- $\alpha$	tumorje nekrotizirajoči dejavnik $\alpha$ (ang: tumor necrosis factor $\alpha$ )
T <sub>tal</sub>	temperatura tališča

# 1. UVOD

## 1.1 IMUNSKI SISTEM (IS)

Živa bitja smo z evolucijo razvila homeostatski sistem ter s tem sposobnost zagotavljanja stabilnega notranjega okolja kljub neprestanim spremembam v zunanjem okolju. Tako lahko preživimo različne preizkušnje in ohranjamo fizično blagostanje. Z evolucijo smo postali tudi vedno bolj odporni, razvil se nam je namreč biološki mehanizem vnetnega oziroma imunskega odziva, ki služi obrambi pred različnimi patogeni in toksini ali borbi z njimi in dosegu ozdravitve. Vnetni odziv torej ni bolezen, temveč je za preživetje nujno potreben obrambni mehanizem. Sestavljen je iz reakcij nespecifičnega, prirojenega IS in iz imunske specifičnih reakcij pridobljenega IS. Delujeta povezano s pomočjo različnih mediatorjev in mehanizmov. (1, 2)

### 1.1.1 URAVNOVEŠENOST IMUNSKEGA SISTEMA

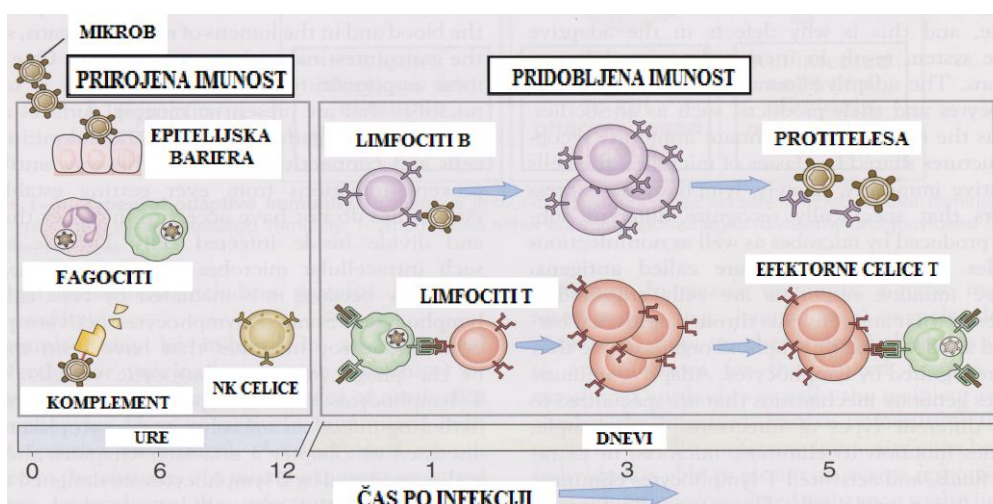
Kljub pomembni vlogi za preživetje posameznika, je potrebno pravo ravnovesje v IS. Žal je velikokrat imunski odziv neustrezen, bodisi prekomeren bodisi premajhen, in povzroča veliko težav. (1, 2) O prekomernem, neželenem imunskem odzivu lahko govorimo pri pojavu avtoimunskih bolezni ter kroničnih vnetnih stanj, kakor tudi pri zavrnitvenih reakcijah pri transplantacijah. Odziv se lahko usmeri proti antigenom na gostiteljevih lastnih celicah oziroma proti antigenom neskladnih tkiv. Imunski odziv je lahko prekomeren in s tem neustrezen tudi pri alergijah, ko se po nepotrebnem aktivira, npr. ob stiku organizma s cvetnim prahom. V teh primerih vodi do različnih vnetnih bolezni, ki so lahko ogrožajoče za življenje. Izzvano vnetje samo po sebi povzroča težave in je lahko odgovorno za glavne simptome določene bolezni. Primer, ko se to zgodi akutno, je anafilaktični šok, primera, ko se to dogaja kronično, pa sta astma in revmatoidni artritis. (1, 2) Pri infekcijah s patogeni ali pri tumorjih pa je zaželeno okrepiti IS pacientov, da se uspešneje borijo z boleznijo. Ljudje z IS nizke sposobnosti so pacienti na imunosupresivni terapiji z glukokortikoidi ter bolniki, okuženi z virusom HIV (virus humane imunske pomanjkljivosti). Okužijo se lahko z običajno neškodljivimi nepatogenimi bakterijami zunanjega okolja ter s komenzali, bakterijami normalne človeške flore, ki pri ljudeh s pravilno uravnanim IS ne povzročajo nobene škode, temveč živijo v sožitju z njimi. (2)



## 1.1.2 PRIROJENI IN PRIDOBLJENI IMUNSKI SISTEM

**Prirojeni IS** je sestavljen iz epitelijskih pregrad (koža, sluznica prebavnega in dihalnega trakta), tkivnih in cirkulirajočih celic ter iz plazemskih proteinov. (3) Premore ga večina večceličnih organizmov in je prva linija obrambe. Vključuje spremembe žilnega sistema (širjenje žil, povečano prepustnost postkapilarnih venul, izhajanje tekočine v izvenžilni prostor), aktivacijo tkivnih celic (žilnih endotelijskih celic, mastocitov, makrofagov, dendritičnih celic (DC)) in belih krvnih celic (nevtrofilcev, monocitov, celic ubijalk). Slednje se zbirajo v področju vnetja, ubijajo mikroorganizme in okužene celice ter sproščajo razne mediatorje, kot so eikozanoidi, citokini, histamin in neuropeptidi. (1, 2) Omenjene bele krvne celice so glavne efektorne celice prirojenega IS (slika 1). (3) Mediatorji, izhajajoči iz plazme, so komponente komplemanta in kaskade kinin-kalikrein. (1, 2)

**Pridobljeni IS** se je evlucijsko gledano pojavil šele pri vretenčarjih in predstavlja drugo linijo obrambe. Sestavljata ga začetna in efektorna faza, ki ju uravnava različni citokini. Glavne celice so limfociti (celice T in celice B). Th1 in Th2 sta diferencirani vrsti celic T pomagalk, ki se ločita po naboru citokinov, ki jih sproščata. Celice Th1 aktivirajo in sodelujejo pri celični imunosti, celice Th2 pa aktivirajo humoralno, s protitelesi povezano imunost, tako da spodbudijo proliferacijo limfocitov B, ki dozori v plazmatke, ki tvorijo protitelesa (slika 1). Ob prvem stiku z antigenom pride do nastanka spominskih limfocitov B in T. To pospeši imunski odziv pri ponovnem stiku z antigenom. (1, 2)



Slika 1: Osnovni mehanizmi prirojene in pridobljene imunosti. (4)

Povezavo med prirojenim, nespecifičnim in pridobljenim, specifičnim IS lahko prikažemo na primeru fagocita (makrofag, nevtrofilec), ki prepozna vzorce mikroba in ga v okviru prirojenega nespecifičnega imunskega odziva fagocitira. Mikroba nato predstavi limfocitom T, ki so del pridobljenega specifičnega IS. Limfociti T lahko tudi spodbudijo fagocite, da postanejo bolj aktivni in učinkoviti. Protitelesa pridobljenega IS lahko opsonizirajo (prekrijejo) mikrobo in spodbudijo fagocitozo, saj fagociti poleg receptorjev za vzorce mikrobov na svoji površini izražajo tudi receptorje za Fc regijo protiteles. Prirojeni IS daje tudi signale za proliferacijo in diferenciacijo od antigenov specifičnih celic T in B pridobljenega IS. Govorimo o dvosignalni hipotezi aktivacije limfocitov. S tem se omeji možnost napada pridobljenega IS na lastne antigene. Avtoimunske bolezni so namreč največkrat posledica neustreznih odzivov pridobljenega IS. (3) Delitev na nespecifični prirojeni in specifični pridobljeni imunski odziv je glede na vse omenjene povezave med njima umetna, a omogoča lažje in bolj sistematično spoznavanje IS. (5)

### ***1.1.2.1 PREPOZNAVANJE PATOGENOV JE DEL PRIROJENEGA IMUNSKEGA ODZIVA***

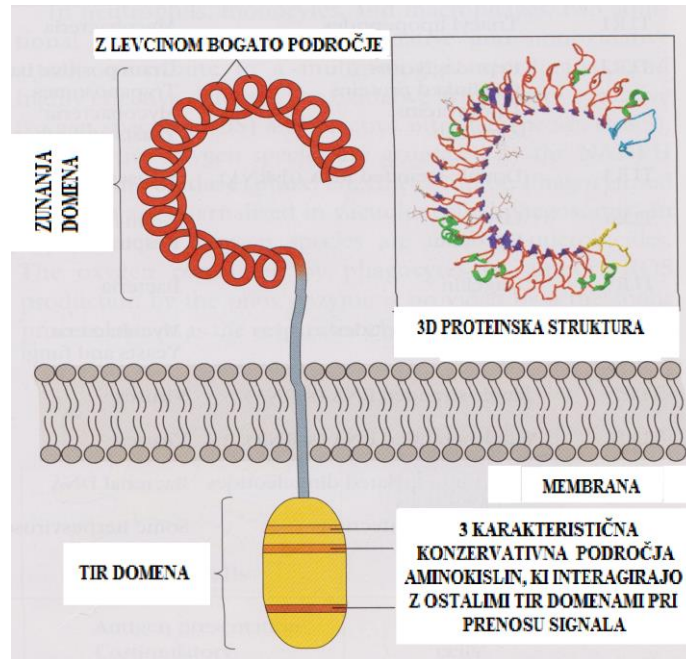
Gostiteljev IS mora ločiti med patogenom in svojimi lastnimi celicami z namenom, da pravilno usmeri imunski odgovor proti patogenu. V sklopu prirojenega imunskega odziva lahko govorimo o receptorjih za prepoznavo molekularnih vzorcev PRR, ki prepoznavajo določen vzorec mikroba. (1) Za razliko od antigeno specifičnih receptorjev limfocitov B in T gre v primeru PRR za filogenetsko starejše »širokospektralne mehanizme« prepoznave ligandov. (5) Specifičnim vzorcem na virusih, bakterijah in glivah, ki se ujemajo s PRR, pravimo PAMP (s patogeni povezani molekularni vzorci). (1) Gre za stabilne vzorce, ki so za mikrobo nujno potrebni, saj so pomembni za njihovo rast in za celovitost celičnih sten in zato ne prihaja do mutacij. Z mutacijami se torej mikrobi lažje izognejo pridobljenemu kot prirojenemu IS. (3, 5) Med PAMP sodijo odseki, prisotni v proteinih, nukleinski kislini, lipidih in karbohidratih mikrobov (preglednica I). (6) Ustrezno poimenovanje vzorcev na mikrobih bi bilo tudi MAMP (z mikrobi povezani molekularni vzorci), saj receptorji prepoznavajo mikrobo ne glede na njihovo stopnjo patogenosti. (7) Veliko mikroorganizmov, kot so npr. nepatogeni koki, se najverjetneje odstrani iz gostiteljevih tkiv že prek vpliva na PRR brez izkoriščanja imunskih specifičnih reakcij. (5) PRR najdemo v krvnem obtoku in v tkivnih tekočinah ali pa se nahajajo na

celični površini in v znotrajceličnih prostorih. (8) Največje tri družine PRR predstavljajo NLR (citoplazemski NOD-u podobni receptorji), RLR (RIG-1 podobni receptorji) in TLR (Toll-u podobni receptorji). Pri ljudeh je bilo določenih 23 različnih NLR, 3 različni RLR in 10 različnih TLR. (6)

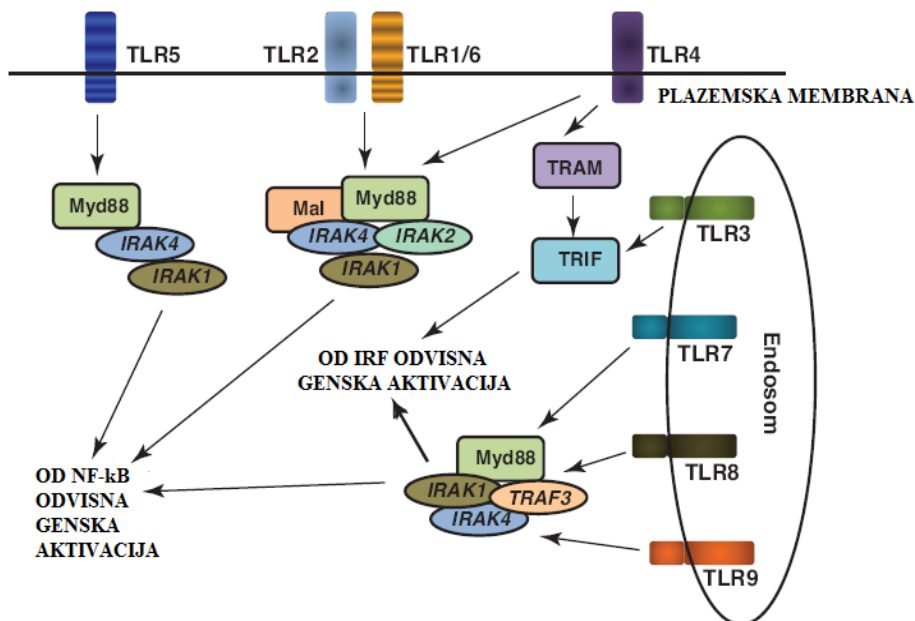
### **1.1.2.2 TOLL-U PODOBNI RECEPTORJI**

Toll-u podobni receptorji so dobili ime zaradi svojih strukturnih in funkcionalnih podobnosti s proteinom, katerega zapis nosi gen Toll. (9) Ta gen so najprej identificirali v insektih, in sicer v *Drosophili* (rod sadne muhe), nato pa so analogne gene določili tudi pri vretenčarjih. (1) Pri človeku so našli 10 funkcionalnih TLR (TLR1–TLR10), pri miši pa 12 (TLR1–TLR9 in TLR11–TLR13). (9) To so transmembranski proteini tipa 1 z N-terminalno domeno za vezavo liganda, enojnim transmembranskim heliksom in s C-terminalno signalno domeno (slika 2), ki zaznavajo PAMP ter DAMP (s poškodbami povezani molekularni vzorci). (1, 9, 10) Med DAMP spadajo npr. proteini vročinskega šoka, ki se sproščajo iz gostiteljevih lastnih celic po njihovi poškodbi, torej so sposobni vzbuditi »sterilno vnetje«, ki ni posledica infekcije. (1)

Struktura izvencelične domene ima pri različnih TLR enako osnovo in je bogata z levcinom, razlike v postavitvi aminokislin pa omogočajo, da različni TLR prepoznajo različne PAMP in DAMP. (9) Ko se TLR po prepoznavi liganda aktivirajo, homo- ali heterodimerizirajo, po konformacijski spremembi pride do povezave dveh znotrajceličnih Toll-IL-1 receptorjskih domen (TIR). Znotrajcelična signalna pot, ki sledi vezavi ligandov na TLR, je zelo podobna tisti, ki sledi aktivaciji receptorja za interlevkin 1 (IL-1), ko se nanj veže IL-1. Obe signalni poti namreč vodita do aktivacije prepisovalnega dejavnika, kot je npr. NF- $\kappa$ B (jedrni dejavnik kapa B), ki se prenese v jedro. (5, 7) Prek adaptorskih proteinov kaskadna reakcija torej v zaključku aktivira gene, ki nosijo zapis za proteine (vnetne citokine, kemokine, endotelijske adhezijske molekule, kostimulatorne molekule in protivirusne citokine), ki so ključni za razvoj vnetnega odziva (slika 3). (1, 3, 9)



Slika 2: Struktura TLR. (11)



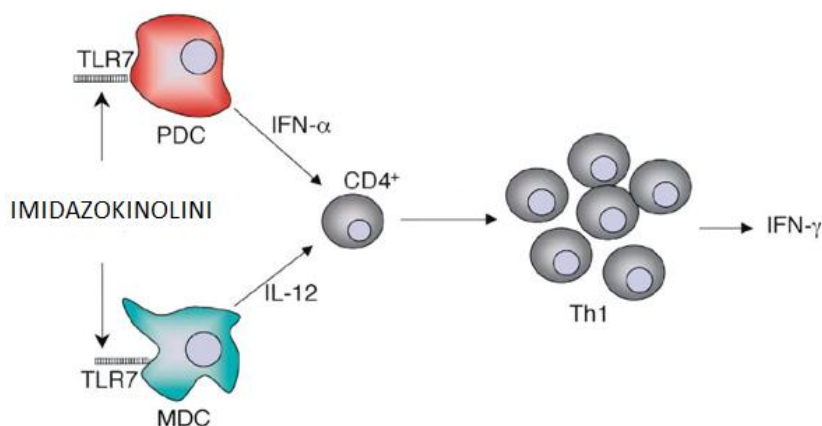
Slika 3: TLR signaliziranje. (12)

Presenetljivo je, kako ena sama družina receptorjev lahko prepozna tako različen spekter patogenih komponent. Poznamo dve skupini TLR glede na lokacijo. Prva skupina so TLR, ki se pojavljajo na celični površini in prepoznajo večino patogenih snovi, predvsem vzorce bakterijske celične stene ter gliv (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 in TLR10). Druga skupina pa so tisti, ki se nahajajo v znotrajceličnih endosomih (TLR3, TLR7, TLR8 in TLR9) in večinoma prepoznajo patogeni RNA in DNA (virusne in bakterijske nukleinske kisline). (1, 9, 13)

**Preglednica I: Toll-u podobni receptorji in njihovi ligandi. (14)**

<b>RECEPTOR</b>	<b>LOKACIJA</b>	<b>LIGAND PAMP, DAMP</b>	<b>IZVOR LIGANDA</b>
<b>TLR1</b> (s <b>TLR2</b> )	Citoplazemska membrana	Triacil lipopeptidi	Bakterije, mikobakterije
		Topni dejavniki <i>Neisserie</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<b>TLR2</b> (s <b>TLR1</b> ali s <b>TLR6</b> )	Citoplazemska membrana	Lipoproteini, lipopeptidi	Različni patogeni
		Lipoteihoična kislina	Grampozitivne bakterije
		Peptidoglikan	Bakterije
		Lipoarabinomanan	Mikobakterije
		V fenolu topen modulin, Porini	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Neisseria</i>
		Atipični LPS	<i>Leptospira interrogans</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i>
		Glikoinozitol fosfolipidi, Glikolipidi	<i>Trypanosoma</i> , <i>Toxoplasma</i> , <i>Plasmodium</i>
		β-glukan, manan	Glive
		Jedrni proteini in NS3, dUTPaza, glikoproteini	Virus Hepatitis, virus Epstein-Barr, Citomegalovirus
HSP70	Gostitelj		
<b>TLR3</b>	Endosomska membrana	Dvojnovijska DNA	Virusi
<b>TLR4</b>	Citoplazemska membrana in endosomska membrana	LPS	Gramnegativne bakterije
		O-povezan manan	Glive
		Taksol	Rastline
		Fuzijski proteini in proteini ovojnice	Respiratorni sincicijski virus
		HSP60	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
HMGB1, HSP70, fibronektin, fibrinogen	Gostitelj		
<b>TLR5</b>	Citoplazemska membrana	Flagelin	Bičkaste bakterije
<b>TLR6</b> (s <b>TLR2</b> )	Citoplazemska membrana	Diacil lipopeptidi, lipoteihoična kislina, β-glukan	<i>Mycoplasma</i> , grampozitivne bakterije, glive
<b>TLR7</b>	Endosomska membrana	SsRNA	Virusi, bakterije
		Imidazokinolini, loksoribin, bropirimin	Sintetizirane spojine
<b>TLR8</b>	Endosomska membrana	SsRNA	Virusi, bakterije
		Imidazokinolini	Sintetizirane spojine
<b>TLR9</b>	Endosomska membrana	CpG vsebujoča DNA	Bakterije, virusi, glive
		Hemozoin	<i>Plasmodium falciparum</i>
<b>TLR10</b> (s <b>TLR1</b> ali s <b>TLR2</b> )	Citoplazemska membrana	Lipopeptidi (predvideno)	

TLR najdemo večinoma na mastocitih, makrofagih, dendritičnih celicah in na intestinalnih epiteljskih celicah, predvsem na področjih, kjer bakterije vstopajo v gostitelja (prva linija obrambe). (1, 5) Na različnih celicah so različne kombinacije tovrstnih receptorjev. S sprožitvijo vnetja se ta nabor še poveča, zato da je gostiteljev organizem sposoben prepoznati širok spekter možnih patogenov. (5) Izražanje večine TLR namreč spodbudijo vnetni citokini, kot so npr. TNF- $\alpha$  (tumorje nekrotizirajoči dejavnik alfa) in interferon tipa 2 IFN- $\gamma$  (interferon gama). (5) Različni TLR agonisti aktivirajo različne celične tipe, kar pripomore k različnim oblikam imunskega odgovora. (15) TLR imajo med vsemi PRR najboljše določeno pot za vzbuditev pridobljenega imunskega odziva (slika 4). (16)



**Slika 4: Vzbuditev Th1 odgovora po vezavi imidazokinolinov na plazmacitoidno dendritično celico (pDC) in mieloidno dendritično celico (mDC). (17)**

Prav neustrezno uravnavanje TLR signaliziranja prispeva k razvoju in napredovanju številnih bolezni. (9) Da so obetavne terapevtske tarče, nakazuje tudi dejstvo, da je polimorfizem genov, ki nosijo zapis za TLR ali za njihove signalne proteine, pomemben napovedni dejavnik za razvoj določene bolezni, oziroma vpliva na potek bolezni. (7) Razumevanje povezav med različnimi molekulami vključenimi v TLR signaliziranje in njihove pozitivne ter negativne regulacije je ključno za razvoj novih zdravil, ki bi lahko delovala na katerikoli stopnji kaskade, vezane na TLR. Šlo bi za učinkovine z vplivom na adaptorske proteine, na regulacijo TLR signalnih molekul, na prepisovalne dejavnike, (18) predvsem pa je velik interes usmerjen v razvoj malih molekul, ki bi imele agonističen ali antagonističen vpliv na TLR. Osnova za razvoj teh molekul je struktura naravnih ligandov, ki jo poznamo za vse človeške TLR z izjemo TLR10. (9)

Infekcijske bolezni, vnetne bolezni, avtoimunske bolezni in rak slonijo na zapletenih signalizacijskih kaskadah, ki zajemajo številne možne tarče za zdravljenje. Kljub tej kompleksnosti je dokazana uspešnost ciljanja na prvotni citokin TNF, ki

vzbudi apoptozo in vnetje. William Coley je že v 19. stoletju opazil protitumorski učinek ponavljajočega injiciranja toksinov, mrtvih po Gramu pozitivnih bakterij *Streptococcus pyogenes* in po Gramu negativnih bakterij *Serratia marcescens* (poznani kot Coley's toxin). (7) Pomembna vloga TLR pri aktivaciji imunskega odziva je bila dokazana mnogo pozneje, in sicer med letoma 1997 in 1998, (10) ko so dokončno potrdili, da razni produkti bakterij vodijo v aktivacijo TLR in spodbudijo imunski odziv. S tem se je povečalo razumevanje molekularnih komponent, ki uravnavajo prirojeni imunski odziv in vodijo do nastanka citokinov, kot je TNF. (7) Agonisti TLR so pomembni spodbujevalci imunskega odziva npr. pri raku in infekcijskih boleznih. Blokada TLR z antagonisti pa je lahko izjemno učinkovita pri kroničnih vnetnih boleznih, kjer se TLR aktivirajo zgodaj v vnetni kaskadi in imajo visoko sposobnost začeti ter spodbujati vnetne procese. Ker zaznavajo tudi snovi iz vnetega tkiva in ker po aktivaciji tvorijo vnetne produkte, se po usodnem ciklu ponovno aktivirajo. Z blokado te pozitivne povratne zanke lahko ključno pripomoremo k zmanjšanju vnetnih procesov. (7)

### **1.1.2.3 TLR ZA NUKLEINSKE KISLINE**

Kot že omenjeno poznamo štiri različne TLR, ki zaznavajo nukleinske kisline in sicer TLR3, TLR7, TLR8 ter TLR9. Za razliko od ligandov drugih TLR so namreč nukleinske kisline lahko tudi gostiteljeve lastne snovi. Lokacija na veziklih sama po sebi pomaga omejiti imunski odziv le na invazivne mikroorganizme. (19) Razločevanje med lastnimi in tujimi snovmi je omogočeno tudi zaradi omejenega izražanja tovrstnih receptorjev samo na določeno skupino celic. (10) TLR7 in TLR8 prepoznavata virusno enovijačno RNA (ssRNA) in bakterijsko RNA, TLR3 prepoznavata virusno dvojnovijačno RNA, TLR9 pa virusno dvojnovijačno DNA. (10, 15) Najočitnejša razlika med mikrobo in humano DNA je v nivoju metilacije, (19) pri preučevanju patogene in lastne molekule RNA pa sta dvojna vijačnica RNA virusov in visok nivo CpG tista znaka, ki kažeta, da ne gre za gostiteljeve lastne elemente. (20) Humana RNA ima tudi več modifikacij kot bakterijska. (15) Humana ribosomalna RNA vsebuje 25-krat več 2'-O-metiliranih baz in 10-krat več psevdouridinov kot bakterijska ribosomalna RNA. (10, 15) Posttranskripcijske spremembe virusne RNA, kot je prehod adenozijskih preostankov v inozinske z deaminacijo z gostiteljevimi encimi, pripomorejo k še boljši prepoznavi tuje RNA. (10)

Ker ssRNA in nekateri sorodni ligandi vplivajo tako na TLR7 kot na TLR8, je preučevanje načina prepoznave na molekularnem nivoju zahtevno. (15) Med TLR7 in TLR8





ligande, kot so npr. imidazokinolinski derivati ter gvanozinski in adeninski analogi. (1, 10, 13, 18, 21)

### ***1.2.1.1 IMIDAZOKINOLINI***

Imidazokinolini so bili razviti v 80. letih prejšnjega stoletja kot protivirusne učinkovine. Podobni so adenozinim analogom, le da imajo dodatni tretji obroč ter manj dušika v primerjavi s purini. Te molekule zaradi svojih učinkov imenujemo modifikatorji IS (IRM - immune response modifiers) z nizko molekulsko maso. (21)

**Imikvimod** (R-837) se je izkazal kot eden izmed prvih in najbolj uspešnih agonistov TLR7. (7) Imikvimod najdemo na tržišču v obliki 5 % kreme Aldara, ki je namenjena zdravljenju genitalnih bradavic. Krema je registrirana tudi v Sloveniji in jo je možno dobiti na recept. Imikvimod se uporablja tudi za zdravljenje herpesa (okužba z virusom Herpes Simplex), malignih tumorjev kože, tako primarnih tumorjev kot metastaz, (21) nemelanomskega kožnega raka in aktinske keratoze. (7) Imikvimod se najbolj veže na TLR7. (21) Vezava imikvimoda na tarčne TLR7 spodbudi sproščanje IFN- $\alpha$  ter tvorbo IL-6 in TNF- $\alpha$ . (7) Nekateri neželeni učinki imikvimoda, ki se lahko pojavijo na koži in so bili zabeleženi, so avtoimunske težave kože, kot so vitiligo, navadni (vulgarni) pemfigus in poslabšanje imunsko povezane psoriaze. (21) **Resikvimod** (R-848) se je izkazal kot bolj topen in bolj učinkovit pri sprožitvi nastanka citokinov kot imikvimod. Veže se na TLR7 in TLR8. (21) Resikvimod je bil umaknjen iz kliničnih raziskav zaradi premajhne učinkovitosti pri zdravljenju ter zaradi neželenih učinkov. (7)

### ***1.2.1.2 GVANOZINSKI ANALOGI***

Gvanozinski ribonukleotidi, ki so monosubstituirani na mestu C8 ali disubstituirani na mestu C8 in N7, so prav tako IRM z nizko molekulsko maso, ki so sposobni močno vzbuditi imunski odziv. (21)

**Loksoribin** spada med disubstituirane gvanozinske analoge. Agonistično naj bi deloval predvsem na TLR7. (21)

### ***1.2.1.3 NARAVNI LIGANDI, SINTETIZIRANI OLIGONUKLEOTIDI IN MODIFIKACIJE***

Pri preverjanju agonističnega delovanja je potrebno različne naravne RNA in sintetizirane ORN (oligoribonukleotide) iz približno 20 nukleotidov stabilizirati oziroma zaščititi pred RNazami. (15, 21) Z uridinom ter z uridinom in z gvanidinom bogati oligoribonukleotidi, kot je RNA40 iz U5 regije HIV-1 RNA, so najbolj tipični aktivirajoči ligandi TLR7. (10) Bazne modifikacije, specifični motivi in sprememba kemizma vezi vodijo k antagonističnemu vplivu. (10) Osnova za razvoj antagonistov je 2'-O-metil modifikacija teh RNA molekul, ki zavira TLR7. (21) Kot že omenjeno je tovrstna sprememba bolj značilna za lastno kot za tujo RNA, torej gostiteljeva lastna RNA naj bi bila bolj zavirajoča. (10, 15) Poleg tega naj bi antagonistično delovali poli-(T)-ODN (oligodeoksiribonukleotidi), (21) CpG-ODN (18) in tudi nekateri enovijačni fosforotioatni oligonukleotidi. (24)

### ***1.2.1.4 OSTALI DIREKTNI IN INDIREKTNI ANTAGONISTI***

Razlika med malimi molekulami, ki delujejo agonistično, in tistimi, ki delujejo antagonistično na TLR7, je težko določljiva. V določenih primerih je dovolj že samo drugačna regioizomerija molekule. (24)

Molekule, ki delujejo kot posredni antagonisti TLR7, so 4-aminokinolini, med katerimi najdemo antimalarik hidroksiklorokin, ki se lahko uporablja za zdravljenje sistemskega eritematoznega lupusa in revmatoidnega artritisa. Kot antagonisti delujejo tudi drugi derivati klorokina. Ne gre za ligande TLR7, temveč je njihov mehanizem zaviranja lizosomskega nakisanja, saj zvišujejo pH endosomov, kar posledično zavira od pH odvisno vezavo nukleinskih kislin na znotrajcelične receptorje TLR. (7, 20, 24, 25)

### ***1.2.2 INDIKACIJE ZA AGONISTE TLR7***

Agonisti TLR7 so imunski stimulatorji, uporabni kot učinkovine za zdravljenje hepatitisa C, genitalnih bradavic, genitalnega herpesa, aktinske keratoze, molusk (*Molluscum contagiosum*), lešmanioze, bazalnoceličnega karcinoma, nemelanomskega kožnega raka, malignih tumorjev kože, alergije, astme, alergijskega rinitisa in drugega. (1, 7, 13, 18, 21)

### **1.2.2.1 ASTMA**

Pri astmi prihaja do ponavljajočih se napadov reverzibilne zapore dihalnih poti zaradi krčenja bronhijev in izločanja sluzi zaradi načeloma neškodljivih sprožilcev. Pretiran odziv nanje je v osnovi vnetna reakcija. (2) TLR7 so v pljučih izraženi v visoki meri z namenom zaznavanja enovijačnega RNA genoma, ki je skupen večini virusov dihal. (26) TLR signalizacija vzbudi citokinski odgovor in aktivira antigene predstavljajoče celice, kar vodi do Th1 odgovora. Aktivacija TLR7 bi bila dobra terapija pri alergijah in astmi, ki sta posledica močnega Th2 odziva, saj bi se z aktivacijo Th1 odziva stanje uravnovesilo. (7, 26) Z istimi principi je povezana higienska hipoteza, ki pravi, da je v zgodnjem otroštvu priporočljiva izpostavljenost mikrobom za preprečitev razvoja alergij. (12) Dokazali so tudi, da so agonisti TLR7 koristni pri alergijskih boleznih dihal, saj začasno zmanjšajo Th2 odgovor prek IFN tipa 1, kar vodi v trenutno izboljšanje alergijskega vnetja dihal ter da trajno zmanjšajo Th2 odgovor prek IFN tipa 2 in celic CD8+, kar vodi v dolgotrajno izboljšanje bolezni in zaščito dihal. (27)

Poleg tega so TLR7 izraženi na živčnih vlaknih dihalnega sistema, katerega sproščanje uravnava preko tvorbe dušikovega oksida. *In vitro* so dokazali, da skrčenje dihalnih poti zaradi metilholina hitro uplahne po vnosu agonista TLR7 imikvimoda. Učinek sprostitve je odvisen od odmerka. Na morskem prašičku so razširitev bronhijev dokazali tudi *in vivo*. O vpletenosti TLR7 v patofiziologijo astme priča povezava med polimorfizmom gena, ki nosi zapis za TLR7 ter možnostjo pojava astme. (26)

Do nedavnega še ni bila klinično preizkušena možnost lokalne dostave agonistov TLR7 v pljučni sistem, temveč le sistemski vnos, ki pa izkazuje številne sistemske neželene učinke. Pri miših so preizkušali intranazalni vnos, ki je izkazal akutno in kronično izboljšanje stanja pri alergijski bolezni dihal. (27)

### **1.2.2.2 RAK**

Glavni cilj protitumorske imunoterapije je popolna odstranitev tumorskih celic. K temu prispevata tako prirojeni kot pridobljeni imunski sistem s celicami NK in s CD8+ citotoksičnimi limfociti T (CTL) kot ključnimi akterji. CTL se aktivirajo po tem, ko jim antigen predstavitvene celice (APC), med katerimi so najpomembnejše pDC, predstavijo s tumorji povezane antigene (TAA). Epitop predstavijo na svoji površini skupaj z glavnim histokompatibilnim kompleksom (MHC). Problem pa je, če so limfociti T tolerantni na TAA, česar posledica je rast tumorja. Da bi preprečili tovrstno neodzivnost, se uvaja

aktivna imunoterapija (protirakava cepiva) ter pasivna imunoterapija (dostava protitumorskih celic T ali monoklonskih protiteles). Imunogenost (sposobnost vzbuditve imunskega odziva) tumorskih celic je namreč nizka, saj so TAA večinoma lastni antigeni, ki so lahko prisotni tudi na zdravih celicah. Imunska toleranca, ki jo lahko vzbudijo tumorji, je precej kompleksen pojav. Tumorji namreč poleg omenjenega aktivno zavirajo imunski sistem še s številnimi drugimi mehanizmi. Prihaja do manjšega izražanja humanega levkocitnega antigena (HLA) ter kostimulatornih molekul na celicah. Poleg tega tumorji aktivno zavirajo IS s sproščanjem imunosupresivnih dejavnikov, ki vplivajo na DC in na limfocite T. (21)

Aktivacija TLR7 je eden izmed pristopov za razvoj protirakave terapije z vplivom na imunske celice, tumorske celice in tumorsko mikrookolico. Po aktivaciji TLR7 se vzbudijo provnetni citokini, kemokini in IFN tipa 1 (npr. IFN- $\alpha$ ), poviša pa se tudi izražanje kostimulatornih molekul. Tako pride do nastanka vnetja v tumorskem mikrookolju. Aktivirajo se APC, CD4+ limfociti T, CD8+ limfociti T in celice NK, pride do povečane možnosti za programirano celično smrt, povečane imunogenosti rakavih celic ter zmanjšanih možnosti za razvoj novih žil. (21) Aktivacija TLR7 tudi zmanjša zaviralno funkcijo regulatornih limfocitov T (gre za celice, ki uravnavajo, zmanjšujejo imunski odziv) in tumorskih celic. (7, 21) Dodatni problem pa je, da je večina pacientov z rakom imunosuprimiranih zaradi klasične protitumorske terapije, zato je težko doseči močno pozitiven imunski odziv. Cilj je doseči ustrezno kombinacijo protirakavih učinkovin in učinkovin, ki bi spodbujale prirojeni IS. (7)

Imikvimod uporabljajo kot učinkovino za zdravljenje primarnih in sekundarnih kožnih tumorjev, poleg tega pa so agonisti TLR7 primerni kot dodatki k cepivom še posebej v kombinaciji z drugimi TLR agonisti ali anti-CD40 protitelesi. Kombinacija sinergistično zvišuje imunski odziv. (21) Dodatki k cepivom z veliko zmogljivostjo vzbudijo imunski odziv ter omogočijo vnos nižje koncentracije cepiva, poleg tega pa je imunizacija pacienta boljša. Uporabljajo jih tudi pri boju proti infekcijskim boleznim. (18)

### **1.2.2.3 INFEKCIJSKE BOLEZNI**

Virusi vstopajo v celice na različne načine, bodisi prek receptorsko pogojene endocitoze bodisi prek zlitja virusne ovojnice s celično membrano. Imunski kompleksi (virus s protitelesom) pa imajo s FC $\gamma$ R (Fc receptorji za IgG) pogojen vstop v fagocitne celice. Sledi ključni korak lizosomskega nakisanja. (15, 20) Virusni antigeni se vežejo na

RLR, citosolne DNA receptorje ter na TLR receptorje. (28) Glavni protivirusni citokini so IFN tipa 1 (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\omega$  in IFN- $\tau$ ). (20) Virusna ssRNA ne aktivira celic pridobljenega IS samo prek celic prirojenega IS (DC), temveč uravnava efektorne funkcije limfocitov T in B tudi z neposrednim vplivom. IS je tako spodbujen na več nivojih in vzbudi protivirusni odziv. (15)

GENITALNE BRADAVICE: Vzrok za njihov nastanek je okužba s humanim papiloma virusom. Številni agonisti so v kliničnih testiranjih, učinkovina namenjena njihovem zdravljenju pa je, kot že prej omenjeno, imikvimod. (14)

HEPATITIS C: Bolezen se razvije po okužbi z virusom hepatitisa C. Proteazni zaviralci so učinkoviti, vendar sčasoma pride do odpornosti. Zdravljenje z IFN- $\alpha$  je sicer pokazalo rezultate, a tudi številne neželene učinke. Za razliko od zdravljenja z IFN- $\alpha$  dosežemo z agonisti TLR7 vzbuditev številnih tipov IFN, kar vodi do korenitejše protivirusne aktivnosti. Zmanjšajo se tudi neželeni učinki IFN- $\alpha$ , kot je npr. nevtropenija. Ne smemo pa zanikati dejstva, da tudi agonisti TLR7 izkazujejo toksičnost in številne neželene učinke. (14)

### **1.2.3 AGONISTI ALI ANTAGONISTI TLR7?**

SEPSA: Preizkušanja agonistov TLR7 so pokazala, da pride pri sepsi do rahlega bakterijskega očistka in povečanega sproščanja citokinov, a postavi se vprašanje, ali ne bi bilo bolje v primeru tako resnih vnetnih bolezni zavirati imunske aktivacije z antagonistami TLR7. (14)

HIV: Pri napredovani infekciji z virusom HIV pride do kronične imunske stimulacije, kar je posledica neravnovesja celične in humoralne imunosti. Izkazalo se je, da je potrebno zmanjšanje imunskega odziva, saj je znižanje nivoja IFN- $\alpha$  zelo zaželeno. (7, 24)

Virusi, kot npr. virus Epstein-Barr, virus hepatitisa C, virus ošpic in respiratorni sincicijski virus, skušajo zaobiti IS z negativno modulacijo TLR7 pDC. Mehanizmi niso poznani in ena izmed možnosti je, da z nestrukturnimi proteini prekinemo aktivacijsko kaskado. To posledično lahko vodi v latentno infekcijo. (15)

## **1.2.4 INDIKACIJE ZA ANTAGONISTE TLR7**

Antagonisti TLR7 so zaviralci IS, potrebni v primerih visokega privzema lastne RNA oziroma pri povečanem izražanju TLR7. V razvoju so učinkovine, namenjene zdravljenju avtoimunskih bolezni, kot so sistemski eritematozni lupus, revmatoidni artritis, Sjögrenov sindrom, multipla skleroza, psoriaza, kolitis, sepsa in okužba z virusom HIV. (1, 7, 10, 13, 18)

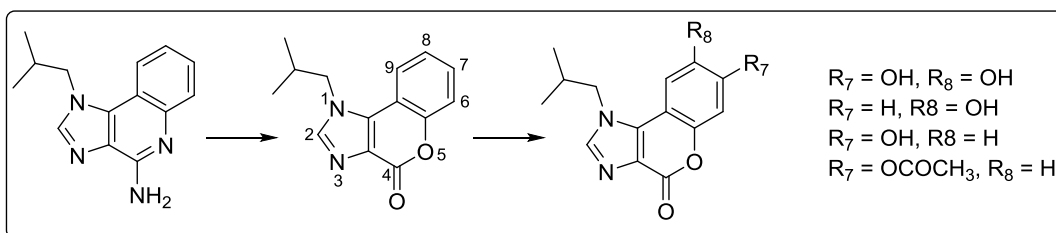
### ***1.2.4.1 SISTEMSKI ERITEMATOZNI LUPUS***

To je kronična ponavljajoča se avtoimunska bolezen vezivnih tkiv, ki v osnovi prizadane kožo, sklepe, ledvice, srce, pljuča, živčni sistem, krvne elemente in serozne membrane. (29) Pojavlja se večinoma pri mlajših ženskah in pri tistih srednjih let. Vzroki niso povsem znani, pomembno vlogo pa naj bi igrala genska zasnova. (19) S kromosomom X povezani geni naj bi bili dejavnik tveganja za razvoj bolezni pri človeku. (30) Protitelesa se tvorijo proti lastnim makromolekulam, kot je npr. mali jedrni ribonukleoprotein (snRNP). (21) Revmatologi so pri zdravljenju v precepu pri izbiri zdravil, saj lahko protitelesa, kot je npr. belimumab (monoklonsko protitelo, usmerjeno proti stimulatorjem limfocitov B), (31) močno povečajo tveganje za infekcije. (29) Povišane serumske koncentracije interferona IFN- $\alpha$  in povečano izražanje genov, spodbujenih s strani IFN- $\alpha$  v krvnih celicah, so povezane z aktivnostjo in resnostjo bolezni.

Antagonisti TLR7 so se poleg antagonistov nekaterih drugih TLR izkazali kot učinkoviti, saj zmanjšajo tvorbo IFN- $\alpha$  s strani pDC, ki so najpomembnejše celice za produkcijo IFN- $\alpha$  v krvi. Preprečijo namreč vezavo gostiteljevih lastnih ter virusnih antigenov RNA in DNA na TLR. Človeški lastni RNA in DNA vzbudita TLR receptorje v obliki imunskega kompleksa z avtoprotitelesi. (19) Polimorfizmi genov, ki nosijo zapis za TLR7, in povišano izražanje TLR7 močno vplivajo na pojav in razvoj bolezni. (30)

## 2. NAČRT ZA DELO

1. V laboratoriju Katedre za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani bomo izvedli prvi del eksperimentalnega dela, v katerem bomo sintetizirali nove potencialne ligande TLR7 s strukturo policikličnega sistema kromeno(3,4-*d*)imidazol-4(1*H*)-ona, ki so zadetki virtualnega rešetanja na osnovi liganda imikvimoda, znanega agonista TLR7. (13) Predvidevamo, da bodo imeli hidroksi substituirani derivati agonistično ali antagonistično delovanje na TLR7 (slika 6). Opirali se bomo na v literaturi poznano dvostopenjsko reakcijo, (13, 32) ki jo bomo nekoliko spremenili. Pri sintezah bomo v prvi stopnji izhajali iz različnih benzaldehidov (4-benziloksi-2-hidroksibenzaldehida, 2,4,5-trihidroksibenzaldehida in 2,5-dihidroksibenzaldehida). Ovrednotili bomo ustreznost reakcijskih poti, kar je pomembno za nadaljnji razvoj učinkovin z delovanjem na TLR7. Sintetizirane produkte bomo izolirali, jih identificirali ter preverili njihovo čistoto.



**Slika 6: Imikvimod (levo) kot spojina vodnica za razvoj novih učinkovin.**

2. K seriji sintetiziranih spojin bomo dodali še 22 kupljenih spojin, ki so bile odkrite s pomočjo virtualnega rešetanja na osnovi imikvimoda s programom LiSiCA (33) ter še dve spojini iz knjižnice spojin Fakultete za farmacijo, 1-izobutilkromeno[3,4-*d*]imidazol4(1*H*)-on in 7-dietilamino-1-izobutilkromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-on.

3. Biološko vrednotenje sintetiziranih in kupljenih spojin bomo izvedli na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino v Ljubljani, kjer bomo ovrednotili topnost v DMSO in v celičnem gojišču ter s spektrofotometrijskima metodama na osnovi metabolne aktivnosti ter izločanja alkalne fosfataze preverili citotoksičnost na celicah HEK-Blue hTLR7 ter potencialno agonistično in antagonistično delovanje. V kolikor bodo rezultati pokazali agonistično oziroma antagonistično delovanje posameznih spojin, bomo preverili njihov vpliv pri različnih koncentracijah, pripravili krivulje odzivov ter izračunali  $EC_{50}$ .

4. Dobljene rezultate bomo analizirali in poskusili najti povezavo med strukturo spojin ter njihovo topnostjo, citotoksičnostjo predvsem pa aktivnostjo, kar bo ključno za njihovo razvrstitev ter nadaljnje raziskovanje in načrtovanje učinkovin na tarči TLR7.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI – sintezni del

Pri delu smo uporabili vse potrebne snovi za izvedbo kemijskih reakcij, izolacijo ter analizo produkta. Reagenti in topila so bili naslednjih proizvajalcev: Acros Organics, J. T. Baker, Carlo Erba reagents, Gram-Mol, Maybridge, Merck, PanReac in Sigma-Aldrich (Aldrich, Fluka, Sigma).

- Izhodne spojine: benzaldehidi (4-benziloksi-2-hidroksibenzaldehid, 2,4,5-trihidroksibenzaldehid, 2,5-dihidroksibenzaldehid), etil 2-izocianoacetat, izobutilamin, acetanhidrid.
- Baze: piridin, 1 M vodna raztopina natrijevega hidroksida (NaOH), natrijev hidrogenkarbonat (NaHCO<sub>3</sub>).
- Kisline: 11,5 M vodna raztopina žveplove (VI) kisline (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 1 M vodna raztopina klorovodikove kisline (HCl), očetna kislina.
- Katalizator: bakrov(I)jodid (Cu(I)I).
- Topila: brezvodni metanol (MeOH), prečiščena voda, led, aceton, etil acetat, diklorometan (DKM), tetrahidrofuran, eter, petroleter.
- Mobilne faze: kombinacije DKM in MeOH v različnih volumskih razmerjih.
- Sušilna sredstva: nasičena vodna raztopina natrijevega klorida (NaCl), natrijev sulfat (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

#### 3.2 LABORATORIJSKA OPREMA – sintezni del

- Pipete Schott,
- valji Fortuna Duran,
- grelnik z magnetnim mešalom IKA RCT basic (IKA, Staufen, Nemčija),
- grelna pištola Skil 8000 (Skil Europe, Breda, Nizozemska),
- mikrovalovni reaktor CEM Discover z IR in optičnim načinom merjenja temperature (CEM corporation, Matthews, Severna Karolina, ZDA),
- rotavapor Büchi Waterbath B-480 (Büchi Labortechnik, Flawil, Švica),
- laboratorijska tehtnica Mettler Toledo PB403-S (Mettler Toledo, Greifensee, Švica),
- UV svetilka (Lamag-Cabinet II, Wiehl, Švica).



### **3.3 METODE – sintezni del**

#### **3.3.1 DOLOČANJE TEMPERATURE TALIŠČA**

Temperaturo tališča spojin ( $T_{tal}$ ) smo določili s Koflerjevim talilnim mikroskopom (Leica Microsystems, Wetzlar, Nemčija) z ogrevalno mizico. Vrednosti so nekorrigirane.

#### **3.3.2 KROMATOGRFSKE METODE**

##### **3.3.2.1 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA (TLC)**

TLC smo uporabili za spremljanje poteka reakcije, primerjalno kvalitativno določevanje vsebine reakcijske zmesi in spremljanje čistosti izoliranih spojin iz reakcijske zmesi. Za izvedbo smo uporabili plošče Merck DC Fertigplatten Kieselgel 60 GF<sub>254</sub>. To so plošče, ki imajo na aluminijastem nosilcu 0,20 mm debel nanos stacionarne faze silikagela s fluorescentnim indikatorjem. Za razvijanje kromatografskih ploščic smo uporabili mobilne faze z različnimi deleži DKM in MeOH, kot je opisano pri posameznih sintezah. Lise spojin na ploščah smo opazovali z UV svetilko s svetlobo valovne dolžine 254 nm ali 366 nm.

##### **3.3.2.2 KOLONSKA KROMATOGRAFIJA**

Kolonsko kromatografijo smo uporabili za čiščenje reakcijske zmesi in s tem za izolacijo zelenih spojin. Stacionarna faza je bil silikagel proizvajalca Merck z 0,04–0,063 mm velikimi delci. Na vrh smo nanесли mivko, ki je preprečevala redčenje nanešene reakcijske zmesi z nalito mobilno fazo. Uporabili smo mobilne faze z različnimi deleži DKM in MeOH, kot je navedeno pri posameznih sintezah.

##### **3.3.2.3 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE ZMOGLJIVOSTI (HPLC)**

Za določitev čistosti produkta smo uporabili reverzno-fazno HPLC kromatografijo na kromatografu Agilent 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Nemčija). Sistem sestavlja kvartetna črpalka in detektor.

Kolona: Agilent Eclipse Plus C18 (4,6 x 150 mm, delci velikosti 5  $\mu$ m)

Pretok mobilne faze: 1,0 ml/min

Detekcija: pri 220 in 254 nm

Volumen injiciranja: 10  $\mu$ l

#### Elucijski sistem 1 (analitika kupljenih spojin **421** in **712**)

- Temperatura sistema: 25 °C (termostat)
- Čas posamezne analize: 20 min
- Zmes elucijskih topil: acetonitril (ACN) in 0,1 % vodna raztopina trifluoroocetne kisline (TFA)
- Elucijski gradient:
  - 0–15 min: 40 % proti 90 % ACN
  - 15–20 min: 90 % ACN

#### Elucijski sistem 2 (analitika sintetizirane spojine **6**)

- Temperatura sistema: 25 °C (termostat)
- Čas posamezne analize: 18 min
- Zmes elucijskih topil: ACN in 0,1 % vodna raztopina TFA
- Elucijski gradient:
  - 0–15 min: 20 % proti 80 % ACN
  - 15–17,5 min: 80 % ACN
  - 17,5–18 min: 80 % proti 20 % ACN

### **3.3.3 SPEKTROSKOPSKE METODE**

#### **3.3.3.1 JEDRSKA MAGNETNA REZONANCA (NMR)**

Spojine smo identificirali s pomočjo <sup>1</sup>H-NMR spektrov, za novo spojino **6** pa smo posneli še <sup>13</sup>C-NMR spekter za dodatno potrditev. Spektre smo posneli na Bruker Avance 400 DPX spektrometru (Bruker, Billerica, Massachusetts, ZDA) na Fakulteti za farmacijo. Snemanje je potekalo pri 25 °C in 400 MHz za <sup>1</sup>H-NMR oziroma pri 100 MHz za <sup>13</sup>C-NMR spekter. Uporabili smo različna devterirana topila (devteriran dimetil sulfoksid DMSO-*d*<sub>6</sub>, devteriran kloroform CDCl<sub>3</sub>, devteriran aceton (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO). Kemijski premiki so podani v brezdimenzionalnih enotah milijoninkah ppm (»parts per million«) glede na razdaljo od internega standarda, ki je bil v našem primeru tetrametilsilan (TMS, δ = 0,00 ppm). Sklopitvene konstante (*J*) so podane v hertzih (Hz), oblika vrhov pa s standardnimi oznakami za singlet (s), razširjen singlet (rs), dublet (d), dublet dubleta (dd), triplet (t) in multiplet (m). Za analizo spektrov smo uporabili računalniški program MestReNova 8.1 (Mestrelab Research S.L., Santiago de Compostela, Spain).

### **3.3.3.2 INFRARDEČA SPEKTROSKOPIJA (IR)**

IR spektre sintetiziranih/proučevanih spojin smo posneli na Thermo Nicolet FT-IR Nexus spektrometru (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA) v območju 450 do 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Uporabljena je bila ATR tehnika (attenuated total reflectance – oslabljen popolni odboj).

### **3.3.3.3 MASNA SPEKTROMETRIJA (MS)**

Metodo smo uporabili za natančno določitev mase molekul in s tem za potrditev identifikacije spojin. Analize so bile izvedene na masnem spektrometru Q-TOF Premier (Waters-Micromass, Milford, Massachusetts, ZDA) v Centru za masno spektroskopijo na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani. Izvedena je bila ESI (ionizacija z razprševanjem).

### **3.3.4 PRIKAZ REAKCIJSKIH SHEM, POIMENOVANJE SPOJIN PO IUPAC-U IN DOLOČANJE MOLEKULSKIH MAS**

S programom ChemDraw Ultra 12.0.2.1076 (CambridgeSoft, Cambridge, Massachusetts, ZDA) smo narisali strukturne formule spojin in določili njihova IUPAC imena in molekulske mase ter prikazali sintezne poti.

## **3.4 MATERIALI – biološki del**

- Celično gojišče DMEM (Dulbesco's Modified Eagle Medium) z visoko vsebnostjo glukoze in glutamina ter brez piruvata, s pH indikatorjem fenol rdeče (Gibco) z dodanim fetalnim govejim serumom (FBS) (Gibco) v koncentraciji 100  $\mu\text{l/ml}$  in z dodanim antibiotikom gentamicinom v koncentraciji 1  $\mu\text{l/ml}$  (Sigma-Aldrich),
- celično gojišče DMEM brez pH indikatorja fenol rdeče (Gibco) z dodanim FBS in gentamicinom,
- celični pufer DPBS brez  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Mg}^{2+}$  (Gibco),
- reagent MTS (Promega),
- triptansko modrilo (Sigma-Aldrich),
- QUANTI-Blue barvilo (InvivoGen),
- imikvimod: Imiquimod – R837 in LAL Water (InvivoGen),
- topilo dimetil sulfoksid (DMSO) (Wak-chemie Medical GmbH),
- celice HEK-Blue hTLR7 (InvivoGen),

- denaturiran etanol za razkuževanje Kleralcohol (Ecolab).

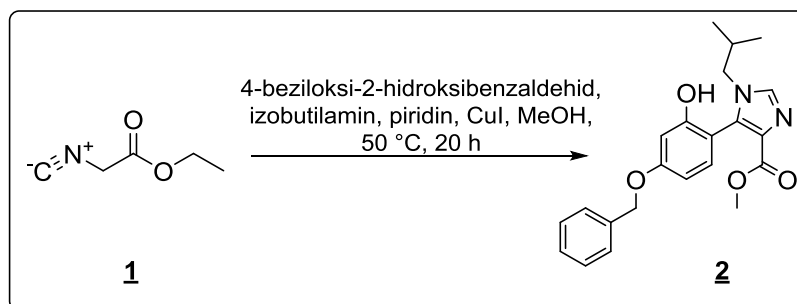
### **3.5 LABORATORIJSKA OPREMA – biološki del**

- Analitska tehtnica (Mettler Toledo, Greifensee, Švica),
- komora z laminarnim pretokom zraka (LAF komora) Biosafe 7-130-2 (Ehret, Emmendingen, Nemčija),
- centrifuga Sepatech Megafuge 1.0 (Heraeus, Hanau, Nemčija),
- mala centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Nemčija),
- mešalo vorteks Vibromix 114 (Tehtnica, Železniki, Slovenija),
- optični mikroskop Eclipse TE2000-S (Nikon Instruments, Tokio, Japonska),
- inkubator HERA Cell 150 (Heraeus, Hanau, Nemčija),
- Bürker-Türkova ploščica (hemocitometer) za štetje celic z globino 0,100 mm (Brand),
- krovna stekelca (Brand),
- števec za štetje celic,
- pipete 0,5–10 µl, 10–100 µl, 100–1000 µl (Corning Lambda),
- nastavki za pipete Physio Care (Eppendorf),
- elektronske pipete PIPETBOY Comfort (INTEGRA Biosciences, Zizers, Švica),
- mikrocentrifugirke STEAM (Eppendorf),
- serološke pipete 10 ml (CELLSTAR),
- 50 ml centrifugirke (Sarstedt),
- sterilne serumske pipete (Greiner Bio-One),
- gojitvene posodice TC Flask T75 (Sarstedt),
- tkivne plošče z 48 polji (Nunc, Thermo Fisher Scientific),
- mikrotitrna ploščica BioLite 96 Well Multidish (Thermo Fisher Scientific),
- optični čitalec mikrotitrskih ploščic Epoch (BioTek Instruments, Winooski, Vermont, ZDA),
- stresalnik Vari shaker (Dynatech, Alexandria, Virginija, ZDA),
- računalniški program GraphPad Prism 6.05 (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornija, ZDA),
- računalniški program Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, ZDA).

## 4. EKSPERIMENTALNO DELO

### 4.1 SINTEZA, IZOLACIJA IN ANALITIKA SPOJIN

#### 4.1.1 SINTEZA 7-hidroksi-1-izobutilkromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-ona in njegovega derivata 1-izobutil-4-okso-1,4-dihidrokromeno[3,4-*d*]imidazol-7-il acetata



Slika 7: PRVA STOPNJA: Sinteza metil 5-(4-(benziloksi)-2-hidroksifenil)-1-izobutil-1*H*-imidazol-4-karboksilata (**2**).

#### SINTEZA


Etil 2-izocianoacetat (0,769 ml, 7,0 mmol) (**1**), izobutilamin (0,696 ml, 7,0 mmol) in 4-benziloksi-2-hidroksibenzaldehid (1,598 g, 7,0 mmol) smo raztopili v 30 ml brezvodnega MeOH ter dodali piridin (0,564 ml, 7,0 mmol) in Cu(I)I (0,133 g, 0,7 mmol). To smo izvajali v bučki pri sobni temperaturi ob neprestanem mešanju. Reakcijsko zmes smo nato pustili mešati še 20 ur pri 50 °C.

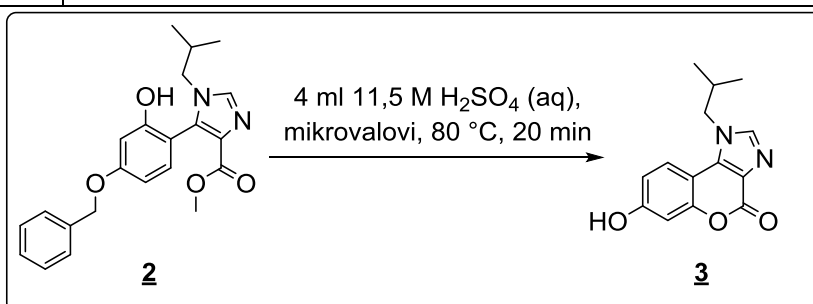
#### IZOLACIJA

Reakcijsko zmes smo čistili s kolonsko kromatografijo. Naredili smo suh nanos in uporabili mobilno fazo DKM/MeOH = 50/1. Za TLC smo uporabili mobilno fazo DKM/MeOH = 9/1 in tako spremljali frakcije ob čiščenju. Posušenemu produktu iz ustreznih frakcij smo dodali eter in etanol, da bi raztopili nečistote v tekoči fazi, trdno oborino pa smo nato izolirali s filtracijo z odsesavanjem na Büchnerjevem liju. Dobili smo rumene kristale (**2**). Iz nekaterih manj čistih frakcij se je po nekaj dneh izkristaliziral produkt, ki smo ga spirali z etrom in etanolom, nekatere druge prav tako manj čiste frakcije pa smo ponovno čistili na krajši koloni z mobilno fazo DKM/MeOH = 50/1. S pomočjo TLC (mobilna faza DKM/MeOH = 9/1), smo izbrali čiste frakcije, odparili topilo do

suhega ter izkristalizirali produkt z raztapljanjem v DKM ter z dodajanjem etra. Po filtraciji z odsesavanjem smo pridobili še nekaj dodatnega produkta prve stopnje (**2**).

**Preglednica II: Podatki o spojini 2.**

<b>IUPAC ime</b>	<b>Metil 5-(4-(benziloksi)-2-hidroksifenil)-1-izobutil-1<i>H</i>-imidazol-4-karboksilat</b>
<b>Mr</b>	380,44
<b>IZGLED</b>	 <p style="text-align: center;"><b>Rumeni kristali</b></p>
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)</b>	δ (ppm) 0,72 (d, <i>J</i> = 6,4 Hz, 6 H, 2 x CH <sub>3</sub> ); 1,68–1,78 (m, 1 H, CH); 3,66 (d, <i>J</i> = 6,2 Hz, 2 H, NCH <sub>2</sub> ); 3,81 (s, 3 H, OCH <sub>3</sub> ); 5,07 (s, 2 H, CH <sub>2</sub> O); 6,65 (dd, <i>J</i> <sub>1</sub> = 2,1 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 8,5 Hz, 1 H, Ar-H); 6,79 (d, <i>J</i> = 2,1 Hz, 1 H, Ar-H); 7,00 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 1 H, Ar-H); 7,32–7,46 (m, 5 H, Ar-H); 7,59 (rs, 1 H, imidazol-H); 1 H od OH je izmenjan
<b>ESI-HRMS</b>	Izračunano za C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> [M+H] <sup>+</sup> : 381,1814 Izmerjeno: 381,1803
<b>IR (ATR)</b>	2961, 1709, 1620, 1593, 1506, 1432, 1368, 1314, 1262, 1224, 1183, 1163, 1110, 1046, 1003, 977, 946, 831, 791, 770, 740, 703, 659 cm <sup>-1</sup>
<b>T<sub>tal</sub></b>	78–82 °C
<b>IZKORISTEK PRVE STOPNJE</b>	28 %
<b>R<sub>f</sub></b>	0,15 (Mobilna faza DKM/MeOH = 50/1) 0,26 (Mobilna faza DKM/MeOH = 20/1) 0,63 (Mobilna faza DKM/MeOH = 9/1)



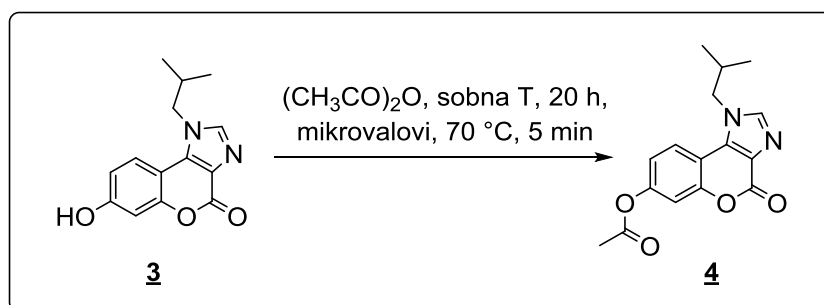
**Slika 8: DRUGA STOPNJA: Sinteza 7-hidroksi-1-izobutilkromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-ona (**3**).**

## SINTEZA

Produktu 1. stopnje (**2**) (0,632 g, 1,66 mmol) smo dodali 4 ml 11,5 M vodne raztopine H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Reakcija je potekala v mikrovalovnem reaktorju 20 minut pri 80 °C. Po poteku reakcije smo dobili svetlo rjavo gosto reakcijsko zmes.

## IZOLACIJA

Dodali smo prečiščeno vodo ter 11,5 M vodno raztopino H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, da smo lahko produkt oz. reakcijsko zmes prenesli v lij ločnik. Po občutku smo dodali še MeOH in aceton, da se je trdni del reakcijske zmesi raztopil. V lij ločnik smo dodali etil acetat (3 x 40 ml) in močno stresali ter na tak način ekstrahirali produkt v organsko fazo. Združene organske faze smo spirali z nasičeno vodno raztopino NaCl (60 ml), sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparili odvečno topilo z rotavaporjem. Sledilo je čiščenje organske faze s kolonsko kromatografijo, a smo tudi v najbolj čistih frakcijah na TLC kromatogramu opazili dve lisi. Poskušali smo ju ločiti z dodatkom DKM, upajoč, da se produkt prve stopnje v njem raztaplja, produkt druge stopnje pa ne. Iz določenih frakcij z dvema lisama, ki smo jim dodali DKM, je kasneje izpadla oborina, ki smo jo filtrirali z odsesavanjem. Temu smo dodali še kristale, ki smo jih pridobili iz vodne faze in dobili 0,072 g produkta (**3**), ki pa še vedno ni bil dovolj čist. Z NMR smo potrdili prisotnost produkta in takoj nadaljevali z naslednjo stopnjo sinteze.



Slika 9: TRETJA STOPNJA: Sinteza 1-izobutil-4-okso-1,4-dihidrokromeno[3,4-*d*]imidazol-7-il acetata (**4**).

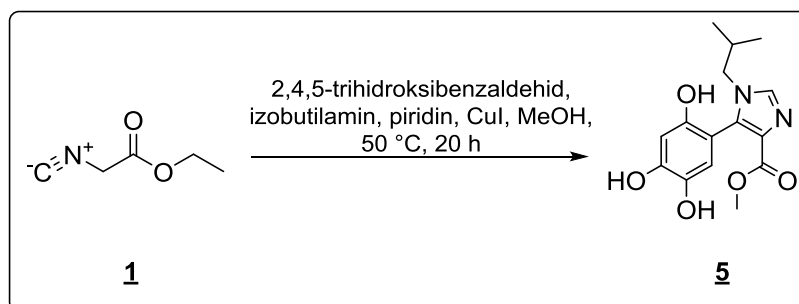
## SINTEZA

K 0,072 g »spojine **3**« smo dodali 15 ml acetanhidrida. Reakcijsko zmes smo mešali 20 ur pri sobni temperaturi, nato pa še 5 minut pri 70 °C v mikrovalovnem reaktorju.

## IZOLACIJA

Reakcijsko zmes smo nato zlili na led ter ekstrahirali v DKM (2 x 30 ml). Združene organske faze smo nato spirali z nasičeno raztopino NaCl ter sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Organsko fazo smo nato odparili pod znižanim tlakom in čistili s kolonsko kromatografijo. Razvijali smo TLC v dveh mobilnih fazah, v mobilni fazi DKM/MeOH = 9/1 ter v mobilni fazi DKM/MeOH = 20/1. Po analizi posameznih frakcij smo ugotovili, da produkta (**4**) nismo uspeli sintetizirati.

### 4.1.2 SINTEZA 7,8-dihidroksi-1-izobutilkromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-ona



Slika 10: PRVA STOPNJA: Sinteza metil 1-izobutil-5-(2,4,5-trihidroksifenil)-1*H*-imidazol-4-karboksilata (**5**).

## SINTEZA

Etil 2-izocianoacetat (0,483 ml, 4,4 mmol) (**1**), izobutilamin (0,437 ml, 4,4 mmol) in 2,4,5-trihidroksibenzaldehid (0,678 g, 4,4 mmol) smo raztopili v 20 ml brezvodnega MeOH ter dodali piridin (0,354 ml, 4,4 mmol) in Cu(I)I (0,084 g, 0,44 mmol) pri sobni temperaturi ob neprestanem mešanju. Reakcijsko zmes smo nato pustili mešati še 20 ur pri 50 °C.

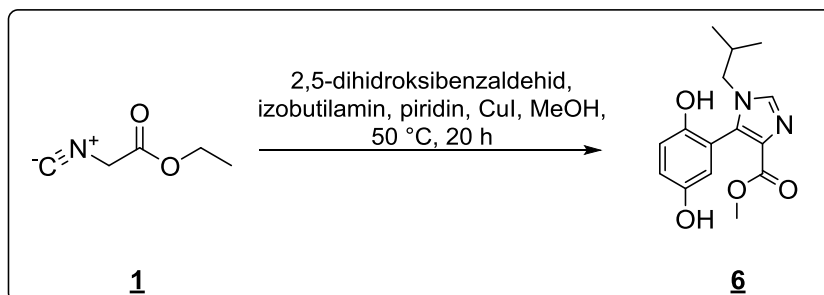
## IZOLACIJA

Čistili smo s kolonsko kromatografijo, pri čemer smo uporabili mobilno fazo DKM/MeOH = 50/1. Nato smo prešli na mobilno fazo 5–10 % MeOH v DKM in celo na mobilno fazo DKM/MeOH = 9/1. TLC smo prav tako izvajali v zmesi topil 5–10 % MeOH v DKM in mobilni fazi DKM/MeOH = 9/1. Združevali smo frakcije in tistim, za katere smo predvideli, da vsebujejo dokaj čist produkt, dodali eter in petroleter. Izoborila se je



temna oborina, kar je bila najverjetneje nečistota. Dodali smo še Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kot sušilno sredstvo ter filtrirali. Iz matičnice smo ponovno poskušali izkristalizirati »produkt«. Po analizi oborine smo ugotovili, da nam ni uspelo pridobiti spojine **5**.

#### 4.1.3 SINTEZA 8-hidroksi-1-izobutilkromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-ona



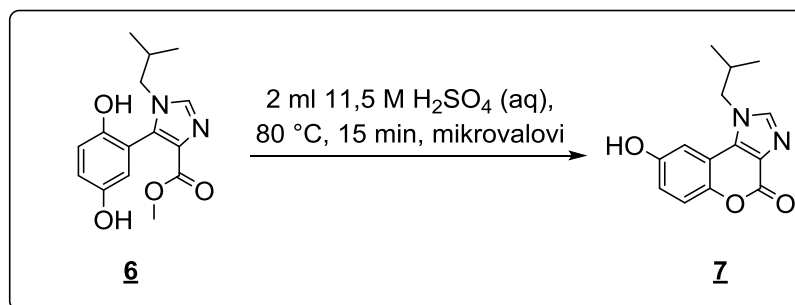
Slika 11: PRVA STOPNJA: sinteza metil 5-(2,5-dihidroksifenil)-1-izobutil-1*H*-imidazol-4-karboksilata (**6**).

#### SINTEZA

Etil 2-izocianoacetat (0,769 ml, 7,0 mmol) (**1**), izobutilamin (0,696 ml, 7,0 mmol) in 2,5-dihidroksibenzaldehid (1,598 g, 7,0 mmol) smo raztopili v 30 ml brezvodnega MeOH ter dodali piridin (0,564 ml, 7,0 mmol) in Cu(I)I (0,133 g, 0,70 mmol) pri sobni temperaturi ob neprestanem mešanju. Reakcijsko zmes smo nato pustili mešati še 20 ur pri 50 °C.

#### IZOLACIJA

Čistili smo s kolonsko kromatografijo v mobilni fazi DKM/MeOH = 50/1. TLC smo izvajali v mobilni fazi DKM/MeOH = 9/1. V določenih frakcijah smo po odparevanju preostali snovi v bučki dodali eter, da bi prišlo do kristalizacije in res je izpadlo 0,068 g rjavih kristalov. S kolonsko kromatografijo v mobilni fazi DKM/MeOH = 20/1 smo ponovno čistili frakcije, iz katerih po prvem čiščenju še nismo uspeli izkristalizirati produkta. Iz združenih frakcij so preko noči izpadli kristali, ki smo jih naslednji dan filtrirali z odsesavanjem in spirali z etrom. Dobili smo dodatnih 0,083 g produkta **6**.



Slika 12: DRUGA STOPNJA: Teoretična sinteza 8-hidroksi-1-izobutilkromenof[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-ona (**7**).

## SINTEZA

Produktu 1. stopnje (**6**) (0,090 g, 0,31 mmol) smo dodali 2 ml 11,5 M vodne raztopine H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ter segrevali 15 minut v mikrovalovnem reaktorju pri 80 °C.

## IZOLACIJA


Po poteku reakcije smo dobili temno rjavo tekočo reakcijsko zmes. Dodali smo prečiščeno vodo, da smo lahko produkt oz. reakcijsko zmes prenesli v lij ločnik. Dodajali smo MeOH in aceton, da se je trdna komponenta reakcijske zmesi raztopila. V lij ločnik smo dodali etil acetat (3 x 40 ml) in močno stresali ter na tak način ekstrahirali produkt v organsko fazo. Združene organske faze smo spirali z nasičeno vodno raztopino NaCl (60 ml), sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparili odvečno topilo z rotavaporjem. Organsko fazo smo čistili s kolonsko kromatografijo v mobilni fazi DKM/MeOH = 20/1. Iz frakcij smo izoborili produkt z etrom in petroletrom. Pridobili smo 0,014 g »produkta **7**«, ki je bil glede na analize enak produktu po 1. stopnji.

## PONOVEN POSKUS IZVEDBE 2. STOPNJE SINTEZE IN IZOLACIJE

Ker sta TLC in NMR pokazala, da se v frakcijah po čiščenju nahaja večinoma izhodna snov, smo združili vse frakcije in odparili topilo. Preostanku v bučki smo dodali 15 ml 11,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ter segrevali 20 ur pri 80 °C. Spojino smo nato ekstrahirali v organsko fazo in sicer tako, da smo vodno fazo spirali z dvakrat po 50 ml topila v volumskem razmerju DKM/MeOH = 9/1. Pred tem smo vodno fazo rahlo naalkalili z NaOH. Združili smo organske faze ter jih sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Sledilo je čiščenje s kolonsko kromatografijo z mobilno fazo DKM/MeOH = 9/1. V številnih frakcijah je izpadla oborina,

na kateri smo izvedli biološka testiranja. Končno zeleno spojino smo torej dosegli že po prvi stopnji sinteze, zato je izkoristek reakcije izračunan glede na prvo stopnjo.

**Preglednica III: Podatki o spojini 7.**

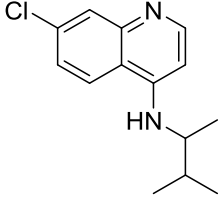
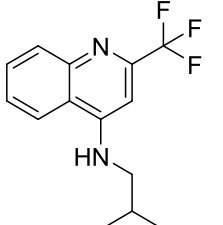
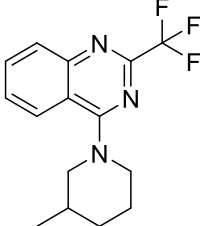
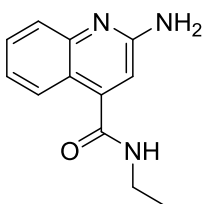
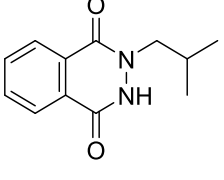
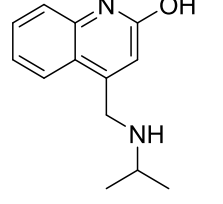
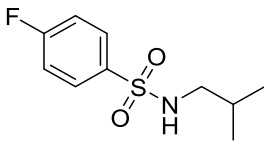
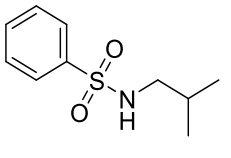
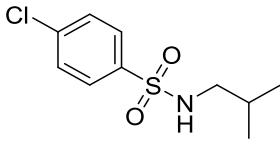
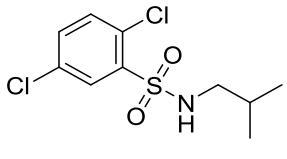
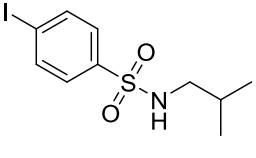
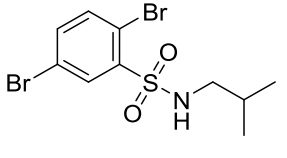
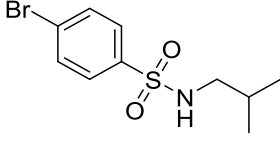
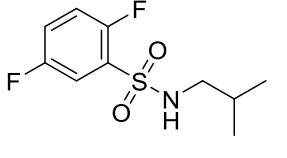
<b>IUPAC ime</b>	<b>8-hidroksi-1-izobutilkromeno[3,4-<i>d</i>]imidazol-4(1<i>H</i>)-on</b>
<b>Mr</b>	258,27
<b>IZGLED</b>	 <p style="text-align: center;"><b>Rjavkasti kristali</b></p>
<b>HPLC (Rt)</b>	7,521 min (99,81 % čistost)
<b><sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)</b>	δ (ppm) 20,7; 31,3; 55,7; 108,4; 115,6; 119,1; 120,5; 129,5; 136,6; 146,1; 147,7; 155,7; 158,0
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)</b>	δ (ppm) 1,03 (d, <i>J</i> = 6,7 Hz, 6 H, 2 x CH <sub>3</sub> ); 2,22–2,32 (m, 1 H, CH); 4,39 (d, <i>J</i> = 7,6 Hz, 2 H, NCH <sub>2</sub> ); 7,06 (dd, <i>J</i> <sub>1</sub> = 2,7 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 9,0 Hz, 1 H, Ar-H); 7,33 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 1 H, Ar-H); 7,38 (d, <i>J</i> = 2,7 Hz, 1 H, Ar-H); 8,04 (s, 1 H, imidazol-H); 8,88 (s, 1 H, Ar-OH)
<b>ESI-HRMS</b>	<u>Izračunano za C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 259,1083</u> <u>Izmerjeno: 259,1076</u>
<b>IR (ATR)</b>	2965, 1724, 1589, 1562, 1528, 1469, 1408, 1351, 1313, 1268, 1243, 1201, 1128, 1092, 1014, 927, 846, 811, 774, 643, 629 cm <sup>-1</sup>
<b>T<sub>tal</sub></b>	225–230 °C
<b>IZKORISTEK</b>	9 %
<b>R<sub>f</sub></b>	0,30 (Mobilna faza DKM/MeOH = 20/1) 0,60 (Mobilna faza DKM/MeOH = 9/1)

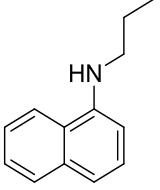
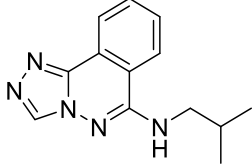
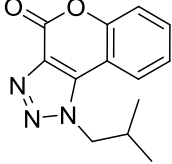
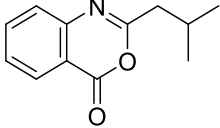
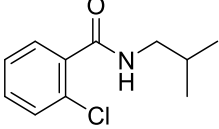
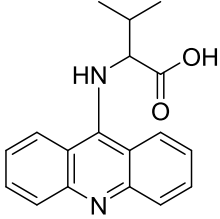
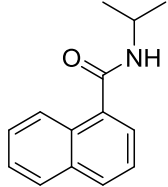
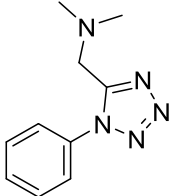
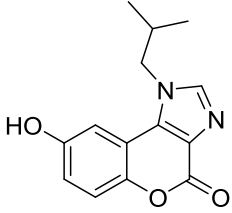
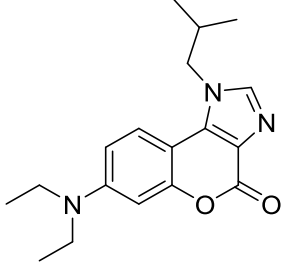
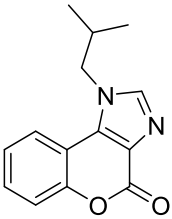
## 4.2 BIOLOŠKO TESTIRANJE SPOJIN

### 4.2.1 PRIPRAVA RAZTOPIN TESTIRANIH SPOJIN V DMSO IN PREVERJANJE TOPNOSTI V CELIČNEM GOJIŠČU

Na analitski tehtnici smo v mikrocentrifugirke natančno zatehtali spojine z znanimi molekulskimi masami. Dodali smo ustrezen volumen DMSO, da smo dobili **50 mM raztopine spojin**, rahlo stresali ter preverili bistrost raztopin, s katerimi smo nadaljevali testiranja. Dodali smo jih celičnemu gojišču pri sobni temperaturi, tako da je bilo v **končni raztopini 1 v/v % DMSO v celičnem gojišču, kar je najvišja koncentracija DMSO brez citotoksičnih vplivov** (2,5 µl raztopin spojin v DMSO smo dodali k 250 µl celičnega gojišča). Končne raztopine smo prenesli na tkivno ploščo z 48 polji in pri stokratni povečavi pod optičnim mikroskopom preverjali, če so bili v raztopini celičnega gojišča vidni kristali. V kolikor kristalov ni bilo, smo presodili, da je bila spojina pri tej koncentraciji topna. Če so bili kristali prisotni, smo 50 mM raztopino spojine v DMSO redčili do **25 mM** oziroma, če je bilo potrebno, do **12,5 mM raztopine**. Pri raztopinah spojin v celičnem gojišču smo čez dan ali dva ponovno preverili, če je s časom izpadlo še kaj kristalov, ki bi nam potrdili netopnost. Raztopine spojin v DMSO, pri katerih po njihovem dodatku k celičnemu gojišču kristali niso bili prisotni, smo uporabili kot **osnovne raztopine** za nadaljnja testiranja. Če bi obravnavali prenasičene raztopine, bi se lahko zgodilo, da bi testi citotoksičnosti kazali na lažno citotoksičnost spojin, ki bi bila posledica mehanskega uničenja celic zaradi kristalov. Poleg tega je pri prenasičenih raztopinah dejanska koncentracija spojine nižja od predvidene, kar lahko vpliva na lažno negativne ali lažno pozitivne rezultate pri testih aktivnosti spojin. V času, ko osnovne raztopine niso bile podvržene testiranjem, smo jih shranjevali v zmrzovalniku pri  $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Preglednica IV: Strukturne formule testiranih spojin.

SPOJINA (serijska št., oznaka, izgled)	STRUKTURA	SPOJINA (serijska št., oznaka, izgled)	STRUKTURA
EN300-42258 (kupljena spojina)  <b><u>258</u></b>  <i>Beli kristali</i>		Z246176712 (kupljena spojina)  <b><u>712</u></b>  <i>Beli kristali</i>	
OSSL_401421 (kupljena spojina)  <b><u>421</u></b>  <i>Beli kristali</i>		TEN300-118823 (kupljena spojina)  <b><u>823</u></b>  <i>Beli kristali</i>	
Z50147668 (kupljena spojina)  <b><u>668</u></b>  <i>Beli kristali</i>		OSSL_331335 (kupljena spojina)  <b><u>335</u></b>  <i>Beli kristali</i>	
OSSK_351773 (kupljena spojina)  <b><u>773</u></b>  <i>Beli kristali</i>		OSSK_605050 (kupljena spojina)  <b><u>050</u></b>  <i>Beli kristali</i>	
Z45535330 (kupljena spojina)  <b><u>330</u></b>  <i>Beli kristali</i>		Z45535355 (kupljena spojina)  <b><u>355</u></b>  <i>Beli kristali</i>	
Z300124956 (kupljena spojina)  <b><u>956</u></b>  <i>Beli kristali</i>		Z45535375 (kupljena spojina)  <b><u>375</u></b>  <i>Beli kristali</i>	
Z45535331 (kupljena spojina)  <b><u>331</u></b>  <i>Beli kristali</i>		OSSL_235588 (kupljena spojina)  <b><u>588</u></b>  <i>Prozorno beli kristali</i>	

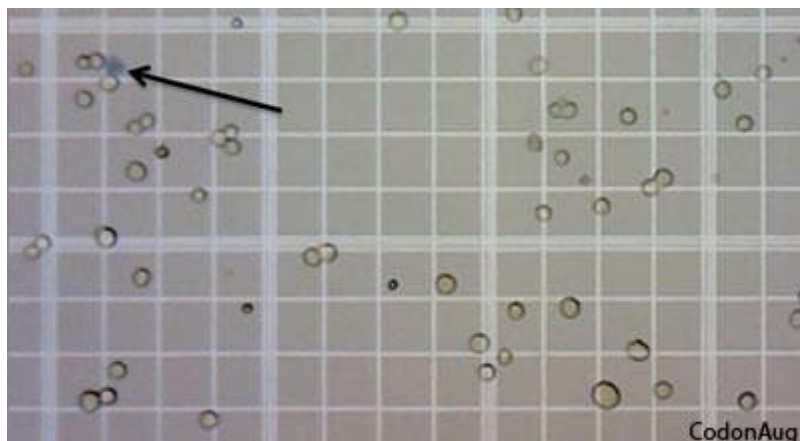
Z334888486 (kupljena spojina)  <b><u>486</u></b>  <i>Črna lepljiva snov</i>		OSSK_788934 (kupljena spojina)  <b><u>934</u></b>  <i>Beli kristali</i>	
OSSL_609244 (kupljena spojina)  <b><u>244</u></b>  <i>Rumeni kristali</i>		OSSL_145179 (kupljena spojina)  <b><u>179</u></b>  <i>Beli kristali</i>	
OSSK_362280 (kupljena spojina)  <b><u>280</u></b>  <i>Beli kristali</i>		OSSK_795093 (kupljena spojina)  <b><u>093</u></b>  <i>Rumeni kristali</i>	
OSSL_191474 (kupljena spojina)  <b><u>474</u></b>  <i>Beli kristali</i>		OSSK_343637 (kupljena spojina)  <b><u>637</u></b>  <i>Beli kristali</i>	
Spojina sintetizirana na FFA  <b><u>6</u></b>  <i>Rjavi kristali</i>		Spojina sintetizirana na FFA  <b><u>8</u></b>  <i>Rjavi kristali</i>	
Spojina sintetizirana na FFA  <b><u>9</u></b>  <i>Beli kristali</i>			

#### 4.2.2 ROKOVANJE S CELICAMI

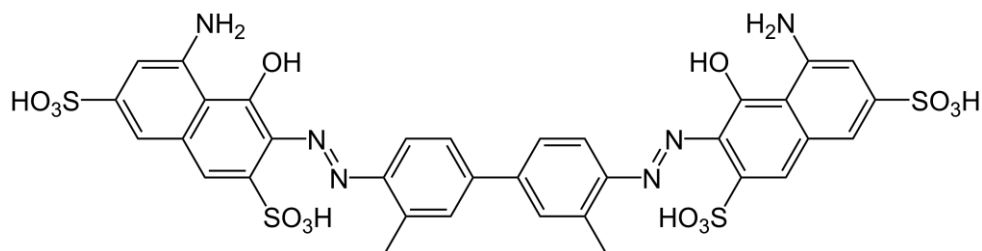
Vsi postopki, kjer je bilo potrebno gojitveno posodo odpirati in se na kakršenkoli način rokovati s celicami, so potekali v LAF komori, z razkuženo površino, z razkuženimi rokavicami in z ustrezno opremo. Vsi prenosi tekočin so potekali s sterilnimi pipetami ter s sterilnimi nastavki za pipete pri avtomatskih pipetah. Tudi ves ostali material, ki je prihajal v stik s celicami, je bil sterilen. Adhezivne celice HEK-Blue hTLR7, na katerih smo

opravljali testiranja, smo vzeli iz kriobanke oz. celične shrambe, kjer so bile shranjene v tekočem dušiku. Na hitro smo jih z namakanjem njihovega stičnega vsebnika odtalili v vroči vodni kopeli ter celice prenesli v centrifugirko, kjer smo jim na ledeni vodni kopeli po kapljicah dodali celično gojišče brez pH indikatorja do 10 ml in nato celični pufer DPBS do 20 ml. To smo centrifugirali 7 minut pri 600 obratih in nato odstranili supernatant. S pipeto smo resuspendirali usedlino celic v 1 ml celičnega gojišča ter to suspenzijo prenesli v gojitveno posodico s 13 ml celičnega gojišča sobne temperature. Celice zahtevajo posebne mikrotitrne ploščice in gojitvene posodice, na katerih dno se lahko prilepijo. Po nekaj dneh inkubiranja v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> so celice dosegle zadostno konfluentnost (približno 70 % prekrivanje dna), da smo jih lahko presadili ( naredili novo pasažo). Rast celic smo spremljali z opazovanjem pod optičnim mikroskopom pri stokratni povečavi. Presaditev smo izvedli tako, da smo odstranili celično gojišče, v katerem so rasle, jih spirali dvakrat z 10 ml DPBS, jih nazadnje približno 10 minut stresali v vsaj 13 ml DPBS ter jih tako odlepili od podlage in čim bolj resuspendirali. DPBS je pufer brez kalcijevih in magnezijevih ionov, zato ima sposobnost odtegnitve teh ionov, ki so sicer nujno potrebni za tvorbo vezi med celicami samimi ter med celicami in dnom gojitvene posodice. Pufer z resuspendiranimi odlepljenimi celicami smo prenesli v centrifugirko ter centrifugirali 7 minut pri 600 obratih. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant ter usedlino celic resuspendirali v 1 ml pufru DPBS.

20 µl v pufru suspendiranih celic smo zmešali s 180 µl **triptanskega modrila** ter kapljico mešanice nanесли na Bürker-Türkovo ploščico z globino 0,100 mm in sicer na rob krovnega stekelca, ki je prekrivalo to ploščico, da se je barvilo s celicami lepo razporedilo med ploščico in stekelce. To barvilo obarva mrtve celice v modro, žive celice pa ostanejo bledorumene (slika 13). Barvilo sestavlja velika negativno nabita diazo spojina (slika 14), zato celica sprejme vase barvilo le, če je porušena celovitost njene membrane. (34)



**Slika 13:** Mikroskopski pregled celic na Bürker-Türkovi ploščici. S puščico je označena mrtva celica, ki je vase sprejela barvilo. Pri štetju celic znotraj enega kvadratka s površino  $0,4 \text{ mm}^2$  se upošteva celice znotraj kvadratka in celice, ki ležijo na zgornji in levi stranici kvadratka. Omenjeni večji kvadrataček je razdeljen na 16 manjših kvadratkov. (35)



**Slika 14:** Struktura diazo spojine triptanskega modrila z IUPAC poimenovanjem 3,3'-[(3,3'-dimetilbifenil-4,4'-diil)diazzen-2,1-diil]bis(5-amino-4-hidroksinaftalen-2,7-disulfonska kislina). (36, 37)

S števcom smo šteli žive celice, ki smo jih pod optičnim mikroskopom videli na Bürker-Türkovi ploščici z globino 0,1 mm na 25 poljih s stranico 0,2 mm. Iz tega smo izračunali število živih celic v enem mililitru celične suspenzije. Seveda je potrebno upoštevati razmerje med volumnom barvila in celične suspenzije. Če smo 20  $\mu\text{l}$  celične suspenzije zmešali z 180  $\mu\text{l}$  barvila, je bil faktor redčitve 10. S faktorjem 1000 pa pomnožimo, da pretvorimo kubične milimetre v mililitre.

$$\frac{\text{št. živih celic}}{1 \text{ ml celične suspenzije}} = \frac{\text{št. prešteti} \text{ živih celic} \times 10}{25 \times (0,2 \text{ mm})^2 \times 0,1 \text{ mm}} \times 1000$$

**Enačba 1:** Izračun števila živih celic, prirejeno po viru (35).

Približno polovico celic smo gojili dalje, ostale zavrgli in spremljali smo, kdaj je bila spet dosežena zadostna konfluentnost za izvedbo naslednjega presajanja. Potrebno je bilo opraviti vsaj tri kroge presajanj, da so celice vzpostavile ravnovesje in šele nato smo jih lahko uporabili za testiranja. Celična linija ostane stabilna približno do 20 pasaže. Ko smo izvajali testiranja, je bil potek presajanja preostanka celic, ki niso bile izpostavljene testom, enak. Vedno smo preračunali, koliko celic smo potrebovali za testiranja in odmerili



ustrezni volumen suspenzije celic v DPBS-ju. Vsaj približno 1.000.000 jih je moralo ostati za novo pasažo. Če celice še niso bile dovolj razraščene, a smo opazili, da je gojišče že spremenilo barvo, oziroma, če ga že dolgo nismo menjali, smo lahko preprosto nadomestili del starega gojišča s svežim gojiščem.

### 4.2.3 TEST CITOTOKSIČNOSTI

Posamezen test citotoksičnosti je trajal tri dni (tri faze). Sprva smo citotoksičnost preverjali pri maksimalnih koncentracijah, pri katerih so bile spojine še topne – **osnovne raztopine** – nato tudi pri nižjih koncentracijah.

#### Prva faza – posaditev celic

Določili smo polja za spojine in za ustrezne kontrole:

- **NEGATIVNA KONTROLA:** DMSO v končnem celičnem gojišču v enaki koncentraciji kot v primeru raztopin spojin.
- **NEIZPOSTAVLJENE CELICE:** k celicam dodano samo čisto celično gojišče.

Načrtovali smo testiranje citotoksičnosti vsake spojine v treh poljih za preverjanje ponovljivosti (tri tehnične ponovitve). Tri polja smo pustili za negativno kontrolo, tri polja pa za neizpostavljene celice. V vsako polje je zaželeno posaditi vsaj 25.000 celic. Odločili smo se, da vsako polje napolnimo s po 150  $\mu$ l celičnega gojišča s celicami. Po izračunu števila živih celic v 1 ml suspenzije celic v DPBS smo določili, kakšen volumen suspenzije celic je potreben za testiranje ter v kakšnem volumnu celičnega gojišča jih bomo resuspendirali. Po posaditvi celic smo pokrito mikrotitrsko ploščico inkubirali 24 ur pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>, da so se celice prilepile na dno in se pričele množiti. Prva faza je skupna vsem testom na celicah. Potrebno je le načrtovati, koliko polj potrebujemo zaradi različnih kontrol pri različnih testih. Pri nekaterih testih se odločimo za dve tehnični ponovitvi, torej za testiranje posamezne spojine v le dveh poljih.

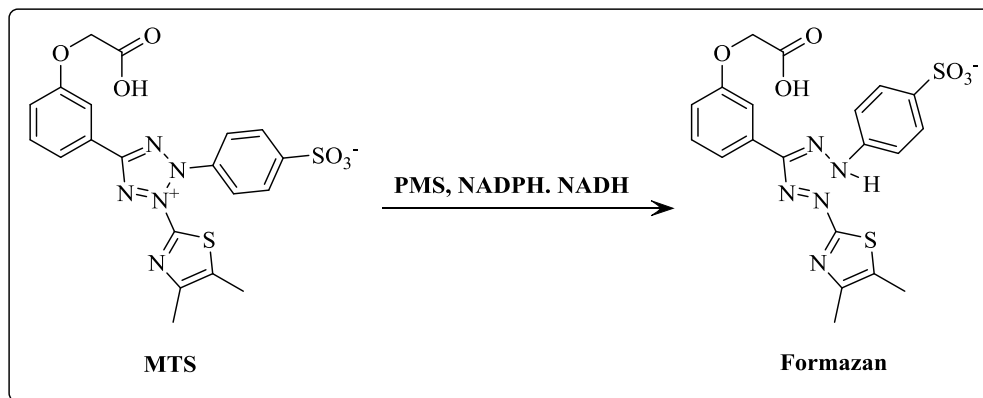
#### Druga faza – izpostavitve spojinam in kontrolam

V mikrocentrifugirkah smo pripravili po 500  $\mu$ l celičnega gojišča s spojinami, tako da je DMSO glede na celično gojišče predstavljal 2 %. Torej v vsako mikrocentrifugirko smo dali 490  $\mu$ l celičnega gojišča ter 10  $\mu$ l osnovne raztopine posamezne spojine v DMSO oziroma 10  $\mu$ l čistega DMSO v primeru negativne kontrole. Mikrocentrifugirke smo zaprli in jih dobro pretresli na vorteksu. V polja na mikrotitstrki ploščici smo vnesli raztopine ustreznih spojin, in sicer spet po 150  $\mu$ l, tako da se je v/v % DMSO v končnem celičnem gojišču zmanjšal na 1 %, saj višja koncentracija DMSO deluje citotoksično. V tri polja

namenjena negativni kontroli smo vnesli po 150  $\mu\text{l}$  celičnega gojišča z DMSO, v tri polja namenjena neizpostavljenim celicam pa po 150  $\mu\text{l}$  čistega celičnega gojišča. V vsakem polju na mikrotitrski ploščici, kamor smo v prvi fazi posadili celice, se je torej na koncu nahajalo 300  $\mu\text{l}$  tekočine. Celice izpostavljene spojinam in kontrolam smo inkubirali 24 ur pri 37  $^{\circ}\text{C}$  in 5 %  $\text{CO}_2$ .

### Tretja faza – spektrofotometrično testiranje

Polja mikrotitrške ploščice smo pregledali pod mikroskopom in že na tak način nekoliko predvideli, kako so spojine vplivale na razrast celic. V vsako polje mikrotitrške ploščice smo dodali po 15  $\mu\text{l}$  barvila **MTS** in inkubirali 2 uri pri 37  $^{\circ}\text{C}$  in 5 %  $\text{CO}_2$ . Opažali smo spremembe barve iz rumene na temnejšo rjavkasto barvo. Pokrite mikrotitrške ploščice smo stresali na stresalniku in nato postavili odkrite ploščice na optični čitalnik in prek računalniške povezave izvedli spektrofotometrično testiranje pri 492 nm valovne dolžine. Te podatke smo prenesli v Excelove preglednice in pripravili grafe z odzivi. Barvilo MTS je sestavljeno iz spojine MTS, ki je tetrazolijeva sol – ion dvojček [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfenil)-2*H*-tetrazol] in fenazin metosulfata (PMS). MTS se v prisotnosti PMS in mitohondrijske reduktaze (NADH, NADPH) reducira v formazan, ki je topen v gojišču in absorbira svetlobo pri 492 nm. Večji kot je odziv pri tej valovni dolžini, manjša je citotoksičnost, saj zaradi večje metabolne aktivnosti celic nastane več formazana. (38, 39)



**Slika 15: Reakcijska shema pretvorbe MTS v formazan v prisotnosti mitohondrijske reduktaze in PMS. (40)**

Na enak način smo preverjali citotoksičnost spojin pri nižjih koncentracijah. Če smo želeli preveriti citotoksičnost pri dvakratni redčitvi, smo dali v celično gojišče dvakrat manjši volumen raztopine spojine v DMSO. Enako smo znižali koncentracijo DMSO pri kontroli. **Določili smo, pri katerih končnih koncentracijah spojin v celičnem gojišču**

**nismo več zaznali citotoksičnosti in pri omenjenih koncentracijah izvedli preliminarne teste agonizma in antagonizma spojin.**

#### **4.2.4 PRELIMINARNI TEST AGONIZMA**

Posamezni test agonizma spojin, ki so se izkazale za necitotoksične, je trajal tri dni (tri faze). Agonizem smo preverjali pri **najvišjih končnih koncentracijah v celičnem gojišču**, pri katerih spojine niso bile citotoksične.

##### Prva faza – posaditev celic

Določili smo polja za spojine in za ustrezne kontrole:

- POZITIVNA KONTROLA 1: imikvimod v končni koncentraciji 1 µg/ml.
- POZITIVNA KONTROLA 2: imikvimod v končni koncentraciji 2,5 µg/ml.
- NEGATIVNA KONTROLA: DMSO v končni koncentraciji, enaki končni koncentraciji DMSO pri testiranju najmanj citotoksičnih spojin.
- NEIZPOSTAVLJENE CELICE: k celicam dodano samo čisto celično gojišče.

Posadili smo celice v ustrezna polja enako kot v prvi fazi testov citotoksičnosti v treh tehničnih ponovitvah ter jih inkubirali 24 ur pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>.

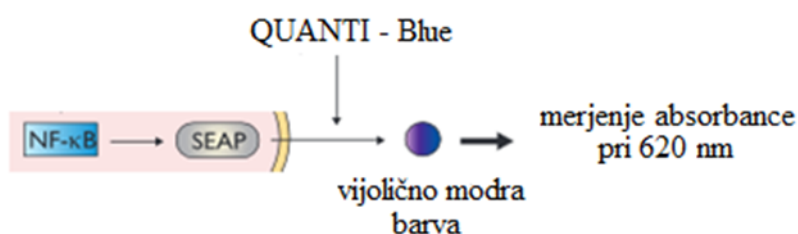
##### Druga faza – izpostavitve spojinam in kontrolam

V mikrocentrifugirkah smo pripravili po 500 µl celičnega gojišča s spojinami v takih koncentracijah, da končne koncentracije po dodatku k celicam več niso bile citotoksične. Za negativno kontrolo smo DMSO dodali k celičnemu gojišču v volumnu, ki je bil enak volumnu dodanih raztopin tistih spojin, ki so bile najmanj citotoksične in smo jih dodali v največjem volumnu. Za pripravo pozitivne kontrole smo odtalili zamrznjeno raztopino imikvimoda znane koncentracije. V treh poljih pozitivne kontrole 1 na mikrotitrski ploščici smo si želeli končno koncentracijo imikvimoda v celičnem gojišču 1 µg/ml, v treh poljih pozitivne kontrole 2 pa končno koncentracijo imikvimoda 2,5 µg/ml. Iz tega smo izračunali, koliko imikvimoda je bilo potrebno dodati v mikrocentrifugirko s celičnim gojiščem. Mikrocentrifugirke smo dobro pretresli na vorteksu. V ustrezna polja na mikrotitrski ploščici smo vnesli po 150 µl raztopin ustreznih testiranih spojin, raztopino DMSO v celičnem gojišču za negativno kontrolo, raztopino imikvimoda v celičnem gojišču za pozitivne kontrole in čisto celično gojišče za neizpostavljene celice. V vsakem polju na mikrotitrski ploščici, kamor smo v prvi fazi posadili celice, se je torej na koncu nahajalo 300 µl tekočine. Celice, izpostavljene spojinam in kontrolam, smo inkubirali 24 ur pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>.

### Tretja faza – spektrofotometrično testiranje

Pripravili smo še eno mikrotitrsko ploščico z enakimi oznakami istoležnih polj, kot so bile na mikrotitrski ploščici, v kateri so rasle celice. Napolnili smo polja s po 180  $\mu\text{l}$  odmrznjenega barvila **QUANTI-Blue**. K barvilu smo dodali po 20  $\mu\text{l}$  gojišča iz istoležnih polj mikrotitrsko ploščice, v kateri so rasle celice in bile izpostavljene različnim snovem (zajemali smo supernatant z vrha). Inkubirali smo 90 minut pri 37 °C in 5 %  $\text{CO}_2$ . Že s prostim očesom smo opazili spremembe barvila. Pokrite mikrotitrsko ploščice smo stresali na stresalniku in nato postavili odkrite ploščice na optični čitalnik ter pomerili absorbenco pri valovni dolžini 620 nm. Dobljene rezultate smo prenesli v Excelove preglednice in pripravili grafe z odzivi.

Transgene celice HEK-Blue hTLR7 so namenjene hitremu, občutljivemu in zanesljivemu določanju agonistov in antagonistov TLR. Izražajo gen za humani protein TLR7 ter gen za sekretorno embrionsko alkalno fosfatazo (SEAP), ki je pod nadzorom interferonskega promotorja. Po aktivaciji TLR7 NF- $\kappa$ B inducira reporterski gen za SEAP. Alkalna fosfataza se torej v primeru aktiviranih celic v večji meri izloča iz celic v supernatant. **Aktivnost alkalne fosfataze določamo s testom QUANTI-Blue** (slika 16). Merjenje agonističnega oziroma antagonističnega vpliva spojin na celice je torej izvedljivo, brez da bi bilo potrebno poškodovati celice. (41, 42) Barvilo se v prisotnosti alkalne fosfataze spremeni iz rožnate v vijolično modro barvo. Sprememba se izrazi tudi z višjim spektrofotometrično izmerjenim signalom pri 620 nm. Vrednosti alkalne fosfataze so višje pri agonističnem delovanju spojin. **Tistim spojinam, ki so se v preliminarnih testih izkazale kot agonisti in je njihovo gojišče v prisotnosti barvila torej dajalo visok signal, smo v nadaljnjih testih pri različnih redčitvah preverili pripadajoče  $\text{EC}_{50}$ .** (43)



**Slika 16: Dokazna reakcija za določanje aktivnosti spojin potencialnih agonistov TLR7 (44).**

#### 4.2.5 PRELIMINARNI TEST ANTAGONIZMA

Posamezni test antagonizma spojin, ki so se izkazale za necitotoksične, je trajal tri dni (tri faze). Antagonizem smo preverjali pri **najvišjih končnih koncentracijah v celičnem gojišču**, pri katerih spojine niso bile citotoksične.

##### Prva faza – posaditev celic

Določili smo polja za spojine in za ustrezne kontrole:

- POZITIVNE KONTROLE (pozitivna kontrola 1, pozitivna kontrola 2, pozitivna kontrola 3, pozitivna kontrola 4): DMSO v končnem celičnem gojišču v štirih različnih koncentracijah, enakih končnim koncentracijam DMSO pri testiranju spojin, ki so bile citotoksične pri štirih različnih koncentracijah (dodajanje raztopin spojin v štirih različnih volumnih). V polja pozitivne kontrole se ne dodaja imikvimoda v drugi fazi.
- NEGATIVNE KONTROLE (negativna kontrola 1, negativna kontrola 2, negativna kontrola 3, negativna kontrola 4): DMSO v končnem celičnem gojišču v štirih različnih koncentracijah, enakih končnim koncentracijam DMSO pri testiranju spojin, ki so bile citotoksične pri štirih različnih koncentracijah (dodajanje raztopin spojin v štirih različnih volumnih). V polja negativne kontrole se dodaja imikvimod v drugi fazi.
- NEIZPOSTAVLJENE CELICE: dodano samo čisto celično gojišče.

Posadili smo celice v ustrezna polja enako kot v prvi fazi testov citotoksičnosti in preliminarnih testov agonizma v dveh tehničnih ponovitvah ter jih inkubirali 24 ur pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>.

##### Druga faza – izpostavitve spojinam in kontrolam

V mikrocentrifugirkih smo pripravili celično gojišče s spojinami v takih koncentracijah, da končne koncentracije po dodatku k celicam več niso bile citotoksične. Ker smo opazili, da topilo DMSO lažno pozitivno vpliva na rezultate antagonizma, smo želeli preveriti njegov doprinos k rezultatom, zato smo ga za kontrolo dodajali v vseh možnih štirih koncentracijah, tako za pozitivno kontrolo kot za negativno kontrolo. Po 150 µl raztopin spojin in raztopin DMSO v celičnem gojišču smo dodajali v ustrezna polja. Poljem, rezerviranim za neizpostavljene celice, smo dodali samo celično gojišče. V vsakem polju na mikrotitrski ploščici, kamor smo v prvi fazi posadili celice, se je torej na koncu nahajalo 300 µl tekočine. Inkubirali smo 2 uri pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>. Odtalili smo zamrznjeno raztopino imikvimoda, jo redčili s celičnim gojiščem, da smo dosegli večji volumen, s

katerim se je bilo lažje rokovati, in raztopino dodali v vsa polja, kjer so bile celice izpostavljene spojinam ter v polja negativne kontrole, in sicer na način, da je bila v poljih končna koncentracija imikvimoda 1 µg/ml. Poljem pozitivne kontrole nismo dodajali imikvimoda. Inkubirali smo 24 ur pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>.

#### Tretja faza – spektrofotometrično testiranje

Potek je bil enak tretji fazi testov agonizma. Ker so bile vrednosti alkalne fosfataze po antagonističnem vplivu na celice nižje, je bil nižji tudi spektrofotometrično izmerjeni signal pri 620 nm. **Spojine z nizkim odzivom smo torej smatrali za antagoniste in smo jih izpostavili nadaljnjim testom, kjer smo določili EC<sub>50</sub>.**

### **4.2.6 DOLOČANJE EC<sub>50</sub> AGONISTOV**

Posamezni test določanja EC<sub>50</sub> spojin, ki so se izkazale kot agonisti, je trajal tri dni (tri faze). **Izbrali smo 5 spojin, ki so se v preliminarnih testih izkazale kot agonisti.**

#### Prva faza – posaditev celic

Določili smo polja za testiranje petih spojin pri šestih različnih koncentracijah in za ustrezne kontrole:

- **POZITIVNE KONTROLE** (pozitivna kontrola 1, pozitivna kontrola 2, pozitivna kontrola 3): DMSO v celičnem gojišču v treh različnih koncentracijah, enakih koncentracijam DMSO pri testiranju spojin, ki so bile citotoksične pri treh različnih koncentracijah (dodajanje raztopin spojin v treh različnih volumnih). V mikrocentrifugirke je bilo v drugi fazi potrebno dodati imikvimod, ustrezno redčiti in napolniti polja v šestih različnih koncentracijah.
- **NEGATIVNE KONTROLE** (negativna kontrola 1, negativna kontrola 2, negativna kontrola 3): DMSO v celičnem gojišču v treh različnih koncentracijah, enakih koncentracijam DMSO pri testiranju spojin, ki so bile citotoksične pri treh različnih koncentracijah (dodajanje raztopin spojin v treh različnih volumnih). Ne dodaja se imikvimoda v drugi fazi.
- **NEIZPOSTAVLJENE CELICE**: k celicam dodano samo čisto celično gojišče.

Posadili smo celice v ustrezna polja enako kot v prvi fazi testov citotoksičnosti, preliminarnih testov agonizma in antagonizma v dveh tehničnih ponovitvah ter jih inkubirali 24 ur pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>.

#### Druga faza – izpostavitve spojinam in kontrolam

V mikrocentrifugirkah smo pripravili ustrezne raztopine petih spojin, ki so se v preliminarnih testih izkazale kot agonisti ter jih dodajali k celicam v šestih različnih koncentracijah, tako da so bile koncentracije v končnem celičnem gojišču  $C_{max}$ ,  $C_{max}/2$ ,  $C_{max}/4$ ,  $C_{max}/8$ ,  $C_{max}/16$  in  $C_{max}/32$  glede na citotoksičnost. Tri pozitivne kontrole so bile zato, ker so bile pripravljene z različnimi volumni DMSO, saj smo tudi testirane raztopine spojin dodajali v treh različnih volumnih (imeli smo opravka s spojinami treh različnih citotoksičnosti). V tri mikrocentrifugirke z DMSO smo dodali ustrezno količino raztopine imikvimoda, pretresli in redčili ter polnili začetno raztopino in redčene raztopine v polja pozitivne kontrole, da smo dosegli šest različnih koncentracij DMSO in imikvimoda v končnem celičnem gojišču. Najvišja koncentracija imikvimoda v končnem gojišču s celicami je bila 5  $\mu\text{g/ml}$ . DMSO se je redčil hkrati z imikvimodom. Enako smo negativno kontrolo v mikrocentrifugirkah (DMSO) dali k celičnemu gojišču v treh volumnih, enakih volumnom dodanih raztopin spojin. Poljem, ki smo jih pustili za neizpostavljene celice, smo dodali samo celično gojišče. Mikrotitsko ploščico s celicami smo inkubirali 24 ur pri 37 °C in 5 %  $\text{CO}_2$ .

#### Tretja faza – spektrofotometrično testiranje

Postopek je bil enak postopku tretjega dne (tretje faze) testov preliminarne agonizma in antagonizma. Pri različnih koncentracijah spojin smo dobili različne odzive ter pripravili krivulje. **Vrednost  $\text{EC}_{50}$  smo določili s programom GraphPad Prism z nelinearno regresijo.** Program nam izriše krivuljo signala v odvisnosti od logaritma koncentracije za posamezno spojino ter nam poda vrednost  $R^2$ .

### **4.2.7 DOLOČANJE $\text{EC}_{50}$ ANTAGONISTOV**

Posamezni test določanja  $\text{EC}_{50}$  spojin, ki so se izkazale kot antagonisti, je trajal tri dni (tri faze). **Izbrali smo 2 spojini, ki sta se v preliminarnih testih izkazali kot antagonista.**

#### Prva faza – posaditev celic

Določili smo polja za testiranje dveh spojin v šestih različnih koncentracijah in za ustrezne kontrole:

- **POZITIVNA KONTROLA:** DMSO v celičnem gojišču v koncentraciji kot pri spojinah v šestih redčitvah. V poljih pozitivne kontrole ni dodan imikvimod v drugi fazi.

- NEGATIVNA KONTROLA: DMSO v celičnem gojišču v koncentraciji kot pri spojinah v šestih redčitvah. V poljih negativne kontrole je dodan imikvimod v drugi fazi.
- NEIZPOSTAVLJENE CELICE: dodano samo čisto celično gojišče.

Posadili smo celice v ustrezna polja enako kot v prvi fazi testov citotoksičnosti, preliminarnih testov agonizma oz. antagonizma in pri testih določanja  $EC_{50}$  agonistov ter jih inkubirali 24 ur pri 37 °C in 5 %  $CO_2$ .

#### Druga faza – izpostavitve spojinam in kontrolam

V mikrocentrifugirkah smo pripravili ustrezne raztopine obeh spojin, ki sta se v preliminarnih testih izkazali kot antagonista ter ju dodali k celicam v šestih različnih koncentracijah, tako da so bile koncentracije v končnem celičnem gojišču  $C_{max}$ ,  $C_{max}/2$ ,  $C_{max}/4$ ,  $C_{max}/8$ ,  $C_{max}/16$  in  $C_{max}/32$  glede na citotoksičnost. V polja s pozitivno in negativno kontrolo smo vnesli raztopino DMSO v celičnem gojišču. DMSO je bil celičnemu gojišču dodan v enakem volumnu, kot je bil volumen raztopin teh dveh spojin. Spojinim smo dodali v enakih volumnih zaradi enake citotoksičnosti. Inkubirali smo 2 uri pri 37 °C in 5 %  $CO_2$ . Iz zmrzovalnika smo vzeli raztopino imikvimoda znane koncentracije in jo odtalili. Imikvimod smo dodali v vsa polja, kjer so bile celice izpostavljene spojinam ter v polja negativne kontrole in sicer na način, da smo v vseh teh poljih dosegli končno koncentracijo imikvimoda 1  $\mu\text{g/ml}$ . Najprej smo osnovno raztopino imikvimoda redčili s celičnim gojiščem, da smo dosegli večji volumen, s katerim se je bilo lažje rokovati ter to raztopino dodajali v polja v ustrezni količini. Inkubirali smo 24 ur pri 37 °C in 5 %  $CO_2$ .

#### Tretja faza – spektrofotometrično testiranje

Postopek je bil enak postopku tretjega dne (tretje faze) testov preliminarnega agonizma, antagonizma ter testov za določitev  $EC_{50}$  agonistov. Pri različnih koncentracijah spojin smo dobili različne odzive ter poskušali pripraviti krivulje.

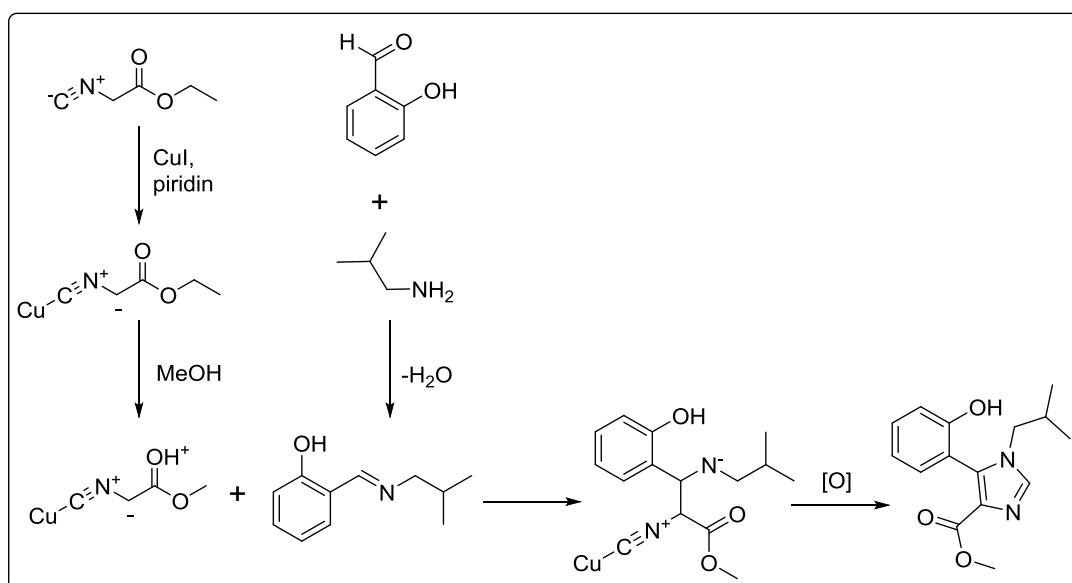


## 5. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1 SINTEZA, IZOLACIJA IN ANALITIKA SPOJIN

Preizkušali smo tri sintezne poti do novih potencialnih agonistov ali antagonistov TLR7. Opirali smo se na dvostopenjsko reakcijo, opisano v literaturi. (13, 32)

V prvi stopnji (slika 17), kjer smo izhajali iz različnih benzaldehidov, najprej nastane Cu(I) aktiviran izocijanidni kompleks, katerega deprotonacijo povzroči piridin. Primarni amin reagira s salicilaldehidom do imina, ki ga potem napade deprotoniran Cu(I) aktiviran izocijanidni kompleks. Sledi še z bakrom katalizirana tvorba obroča ter protonacija in oksidacija do imidazolnega obroča. (32)



**Slika 17: Mehanizem poteka 1. stopnje reakcije izhajajoč iz enostavnega salicilaldehida, povzeto po viru (32).**

Snovi so skrbno izbrane z namenom optimizacije reakcije. Na sliki 17 prikazana substrata sta salicilaldehid (v naših treh sintezah smo uporabili njegove derivate) in etil 2-izocianoacetat. Topilo MeOH je ustrezno z vidika, da raztaplja reagente ne pa končnih produktov. Obenem je pomembno za transesterifikacijo. Bazo je potrebno uporabiti zaradi samega vpliva na potek kemijske reakcije, pri čemer je ustrezna izbira piridin, ki vodi do visokega izkoristka reakcije v primerjavi z drugimi bazami. Med bakrovimi solmi se je kot najboljši katalizator izkazal Cu(I). Molarno razmerje med komponentami reaktantov v prvih stopnjah posameznih sintez je enako etil 2-izocianoacetat/izobutilamin/benzaldehid/piridin/Cu(I) = 1/1/1/0,1. Reakcijo na sliki 17 naj bi se izvajalo 5 ur pri 50 °C. (32) Daljši čas izvedbe v našem laboratoriju je posledica

drugačnih derivatov, ki počasneje reagirajo, ter želje po doseg čim višjih izkoristkov. Reakcija je potekala 20 ur, kar je opisano v poglavju *Eksperimentalno delo*. (13)

Do poteka izrisane multikomponentne reakcije so se raziskovalci dokopali pri študiju sinteze derivatov kumarina. Posamične reakcije lahko potečejo sočasno, kombinirano v eni posodi («one-pot synthesis»), reagenti in pogoji pa so skrbno izbrani. Gre torej za moderen, do okolja prijazen način, pri katerem se prihrani material in čas, ob tem pa se doseže boljše izkoristke. (32)

Iz različnih derivatov izhodnih spojin lahko teoretično preko istega poteka reakcije pridemo do različnih, a sorodnih produktov z različnimi N-substitucijami ali z različnim številom oziroma pozicijo OH (hidroksilnih) skupin. Nekatere spremembe reagentov lahko zahtevajo rahlo drugačne pogoje za potek reakcije, oziroma reakcije potečejo z nižjim izkoristkom ali pa sploh ne vodijo do produktov. Pri eksperimentalnem delu smo preizkušali, če in kako iz treh različnih hidroksibenzaldehidov pridemo do teoretično možnih produktov, ki bi bili ligandi TLR7. Postopek smo nekoliko prilagodili glede na strukturo oz. lastnosti naših spojin (npr. nismo naalkalili pred ekstrakcijo iz vodne v organsko fazo, kot je opisano v literaturi (13), saj bi se aromatske OH skupine deprotonirale). Pri drugi stopnji sinteze pri segrevanju z mikrovalovi nismo naalkalili s  $K_2CO_3$ , kot je opisano v literaturi (32), temveč smo sistem nakisali s  $H_2SO_4$ . (13) Poleg tega z našim eksperimentalnim delom nismo uspeli potrditi visokih izkoristkov reakcije, prikazane na sliki 17. (32)

Kot smo že opisali pri izolacijah posameznih spojin, smo reakcijske zmesi z vsebujočimi zelenimi produkti čistili s pomočjo ekstrakcij, s kolonsko kromatografijo ter s prekriztalizacijo iz topil. S pomočjo TLC smo spremljali nastanek produkta v reakcijski zmesi ter potek čiščenja iz reakcijske zmesi. Poleg TLC smo identiteto spojine potrdili oz. preverili še z NMR, MS, IR, HPLC in z določanjem  $T_{tal}$  spojine.

### **5.1.1 SINTEZA 7-hidroksi-1-izobutilkromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-ona in njegovega derivata 1-izobutil-4-okso-1,4-dihidro-kromeno[3,4-*d*]imidazol-7-il acetata**

Sinteza, pri kateri smo izhajali iz 4-benziloksi-2-hidroksibenzaldehida, je potekla samo v prvi stopnji (**2**). Izkoristek reakcije je sicer le 28 %, a produkt prve stopnje, ki smo

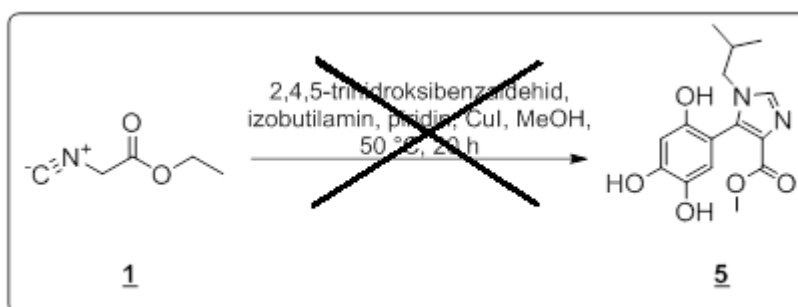
ga dobili, je po podatkih, pridobljenih z NMR, zelo čist. Zaradi kompleksnosti reakcijske zmesi je bil pri izolaciji potreben suh nanos in tudi večstopenjsko čiščenje.

Ciklične spojine po drugi stopnji nismo uspeli izolirati. Na vseh TLC sta se pojavljali dve lisi. Predvidevali smo, da je odstranitev benzilne zaščite sicer potekla, reakcija kondenzacije obročev pa verjetno ne. Vseeno pa smo z 0,072 g snovi, ki smo jo pridobili po drugi stopnji, poskušali izvesti tretjo stopnjo reakcije.

Po tretji stopnji so nam številni  $^1\text{H-NMR}$  spektri pokazali, da nismo uspeli sintetizirati želenega acetiliranega produkta.

### 5.1.2 SINTEZA 7,8-dihidroksi-1-izobutilkromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-ona

Pri izolaciji spojine **5** smo uporabili bolj polarno mobilno fazo kot v primeru sinteze **2**, saj smo predvidevali, da je produkt bolj polaren. Glede na TLC, izveden po potencialnem poteku reakcije, nismo vedeli, ali smo pridobili kaj produkta ali ne, saj nismo imeli standarda za primerjavo. Opazili smo le, da benzaldehid ni ostal nezreagiran. Na podlagi NMR analize smo ugotovili, da nismo dobili želenega produkta.



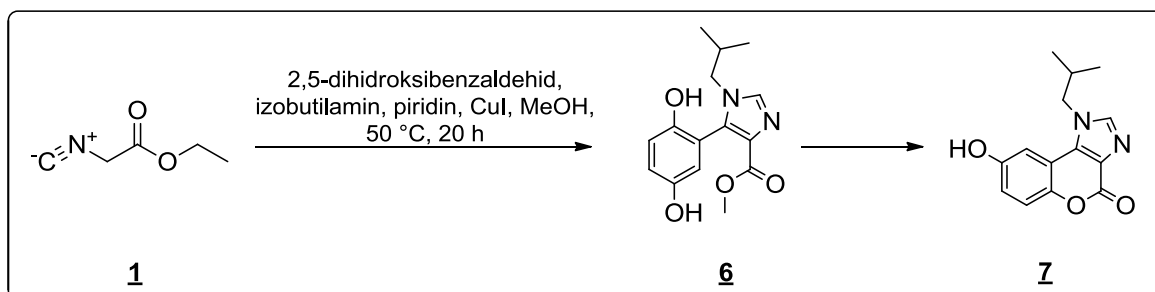
Slika 18: Reakcija z uporabljenimi reagenti pri navedenih pogojih je neuspešna.

Sinteza, pri kateri smo izhajali iz 2,4,5-trihidroksibenzaldehida, torej ni bila uspešna, saj ni potekla niti v prvi stopnji. Najverjetneje bi bilo potrebno zaščititi OH skupine benzaldehida. Glede na rezultate ostalih podobnih sintez, ki smo jih izvedli, je problematična predvsem nezaščitena OH skupina na mestu 4.

### 5.1.3 SINTEZA 8-hidroksi-1-izobutilkromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-ona

Sinteza, pri kateri smo izhajali iz 2,5-dihidroksibenzaldehida, je potekla do konca. Prva stopnja je potekla s sicer zelo nizkim izkoristkom 9 %. Posneli smo  $^1\text{H-NMR}$  spekter, ki je pokazal, da se je produkt prve stopnje že cikliziral in nastal je končni produkt (slika 19).

Na dva različna načina smo poskušali izvesti reakcijo druge stopnje, da bi videli, če se produkt po drugi stopnji kaj razlikuje od tistega po prvi stopnji. Z  $^1\text{H-NMR}$  spektrom in s TLC (mobilna faza DKM/MeOH = 9/1) smo dokazali, da je produkt druge stopnje enak produktu prve stopnje.



**Slika 19: Dejanski potek sinteze spojine 7 v eni stopnji.**

Pri reakciji iz 2,5-dihidroksibenzaldehida smo končni produkt torej dobili že po prvi stopnji sinteze, kar je izredno zanimivo. To je najverjetneje posledica prekomernega segrevanja pri odparevanju topila. Kislost silikagela ni mogla tako močno vplivati. Izolirati nam je uspelo eno novo spojino (**6**), ki smo ji v nadaljevanju ovrednotili topnost, citotoksičnost ter potencialno agonistično in antagonistično delovanje v laboratoriju na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, kjer smo izvajali drugi del eksperimentalnega dela.

## 5.2 BIOLOŠKO TESTIRANJE SPOJIN

Ovrednotili smo topnost, citotoksičnost ter potencialno agonistično oz. antagonistično delovanje 25 spojinam. Testirali smo spojino **6**, ki smo jo sintetizirali in izolirali v prvem delu eksperimentalnega dela. Poleg te spojine smo ovrednotili še dve drugi sintetizirani in izolirani spojini na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo (spojini **8** in **9**) ter 22 kupljenih spojin, načrtovanih z virtualnim reševanjem na osnovi podobnosti z ligandom imikvimodom z uporabo programa LiSiCA. (13)

## 5.2.1 TOPNOST SPOJIN

Preglednica V: Največje koncentracije spojin v DMSO oz. koncentracije osnovnih raztopin pri katerih so spojine še topne pri 25 °C.

50 mmol/l	25 mmol/l	12,5 mmol/l	Izločimo
<u>179</u>	<u>421</u>	<u>934</u>	<u>093</u>
<u>244</u>	<u>050</u>	<u>956</u>	
<u>335</u>	<u>773</u>	<u>474</u>	
<u>280</u>	<u>637</u>	<u>375</u>	
<u>355</u>	<u>588</u>	<u>258</u>	
<u>9</u>	<u>330</u>		
<u>8</u>	<u>668</u>		
	<u>712</u>		
	<u>486</u>		
	<u>331</u>		
	<u>6</u>		
	<u>823</u>		

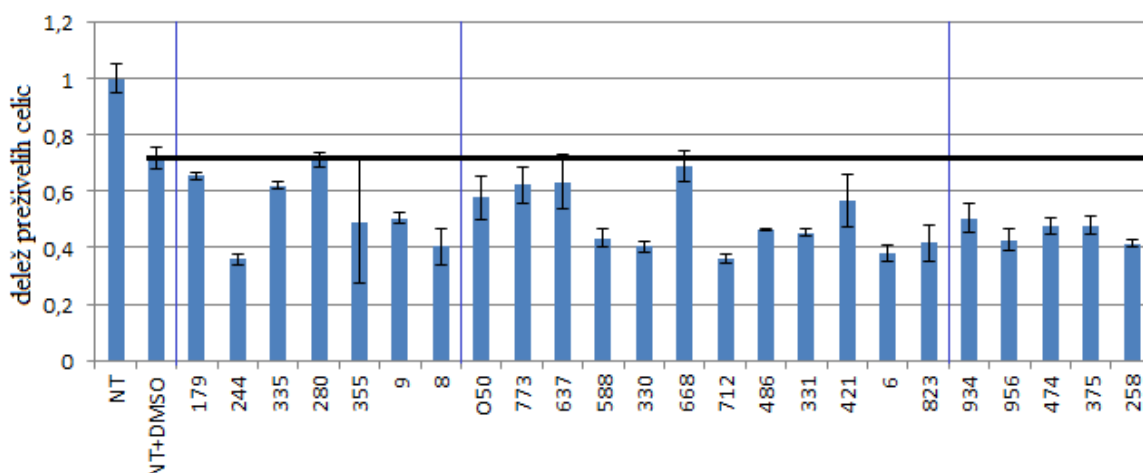
Raztopine spojin v DMSO smo h končnemu celičnemu gojišču dodajali tako, da je DMSO predstavljal največ 1 v/v %. Višje koncentracije DMSO namreč delujejo citotoksično. V nadaljevanju smo ugotovili celo, da DMSO tudi v nižjih koncentracijah od 1 v/v % precej vpliva na rezultate (lažno pozitivni rezultati pri testih antagonizma). Pomembno je, da pravilno določimo topnost, kajti škoda bi bilo, da bi spojino smatrali za citotoksično, nazadnje pa bi ugotovili, da je slabši razrast celic v njeni prisotnosti posledica mehanskega uničenja celic s kristali in ne posledica citotoksičnosti raztopljenе spojine. Poleg tega se v prenasajenih raztopinah dejanska koncentracija razlikuje od izračunane, kar bi lahko vplivalo na lažno pozitivne oziroma lažno negativne rezultate testiranja agonizma in antagonizma. Celično gojišče, ki smo ga uporabljali, je moralo biti sobne temperature, saj bi se v primeru, da bi ga vzeli direktno iz hladilnika, pokazala slabša topnost spojin. Spojinam, raztopljenim v gojišču, smo po 24 urah ponovno preverili topnost in s tem izključili obarjanje po dlje časa trajajočem mirovanju, kar je nujno za testiranja, kjer so bile celice izpostavljene spojinam 24 ur.

Spojina 8 se je izkazala za topno v DMSO in v celičnem gojišču, a se je v nadaljnjih testiranjih po dodatku h končnemu celičnemu gojišču s celicami včasih izkristaliziral kakšen kristalček, zato bi mogoče predlagali dodatno redčenje v primeru ponovne obravnave te spojine. Raztopina spojine 093 v DMSO se že pri pregledu s prostim očesom proti svetlobi ni zdela bistra, zato smo jo izključili iz obravnave.

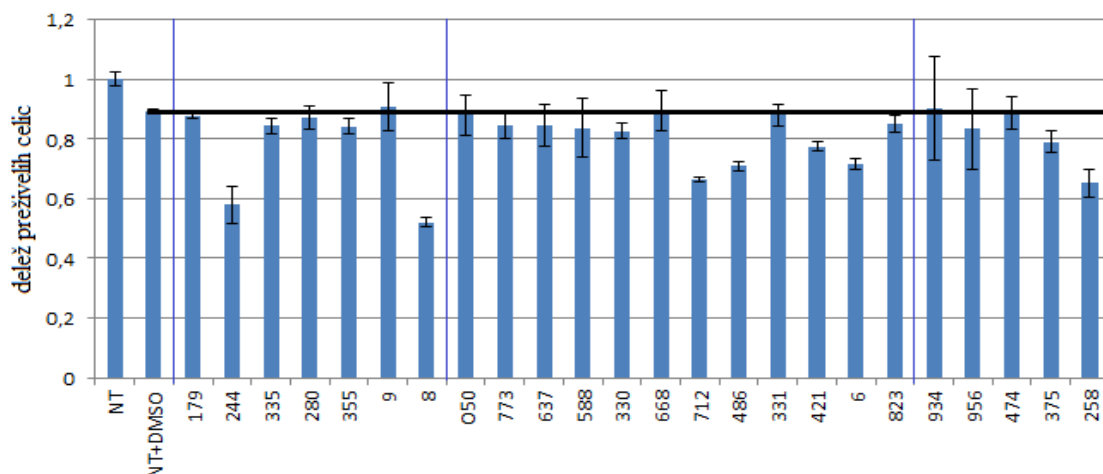
## 5.2.2 ROKOVANJE S CELICAMI IN SPLOŠNO O TESTIRANJIH

Pri delu smo naleteli na marsikateri zanimiv problem. Zelo pomembno je, da se v novo gojitveno posodico zasadi dovolj celic, kajti če se jih premalo, se ne uspejo razrasti, saj je med njimi prešibko signaliziranje (vsaj okrog 1.000.000 je zaželeno). Prav tako lahko postane po večkratnem presajanju (več kot 20 krogov) stabilnost celične linije precej nizka in celice so neuporabne za nadaljnja testiranja. Na hitrost rasti celic pomembno vpliva koncentracija govejega seruma v celičnem gojišču. Večja kot je koncentracija, večja je hitrost rasti. Pri posaditvi celic v polja mikrotitrne ploščice pred testiranjem je zares pomembno, da so celice dobro resuspendirane, saj s tem zagotovimo njihovo bolj enakomerno razporejenost po poljih in posledično višjo relevantnost testov. Posadili smo 25.000 do 40.000 celic v posamezno polje. O številu smo se odločali po občutku glede na to, kakšna se nam je zdela kinetika rasti celic. Ker testi trajajo tri dni, je potrebno polja mikrotitrne ploščice načrtovati tako, da robna polja zapolnimo s pufrom in niso namenjena testiranju spojin na celicah, saj ob robu prihaja do izhlapevanja gojišča, kar lahko vpliva na rezultate. Potrebno je preverjanje razrasti celic pod mikroskopom drugi dan testiranja. Prepričati se moramo, če gre za enakomerno rast, dovoljšnjo rast ali če je morebiti prišlo do okužbe. Če se celice niso dovolj razrasle, je priporočljivo, da se počaka dodatni dan in da se šele tretji dan doda raztopine spojin, četrti dan pa izvede spektrofotometrične analize. Okužbo celic z bakterijami se pod mikroskopom opazi kot drobne pikice, ki so veliko manjše od celic. Gojišče je v tem primeru spremenjeno in tudi odziv MTS pri spektrofotometrični analizi je večji, torej rezultatov testiranja ne moremo pridobiti. Kljub temu, da je gojišču dodan antibiotik, se še vedno najdejo odporne bakterije.

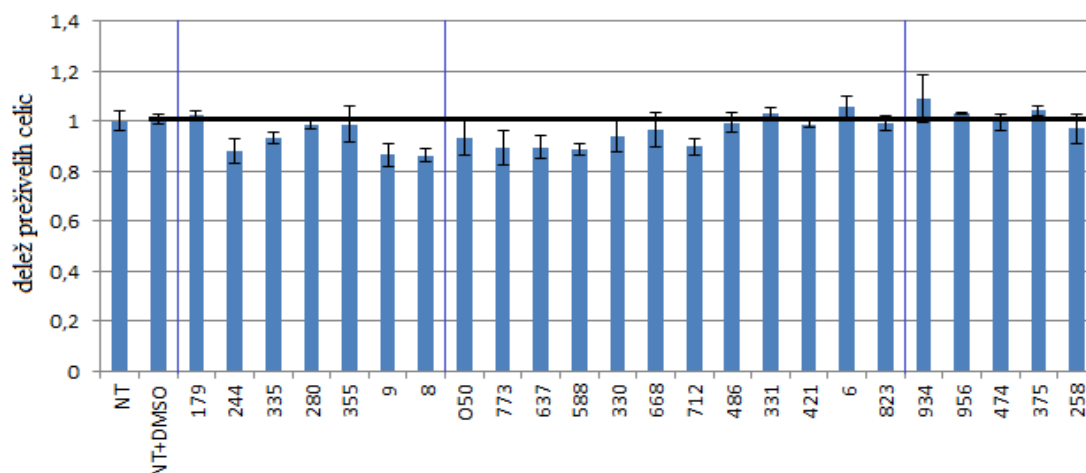
### 5.2.3 CITOTOKSIČNOST SPOJIN



Slika 20: Citotoksičnost pri Cmax glede na topnost: Na osi X so raztopine spojin od 179 do 8 pri koncentraciji 500  $\mu\text{M}$ , raztopine spojin od 050 do 823 so 250  $\mu\text{M}$ , raztopine spojin od 934 do 258 pa so 125  $\mu\text{M}$ . Naveden v/v % DMSO in navedene koncentracije raztopin spojin se navezujejo na raztopine spojin v končnem celičnem gojišču, pri čemer predstavlja DMSO 1 v/v %. Os Y prikazuje delež preživelih celic, ki je premosorazmeren absorbanco pri 492 nm. (NT = neizpostavljene celice)



Slika 21: Citotoksičnost pri Cmax/2 glede na topnost: Na osi X so raztopine spojin od 179 do 8 pri koncentraciji 250  $\mu\text{M}$ , raztopine spojin od 050 do 823 so 125  $\mu\text{M}$ , raztopine spojin od 934 do 258 pa so 62,5  $\mu\text{M}$ . Naveden v/v % DMSO in navedene koncentracije raztopin spojin se navezujejo na raztopine spojin v končnem celičnem gojišču, pri čemer predstavlja DMSO 0,5 v/v %. Os Y prikazuje delež preživelih celic, ki je premosorazmeren absorbanco pri 492 nm. (NT = neizpostavljene celice)



**Slika 22: Citotoksičnost pri  $C_{max}/4$  glede na topnost: Na osi X so raztopine spojin od 179 do 8 pri koncentraciji  $125 \mu\text{M}$ , raztopine spojin od 050 do 823 so  $62,5 \mu\text{M}$ , raztopine spojin od 934 do 258 pa so  $31,25 \mu\text{M}$ . Naveden v/v % DMSO in navedene koncentracije raztopin spojin se navezujejo na raztopine spojin v končnem celičnem gojišču, pri čemer predstavlja DMSO 0,25 v/v %. Os Y prikazuje delež preživelih celic, ki je premosorazmeren absorbananci pri 492 nm. (NT = neizpostavljene celice)**

Glede na prikazane grafe (slika 20, slika 21 in slika 22) ter glede na mikroskopski pregled mikrotitrne ploščice DMSO bistveno prispeva k citotoksičnosti pri koncentracijah 1 v/v % in 0,5 v/v % v končnem celičnem gojišču. Delež DMSO v poljih negativne kontrole je enak deležu raztopin spojin pri posameznem testu. Delež preživelih celic, ki je očitno nižje od črte, ki predstavlja delež preživelih celic pri negativni kontroli, nakazuje citotoksičnost spojine. Na podlagi teh grafov smo ugotovili, katere so najvišje izmerjene koncentracije spojin v celičnem gojišču, pri katerih ni prišlo do citotoksičnosti.

Za spojine 8, 244 in 712 smo se glede na zelo slabe rezultate pri višjih koncentracijah in tudi glede na nekatere dodatne teste vseeno odločili za dodatno redčenje.



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

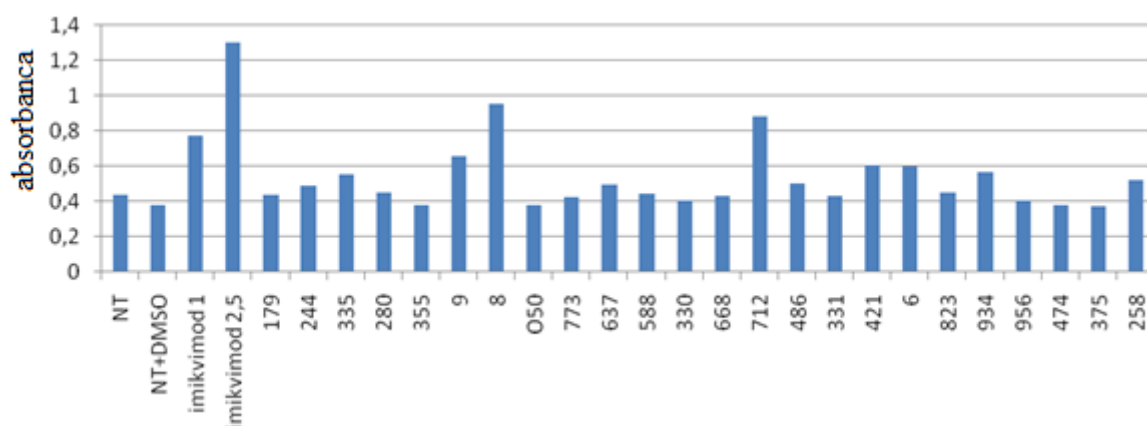
<b>1 % raztopina DMSO v končnem gojišču s celicami</b>	<b>0,5 % raztopina DMSO v končnem gojišču s celicami</b>	<b>0,25 % raztopina DMSO v končnem gojišču s celicami</b>	<b>0,125 % raztopina DMSO v končnem gojišču s celicami</b>
<u>280</u> (500 µM)	<u>179</u> (250 µM)	<u>486</u> (62,5 µM)	<u>8</u> (62,5 µM)
<u>668</u> (250 µM)	<u>335</u> (250 µM)	<u>421</u> (62,5 µM)	<u>244</u> (62,5 µM)
	<u>355</u> (250 µM)	<u>6</u> (62,5 µM)	<u>712</u> (31,25 µM)
	<u>9</u> (250 µM)	<u>375</u> (31,25 µM)	
	<u>050</u> (125 µM)	<u>258</u> (31,25 µM)	
	<u>773</u> (125 µM)		
	<u>637</u> (125 µM)		
	<u>588</u> (125 µM)		
	<u>330</u> (125 µM)		
	<u>331</u> (125 µM)		
	<u>823</u> (125 µM)		
	<u>934</u> (62,5 µM)		
	<u>956</u> (62,5 µM)		
	<u>474</u> (62,5 µM)		

#### **5.2.4 TESTI AKTIVNOSTI SPOJIN**

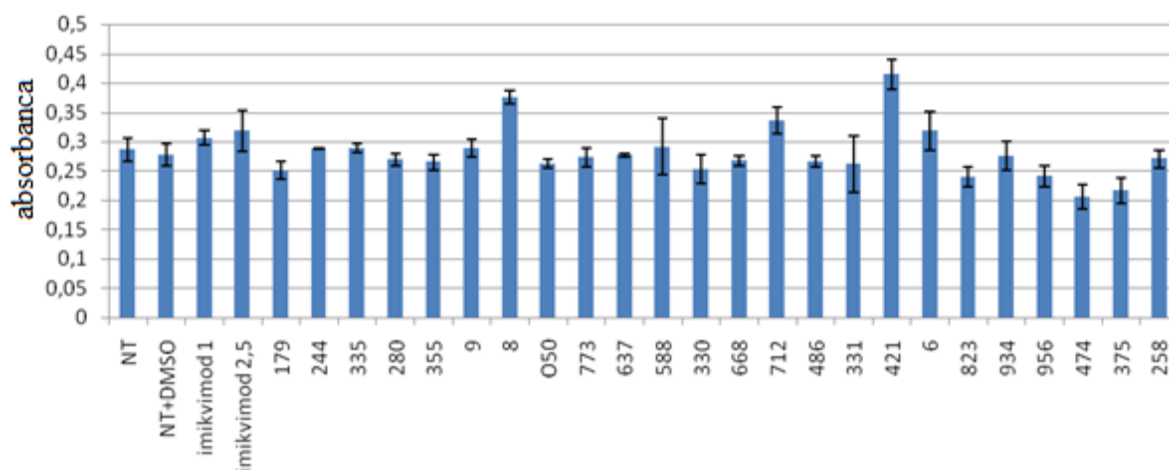
Pri testih agonizma in antagonizma je najprej smiselno preveriti, če QUANTI–Blue barvilo potemni v prisotnosti gojišča, v katerem rastejo celice, ki niso izpostavljene agonistom. To pomeni, da so celice že same po sebi zelo vzdružene (v gojišču je veliko izločene alkalne fosfataze), zato je v tem primeru smiselno odmrzniti nove celice, saj drugače težko razberemo rezultate zaradi močnega ozadja. Prav z namenom, da se ne bi preveč vzbudile, je potrebno nežno rokovanje z njimi in izpostavitvev čimbolj milim pogojem npr. nižjim obratom pri centrifugiranju in manj agresivnemu resuspendiranju.

Pomembno se je zavedati, da smo obravnavali spojine različnih koncentracij, kar je posledica različne topnosti in citotoksičnosti raztopin spojin. V preliminarnih testih torej enaki odzivi pri testiranju različnih spojin še ne pomenijo, da so spojine enako močni agonisti oz. antagonisti.

## 5.2.5 AGONIZEM SPOJIN



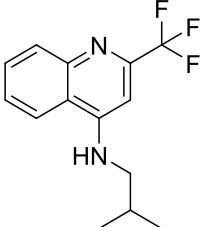
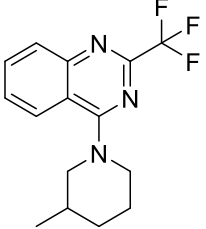
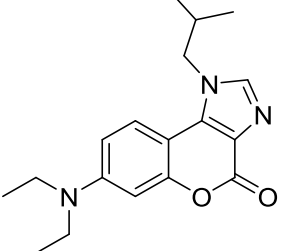
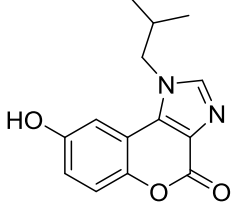
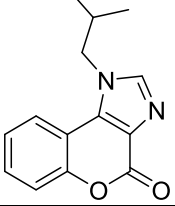
Slika 23: Agonizem pri preliminarnem testu pri Cmax glede na citotoksičnost. Koncentracije spojin v celičnem gojišču so podane v preglednici VI, prav tako tudi delež DMSO v celičnem gojišču pri testiranju posamezne spojine. DMSO v poljih negativne kontrole je bil dodan v celično gojišče v 1 v/v %, kar sovpada z raztopinami spojin, ki smo jih dodali v največjih količinah. Prikazane so absorbance pri 620 nm (os y) testiranih raztopin spojin (os x). (NT = neizpostavljene celice)



Slika 24: Agonizem pri ponovljenem preliminarnem testu pri Cmax glede na citotoksičnost (glej sliko 23).

Na podlagi rezultatov testov preliminarnega agonizma smo pridobili 5 agonistov, in sicer spojine 712, 421, 8, 6 in 9, ki smo jim v nadaljnjih testih določili EC<sub>50</sub> agonizma.

Preglednica VII: Strukture in analitika aktivnih spojin.

SPOJINA MOLEKULSKA FORMULA	STRUKTURA	MOLEKULSKA MASA	HPLC Rt  HPLC čistost
<p><b>712</b></p> <p><math>C_{14}H_{15}F_3N_2</math></p>		<p>ESI-HRMS Izračunano za <math>C_{14}H_{16}F_3N_2 [M+H]^+</math>: 269,1266 Izmerjeno: 269,1270</p>	<p>4,19 min 99,22 %</p>
<p><b>421</b></p> <p><math>C_{15}H_{16}F_3N_3</math></p>		<p>ESI-HRMS Izračunano za <math>C_{15}H_{17}N_3F_3 [M+H]^+</math>: 296,1375 Izmerjeno: 296,1379</p>	<p>14,67 min 99,65 %</p>
<p><b>8</b></p> <p><math>C_{18}H_{23}N_3O_2</math></p>		<p>ESI-HRMS Izračunano za <math>C_{18}H_{24}N_3O_2 [M+H]^+</math>: 314,1869 Izmerjeno: 314,1867  (45)</p>	<p>12,15 min 99,91 % (45)</p>
<p><b>6</b></p> <p><math>C_{14}H_{14}N_2O_3</math></p>		<p>ESI-HRMS Izračunano za <math>C_{14}H_{15}N_2O_3 [M+H]^+</math>: 259,1083 Izmerjeno: 259,1076</p>	<p>7,521 min 99,81 %</p>
<p><b>9</b></p> <p><math>C_{14}H_{14}N_2O_2</math></p>		<p>ESI-HRMS Izračunano za <math>C_{14}H_{15}N_2O_2 [M+H]^+</math>: 243,1134 Izmerjeno: 243,1130</p>	

Vse obravnavane spojine glede na HPLC presegajo zahtevano čistost 95 %.

Za agonista **712** in **421** smo posneli še  $^1H$ -NMR spekter. Dodatni rezultati analitike spojine **8** so predstavljeni v magistrskem delu Maje Gregorič. (45)

Preglednica VIII:  $^1\text{H-NMR}$  in  $^{13}\text{C-NMR}$  analitika za spojini **712** in **421**.

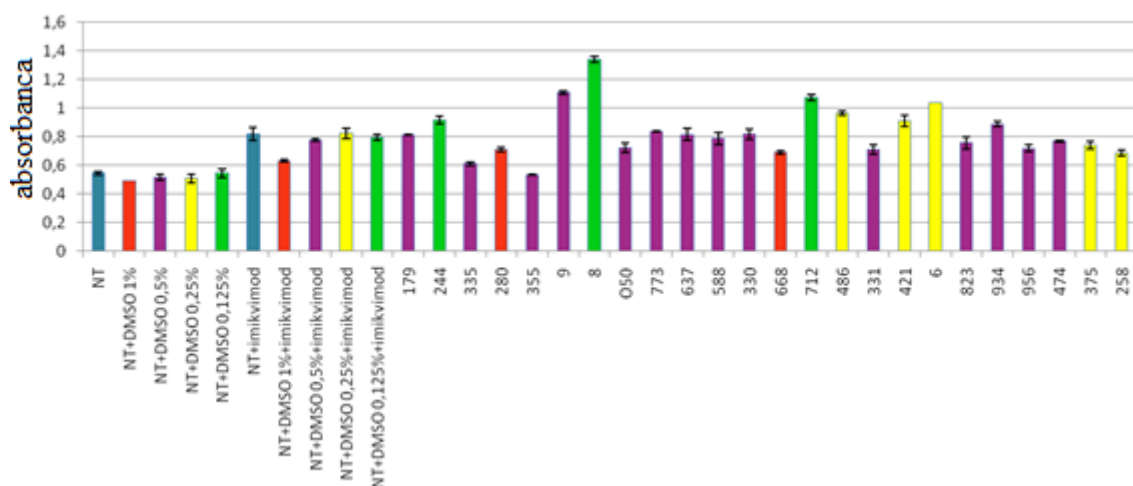
SPOJINA	$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ )
<b>712</b>	$\delta$ (ppm) 0,97 (d, $J = 6,6$ Hz, 6 H, 2 x $\text{CH}_3$ ); 2,04 (sep, $J = 6,6$ Hz, 1 H, CH); 3,18 (dd, $J_1 = 5,8$ Hz, $J_2 = 7,0$ Hz, $J_3 = 13,1$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2$ ); 6,72 (s, 1 H, Ar-H); 7,56 (ddd, $J_1 = 1,2$ Hz, $J_2 = 6,8$ Hz, $J_3 = 8,3$ Hz, 1 H, Ar-H); 7,71–7,78 (m, 2 H, Ar-H); 7,88 (dd, $J_1 = 1,0$ Hz, $J_2 = 8,5$ Hz, 1 H, Ar-H); 8,37 (dd, $J_1 = 0,8$ Hz, $J_2 = 8,6$ Hz, 1 H, Ar-H)
<b>421</b>	$\delta$ (ppm) 0,93 (d, $J = 6,5$ Hz, 3 H, $\text{CH}_3$ ); 1,22–1,32 (m, 1 H, CH); 1,62–1,73 (m, 1 H, CH); 1,78–1,89 (m, 3 H, $\text{CH}_2\text{CH}$ ); 2,96 (dd, $J_1 = 10,5$ Hz, $J_2 = 13,0$ Hz, 1 H, CH); 3,24 (ddd, $J_1 = 2,9$ Hz, $J_2 = 11,7$ Hz, $J_3 = 13,1$ Hz, 1 H, CH); 4,28–4,32 (m, 1 H, CH); 4,34–4,39 (m, 1 H, CH); 7,63–7,70 (m, 1 H, Ar-H); 7,89–7,91 (m, 2 H, Ar-H); 8,04 (dt, $J_1 = 1,2$ Hz, $J_2 = 8,4$ Hz, 1 H, Ar-H)

Preglednica IX: Rezultati  $\text{EC}_{50}$  po dveh testiranjih ter  $\text{R}^2$  pripadajočih krivulj.

SPOJINA, najvišja koncentracija, % DMSO	$\text{EC}_{50}$ 1. TEST	$\text{EC}_{50}$ 2. TEST	$\text{R}^2$ 1. TEST	$\text{R}^2$ 2. TEST
Imikvimod (DMSO 0,5 %)	8,5 $\mu\text{M}$	10,5 $\mu\text{M}$	0,959	0,964
Imikvimod (DMSO 0,25 %)	6,2 $\mu\text{M}$	7,0 $\mu\text{M}$	0,973	0,977
Imikvimod (DMSO 0,125 %)	8,2 $\mu\text{M}$	8,6 $\mu\text{M}$	0,980	0,962
<b>712</b> (DMSO 0,125 %)	6,3 $\mu\text{M}$	10,3 $\mu\text{M}$	0,858	0,915
<b>421</b> (DMSO 0,25 %)	4,0 $\mu\text{M}$	10,8 $\mu\text{M}$	0,922	0,928
<b>8</b> (DMSO 0,125 %)	29,94 $\mu\text{M}$	30,7 $\mu\text{M}$	0,934	0,923
<b>6</b> (DMSO 0,25 %)	1,8 $\mu\text{M}$	7,5 $\mu\text{M}$	0,919	0,863
<b>9</b> (DMSO 0,5 %)	575,9 $\mu\text{M}$	1655,0 $\mu\text{M}$	0,977	0,932

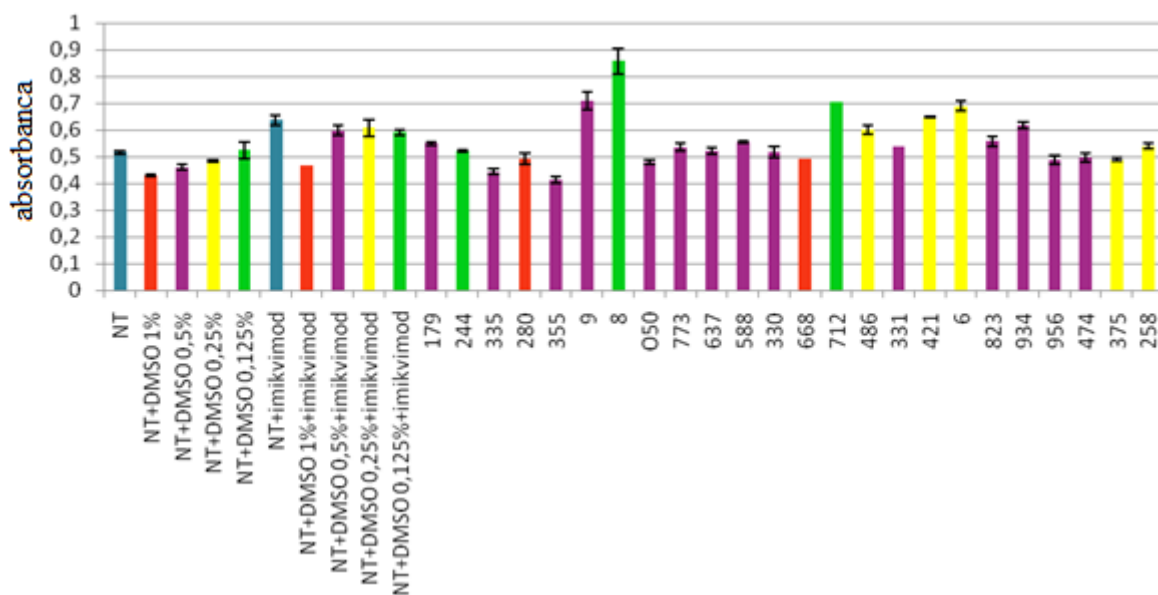
Krivulje odzivov posameznih agonistov so v Prilogi 1.

## 5.2.6 ANTAGONIZEM SPOJIN



Slika 25: Antagonizem pri preliminarnem testu pri Cmax glede na citotoksičnost.

Koncentracije spojnin v celičnem gojišču so podane v preglednici VI, prav tako tudi delež DMSO v celičnem gojišču pri testiranju posamezne spojnine. Z enako barvo so obarvani odzivi spojnin, ki smo jih dodajali v enakem volumnu, in pripadajoča kontrola. DMSO v poljih negativne kontrole je bil dodan v celično gojišče v različnih deležih glede na raztopine spojnin. Prikazane so absorbance (os y) testiranih raztopin spojnin (os x). (NT = neizpostavljene celice)



Slika 26: Antagonizem pri ponovljenem preliminarnem testu pri Cmax glede na citotoksičnost (glej sliko 25). Z enako barvo so obarvani odzivi spojnin, ki smo jih dodajali v enakem volumnu, in pripadajoča kontrola.

Posamezne spojnine in kontrole smo testirali le v dveh tehničnih ponovitvah zaradi boljše preglednosti na mikrotitrski ploščici. Po dodatku raztopin spojnin k celicam je bilo nujno počakati dve uri pred dodatkom imikvimoda. S tem smo zagotovili, da so se molekule testiranih spojnin imele čas vezati na receptorje. Koncentracije spojnin v celičnem gojišču in deleži DMSO v celičnem gojišču pri testiranju posamezne spojnine so podani v

preglednici VI. Težko je bilo določiti, kolikšen delež k antagonizmu prispevajo spojine in kolikšnega DMSO. Zato je bilo potrebno narediti kontrole z različnimi dodatki DMSO, saj so pri testiranju različnih spojin v celičnem gojišču različni deleži DMSO. Za primer lahko izpostavimo spojino **668**, ki ima na prvi pogled antagonistično delovanje, dejansko pa ni antagonist, prav zaradi vpliva DMSO.

Spojini **335** in **355** v koncentraciji 250  $\mu\text{M}$  v končnem celičnem gojišču pa sta se ne glede na vpliv topila izkazali kot antagonista. Navedeni spojini smo testirali v nadaljnjih testih, da bi določili  $\text{EC}_{50}$  antagonizma. Vpliv DMSO je bil zelo velik, težko ga je bilo izmeriti oz. ovrednotiti in posledično težko odšteti. Pri testih antagonizma veliko bolj zamaskira rezultate kot pri testih agonizma.

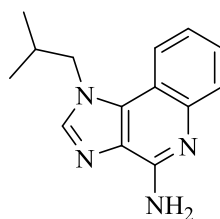
### **5.3 ODNOS MED STRUKTURO IN LASTNOSTMI TER MED STRUKTURO IN DELOVANJEM SPOJIN (SAR)**

Če spojina ni topna v DMSO, se netopnost v celičnem gojišču s celicami še bolj izrazi, saj so spojine precej lipofilne in bi se v univerzalnem topilu DMSO morale precej bolje topiti kot v celičnem gojišču bolj polarnega značaja. Pri spojini **093**, ki smo jo izločili, struktura sovpada z netopnostjo, saj gre za triciklični heteroaromatski obroč – substituiran akridin.

Za najbolj citotoksične so se izkazale spojine **375**, **258** ter **712**, saj že v nizkih koncentracijah negativno vplivajo na razrast celic. Zaradi kompleksnosti pojma citotoksičnosti in na podlagi struktur omenjenih spojin je težko določiti odnos med strukturo in toksičnostjo omenjenih treh spojin.

Strukture spojin so pridobljene s pomočjo virtualnega reševanja na osnovi agonista imikvimoda, zato je zanje značilno, da so si glede na 3D strukturo podobne, ter da pri njih najdemo določene skupne strukturne elemente.

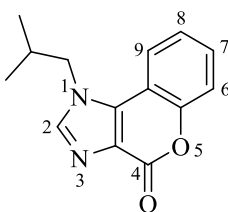
Imikvimod ima 3 akceptorje in 1 donor vodikove vezi. Strukturno gre za precej nepolarno planarno molekulo, pozitivno nabito v fizioloških pogojih (slika 27). (46) Nesubstituirana aminska skupina na mestu 4 naj bi bila nujna za vzbuditev tvorbe IFN. Imikvimod se *in vivo* presnavlja v 1-(2-hidroksi-2-metilpropil)-ni derivat. (47) Iz literature smo pridobili podatek, da je  $\text{EC}_{50}$  imikvimoda 2,12  $\mu\text{M}$ . (48) V naših testih smo pridobili nekoliko višje vrednosti, torej obstaja precejšnja verjetnost, da so vrednosti  $\text{EC}_{50}$  za naše spojine v realnosti še nižje.



**Slika 27: Strukturna formula IMIKVIMODA. (46)**

Pri obravnavi rezultatov je potrebno biti nekoliko pazljiv, saj se že  $EC_{50}$  vrednost imikvimoda nekoliko razlikuje med našimi podatki in podatki v literaturi. Rezultati vzporednih poskusov se tudi razlikujejo, in sipanje, ki ga nakazuje od vrednosti 1 precej različen  $R^2$ , je ponekod precejšnje.

Če pogledamo strukture spojin, ki so se izkazale kot agonisti, vidimo, da so si spojine **6**, **8** in **9** zelo podobne.



**Slika 28: Struktura spojine 9 z oštevilčenimi mesti kot osnova za razvoj derivatov 6 in 8.**

Spojini **6** in **8** bazirata na strukturi spojine **9**, le da imata pripet dodaten substituent. Spojina **9** se od imikvimoda razlikuje le v sredinskem obroču, kjer je  $-N-C-NH_2$  skupina nadomeščena z estersko skupino ravno tako sposobne tvorbe vodikove vezi, vendar je jakost delovanja spojine **9** zaradi te spremembe slabša od imikvimoda glede na izračunani  $EC_{50}$ . Določene substitucije ugodno vplivajo na jakost agonista in s tem doseganje učinkov že pri nizkih koncentracijah. Hidroksi skupina na mestu 8 (spojina **6**) je še bolj ugodna kot dietilamino skupina na mestu 7 (spojina **8**) obročnega sistema izobutilkromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-ona. Menimo, da je večja jakost delovanja spojine **6** posledica sposobnosti OH skupine, da tvori vodikove vezi in je glede na teste torej primerljiva z imikvimodom. Tudi aktivnosti spojine **8** ne gre zanemariti. Pri slednji je možno, da se z alkilnimi skupinami substituirana aminska skupina veže v kakšen lipofilni žep receptorja. Spojini **934** in **244** sta sicer zelo podobni derivatom **9** in imikvimodu, vendar izgleda, da triazolni obroč namesto diazalnega neugodno vpliva na aktivnost. Presenetilo nas je dejstvo, da se je spojina **9** izkazala kot rahel agonist in ne kot antagonist z  $EC_{50} = 23 \mu M$ , kakor je opredeljena v literaturi. (13) Za vezavo na receptor je potrebna določena struktura, izjemno majhne razlike v strukturi pa vplivajo na to, ali bo molekula aktivirala receptor in tako delovala agonistično ali pa bo antagonist, ki se bo le vezal na receptor in

preprečeval aktivacijo. Že regioizomeri določene spojine imajo lahko nasprotno delovanje. (24) Zastavimo si vprašanje, ali je sinteza omenjene spojine **9** mogoče vodila do drugega regioizomera, ali pa so bile prisotne kakšne nečistote z vplivom na rezultat. Prav tako pa se nam izriše problem, kako težko je določiti SAR ter splošno strukturo agonistov in antagonistov. Spojini **712** in **421** sta si med seboj precej podobni, saj gre pri obeh za biciklični heteroaromatski sistem s CF<sub>3</sub> substituentom, ki je akceptor vodikove vezi in precej prispeva k lipofilnosti spojin. Za spojino **712** je značilen kinolinski skelet, za spojino **421** pa kinazolinski skelet. Po jakosti sta primerljivi z imikvimodom. Od spojin **6**, **8**, **9** in imikvimoda se sicer precej razlikujeta, a najdemo tudi določene podobnosti. Vsem agonistično delujočim spojinam je skupen izobutilni fragment, vezan na dušikov atom (v enaki razdalji od elektronakceptorske skupine), izjema je le spojina **421**, pri kateri je omenjeni dušikov atom del 3-metilpiperidinskega obroča. Pri spojinah **6**, **8**, **9** in pri imikvimodu je omenjeni dušikov atom del imidazolnega dela heteroaromatskega večcikličnega sistema, pri **712** in **421** pa je omenjeni dušik vezan na prav tako dušik vsebujoči obroč bicikličnega heteroaromatskega sistema. Spojinama **712** in **421** je podobna spojina **258**, vendar izgleda, da vezava Cl na mesto 7 ter odstranitev CF<sub>3</sub> skupine vodi do neaktivnosti. Na splošno so spojine, ki so se izkazale kot agonisti, bolj lipofilne kot antagonist.

Pri virtualnem rešetanju spojin na osnovi liganda lahko na podlagi strukture spojine, ki je agonist, pridemo do struktur antagonistov. Spojini **335** in **355** sta si strukturno precej različni, kljub temu da obe izkazujeta antagonistično delovanje, zato bi težko zaključili o SAR-u antagonistov. Spojina **335** je strukturno zelo podobna spojini **712**, ki se je izkazala kot močan agonist. Sklepamo lahko, da OH skupina, ki je vezana namesto CF<sub>3</sub> skupine, vodi k antagonizmu. Poleg tega je namesto izobutilne skupine na dušikov atom zdaj vezana izopropilna skupina. Spojina se zaradi ustrezne strukture še vedno veže v receptorsko mesto, ni pa sposobna aktivirati receptorja. Antagonistično delujoča spojina **355** pa je strukturno od preostalih spojin vključno z imikvimodom precej različna. Benzensulfonamidni del strukture je poleg spojine **355** značilen za še veliko drugih obravnavanih spojin, ki se niso izkazale kot agonisti ali antagonist. Kot kaže je pri omenjeni strukturi za antagonistično delovanje nujna dikloro substitucija na mestu 2 in 5 benzenskega obroča. Predvidevam, da Cl (manjši je od broma in večji od fluora) nudi ustrezno lipofilnost in elektronegativnost. Spojini **335** in **355** smo testirali v testih antagonizma v precej višjih koncentracijah kot večino preostalih spojin, zaradi majhne



citotoksičnosti in precejšnje topnosti. Pravo antagonistično delovanje bi lahko potrdili šele testi za določanje EC<sub>50</sub> antagonizma.

Glede na rezultate naših testov so precej uspešna skupina derivati spojine **9**. Spojini 1-izobutil-4-okso-1,4-dihidrokromeno[3,4-*d*]imidazol-7-il acetat (**4**) in 7,8-dihidroksi-1-izobutilkromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-on imata strukturno gledano velik potencial, zato bi bilo smiselno ponoviti sintezo. OH skupina je namreč sposobna oddajanja in sprejemanja vodikove vezi ter je najverjetneje zelo pomembna za aktivnost spojine. Bazično dietilaminsko skupino pri spojini **8** bi mogoče lahko preizkusili še na mestu 8, prav tako bi lahko namesto tega preizkusili še dimetilaminski substituent. Vredno bi bilo razmisliti tudi o možnosti manjših modifikacij struktur spojin **712** in **335**. Spojini **335** bi lahko odstranili OH skupino, vezano na mesto 2, lahko pa bi izopropilaminometilni ostanek nadomestili z izobutilaminskim ostankom in tako zmanjšali razdaljo med dušikoma. To bi nam dalo jasnejši vpogled v to, kaj vodi od agonizma k antagonizmu med spojinama **712** in **335**. Enako bi lahko preizkusili spojine, podobne **712** z dodanim Cl oz. odvzeto CF<sub>3</sub> skupino, in preučili, kaj vodi od agonizma do neaktivnosti.

## 6. SKLEP

V prvem delu magistrske naloge smo izvedli tri dvostopenjske reakcije, da bi pridobili nove potencialne ligande TLR7 s strukturo policikličnega sistema kromeno(3,4-*d*)imidazol-4(1*H*)-ona, ki so bili zadetki virtualnega rešetanja na osnovi liganda imikvimoda, znanega agonista TLR7. Pri reakciji, ki je izhajala iz 2,5-dihidroksibenzaldehida, smo po prvi stopnji dobili precej čist produkt, vendar produkta druge stopnje in modificiranega produkta nismo uspeli dokazati in izolirati. Reakcija, ki je izhajala iz 2,4,5-trihidroksibenzaldehida, ni potekla. Sklepamo, da bi bilo potrebno zaščititi hidroksilne skupine. Pri sintezi, kjer smo izhajali iz 2,5-dihidroksibenzaldehida, smo končni produkt presenetljivo pridobili že po prvi stopnji in sicer novo spojino 8-hidroksi-1-izobutilkromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-on (spojina **6**). Izolirali smo zelo čisto spojino, vendar reakcija ni potekla z visokim izkoristkom, ki je glede na podatke v literaturi značilen za prvo multikomponentno stopnjo reakcije.

Agonistično aktivnost spojine **6** na TLR7 smo dokazali z biološkimi testiranjmi. *In vitro* smo testirali še 24 drugih potencialnih agonistov oz. antagonistov, prav tako načrtovanih z virtualnim rešetanjem na osnovi imikvimoda. Iz obravnave smo izključili netopno spojino **093**. Ostale spojine smo v koncentracijah, odvisnih od njihove topnosti in citotoksičnosti, izpostavili preliminarnim testom agonizma in antagonizma. Na spojinah, ki so izrazile agonistično ali antagonistično delovanje, smo izvedli teste za izračun EC<sub>50</sub>. Agonistično delovanje so poleg spojine **6** izkazale še 4 spojine z oznakami **712**, **421**, **8** in **9**.

Antagonistično delovanje sta izkazovali spojini z oznakama **335** in **355**. Težave pri izračunu njunih EC<sub>50</sub> so posledica DMSO, ki lažno pozitivno vpliva na rezultate testov antagonizma.

Razlike v strukturi med agonisti in antagonisti ter spojinami, ki niso izkazale nobenega delovanja, so sicer precej nečitne in težko je napovedati SAR. Glede na obravnavane spojine in rezultate testiranj lahko omenimo, da so agonisti bolj lipofilni od antagonistov. Prav tako menimo, da bi bilo smiselno še enkrat preizkusiti sinteze hidroksiliranih derivatov spojine **9**, ki jih nismo uspeli sintetizirati, saj se nam glede na strukturo zdijo precej obetavni ligandi TLR7.

## 7. LITERATURA

1. Rang H. P., Dale M. M., Ritter J. M., Flower R. J. and Henderson G.: Rang and Dale's Pharmacology, sedma izdaja, Elsevier Churchill Livingstone, London, 2011: 77–88, 318–35.
2. Dale M. M. and Haylett D. G.: Pharmacology condensed, druga izdaja, Elsevier Churchill Livingstone, London, 2009: 42–45, 62, 106.
3. Abbas A. K., Lichtman A. H. and Pillai S.: Cellular and Molecular Immunology, šesta izdaja, Saunders Elsevier, Philadelphia 2007: 34–6.
4. Abbas A. K. and Lichtman A. H.: Basic Immunology: Functions and disorders of the immune system, druga izdaja, Elsevier, Philadelphia, 2006–2007: 3.
5. Male D., Brostoff J., Roth B. D. and Roitt I.: Immunology, sedma izdaja, Elsevier Mosby, Philadelphia, 2006: 128, 143, 192–93, 259–60, 281.
6. [https://resources.rndsystems.com/images/site/MP\\_PatternRecog\\_2JUL\\_1549.pdf](https://resources.rndsystems.com/images/site/MP_PatternRecog_2JUL_1549.pdf)  
[Navedeno: 9. 1. 2016]. [Elektronski]
7. Hennessy E. J., Parker A. E. and O'Neill L. A. J: Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? Nature Reviews Drug Discovery 2010; 9: 293–307.
8. Janeway C. A. and Medzhitov R.: Innate Immune Recognition. Annual Review of Immunology 2002; 20: 197–216.
9. Wang X., Smith C. and Yin H.: Targeting Toll-like receptors with small molecule agents. The Royal Society of Chemistry 2013; 42: 4859–66.
10. McCoy C. E.: Toll-Like Receptors Practice and Methods, druga izdaja, Humana Press, New York, 2016.

11. Kindt J. T., Goldsby R. A., Osborne B. A.: Immunology, šesta izdaja, Freeman and Company, New York, 2007: 63.
12. Keogh B., Parker A. E.: Toll-like receptors as targets for immune disorders. Trends in Pharmacological Sciences 2011; 32: 435–42.
13. Švajger U., Horvat Ž., Knez D., Rožman P., Turk S. and Gobec S.: New antagonists of Toll-like receptor 7 discovered through 3D ligand-based virtual screening. Medicinal Chemistry Research 2015; 24: 362–71.
14. Savva A. and Roger T.: Targeting Toll-like receptors: promising therapeutic strategies for the management of sepsis-associated pathology and infectious disease. Frontiers in Immunology 2013; 4: article 387.
15. Diebold S. S.: Recognition of viral single-stranded RNA by Toll-like receptors. Science Direct 2008; 60: 813–23.
16. Janeway C. A., Travers P. and Walport M.: Immunobiology, peta izdaja, Receptors of the innate immune system. Garland Science, New York, 2001.
17. Akira S. and Hemmi H.: Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. Immunology letters 2003; 85: 85–95.
18. Krishnan J., Lee G. and Choi S.: Drugs Targeting Toll-like Receptors. Archives of Pharmacal Research 2009; 32: 1485–520.
19. Barrat F. J., Meeker T., Gregorio J., Chain J. H., Uematsu S., Akira S., Chang B., Duramad O. and Coffman R. L.: Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. The Journal of Experimental Medicine 2005; 202: 1131–39.

20. Lund J. M., Alexopoulou L., Sato A., Karow M., Adams N. C., Gale N. W., Iwasaki A. and Flavell R. A.: Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004; 101: 5508–5603.
21. Smits E. L. J. M., Ponsaerts P., Berneman Z. N. and Tendeloo V. F.: The Use of TLR 7 and TLR 8 Ligands for the Enhancement of Cancer Immunotherapy. *The Oncologist* 2008; 13: 859–75.
22.  
[https://www.google.si/search?q=ribonucleotides&espv=2&biw=1242&bih=585&source=lms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjZuuLxpK\\_LAhWdGw8KHak-DZkQ\\_AUIBigB&dpr=1.1#imgsrc=\\_KpOppPQUI5wUM%3A](https://www.google.si/search?q=ribonucleotides&espv=2&biw=1242&bih=585&source=lms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjZuuLxpK_LAhWdGw8KHak-DZkQ_AUIBigB&dpr=1.1#imgsrc=_KpOppPQUI5wUM%3A)  
[Navedeno 7.3.2015]. [Elektronski]
23. Lau C., Broughton C., Tabor A., Akira S., Flavell R. A., Mamula M. J., Christensen S. R., Shlomchik M. J., Viglianti G. A., Rifkin I. R. and Marshak – Rothstein A.: RNA-associated autoantigens activate B cells, by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *The Journal of Experimental Medicine* 2005; 202, 1171–77.
24. Shukla N. M., Kimbrell M. R., Malladi S. S. and David S. A.: Regioisomerism-dependent TLR agonism and antagonism in an imidazoquinoline. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2009; 19: 2211–14.
25. Sacre K., Criswell L. A. and McCune J. M.: 1 Hydroxychloroquine is associated with impaired interferon-alpha and tumor necrosis factor-alpha production by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research and Therapy* 2012; 14.
26. Drake M. G., Scott G. D., Proskocil B. J., Fryer A. D., Jacoby D. B. and Kaufman E. H.: Toll-like Receptor 7 Rapidly Relaxes Human Airways. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2013; 188: 664–72.
27. Xirakia C., Koltsida O., Stavropoulos A., Thanassopoulou A. and Aidinis V.: Toll-like Receptor 7 – triggered Immune Response in the Lung Mediates Acute and Long-Lasting

Suppression of Experimental Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2010; 181: 1207–16.

28. Thompson M. R., Kaminski J. J., Kurt-Jones E. A. and Fitzgerald K. A.: Pattern Recognition Receptors and the Innate Immune Response to Viral Infection. *Viruses* 2011; 3: 920–940.

29. Merrill J. T., Buyon J. P. and Utset T.: A 2014 update on the management of patients with systemic lupus erythematosus. *Seminars in arthritis in rheumatism* 2014, 44: e1-e2.

30. Shein N., Fu Q., Deng Y., Qian X., Zhao J., Kaufman K. M., Wu Y. L., Yu C. Y., Tang Y., Chen J., Yang W., Wong M., Kawasaki A., Tsuchiya N., Sumida T., Kawaguchi Y., Howe H. S., Mok M. Y., Bang S., Liu F., Chang D., Takasaki Y., Hashimoto H., Harley J. B., Guthridge J. M., Grossman J. M., Cantor R. M., Song Y. W., Bae S., Chen S., Hahn B., Lau Y. and Tsao B.: Sex specific association of X-linked Toll-like receptor 7 (TLR7) with male systemic lupus erythematosus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010; 107: 15838–43.

31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3198539/> [Navedeno: 16. 1. 2016]. [Elektronski]

32. Meng T., Zou Y., Khorev O., Jin Y., Zhou H., Zhang Y., Hu D., Ma L., Wang X. and Shen J.: Simple and Efficient Copper(I)-Catalyzed Access to Three Versatile Aminocoumarin-Based Scaffolds using Isocyanacetate. *Advanced synthesis and catalysis* 2011; 353: 918–924.

33. Lešnik S., Štular T., Brus B., Knez D., Gobec S., Janežič D. and Konc J.: LiSiCA: A Software for Ligand-Based Virtual Screening and Its Application for the Discovery of Butyrylcholinesterase Inhibitors. *Journal of Chemical Information and Modeling* 2015; 5: 1521–28.

34. Tran S., Puhar A., Ngo-Camus M. and Romarao N.: Trypan blue Dye Enters Viable Cells Incubated with the Pore-Forming Toxin HlyII of *Bacillus cereus*. *PLoS One* 2011; 6: 1–5.
35. <http://bitesizebio.com/13687/cell-counting-with-a-hemocytometer-easy-as-1-2-3/> [Navedeno: 23. 2. 2016]. [Elektronski]
36. [https://www.google.si/search?q=TRYpan+blue&sa=X&espv=2&biw=1600&bih=771&tbm=isch&imgil=Dqxn57g06g86cM%253A%253B3ZqaFO3G\\_vxVtM%253Bhttps%25253A%25252F%25252Fen.wikipedia.org%25252Fwiki%25252FTrypan\\_blue&source=iu&pf=m&fir=Dqxn57g06g86cM%253A%252C3ZqaFO](https://www.google.si/search?q=TRYpan+blue&sa=X&espv=2&biw=1600&bih=771&tbm=isch&imgil=Dqxn57g06g86cM%253A%253B3ZqaFO3G_vxVtM%253Bhttps%25253A%25252F%25252Fen.wikipedia.org%25252Fwiki%25252FTrypan_blue&source=iu&pf=m&fir=Dqxn57g06g86cM%253A%252C3ZqaFO). [Navedeno: 25.12.2015]. [Elektronski]
37. <http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI%3A78897> [Navedeno: 28. 12. 2015]. [Elektronski]
38. Dunigan D. D., Waters S. B. and Owen T. C.: Aqueous Soluble Tetrazolium/Formazan MTS as an Indicator of NADH- and NADPH- Dependent Dehydrogenase Activity. *BioTechniques* 1995; 19: 640–49.
39. [http://www.amsbio.com/brochures/mts\\_cell\\_viability\\_assay\\_of\\_upcyte\\_hepatocyte\\_cultures\\_grown\\_on\\_alvetex\\_3d\\_scaffold.pdf](http://www.amsbio.com/brochures/mts_cell_viability_assay_of_upcyte_hepatocyte_cultures_grown_on_alvetex_3d_scaffold.pdf) [Navedeno: 5.3.2016]. [Elektronski]
40. <https://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/0/celltiter%2096%20aqueous%20one%20solution%20cell%20proliferation%20assay%20system%20protocol.pdf> [Navedeno: 30. 8. 2015]. [Elektronski]
41. <http://www.bowdish.ca/lab/wp-content/uploads/2014/11/SEAP-NFkB-Reporter-System.pdf> [Navedeno 5.3.2016]. [Elektronski]
42. <http://www.invivogen.com/hek-blue-htlr7> [Navedeno: 5.3.2016]. [Elektronski]

43. [http://www.invivogen.com/PDF/QUANTI\\_Blue\\_TDS.pdf](http://www.invivogen.com/PDF/QUANTI_Blue_TDS.pdf). [Navedeno:25.12.2015] .  
[Elektronski]

44.

<https://www.google.si/search?q=quanti+blue&sa=X&biw=1600&bih=728&espv=2&tbm=isch&tbo=u&source=univ&ved=0ahUKEwi7pNKT3PfJAhVFZCwKHRn3AdUQsAQILQ#imgrc=3eiN3UIXs9Crsm%3A> [Navedeno: 25. 12. 2015]. [Elektronski]

45. Gregorič M.: Vrednotenje sinteznega postopka ter sinteza derivatov gvanidina in kromeno[3, 4-D]imidazol-4(1H)-ona kot potencialnih ligandov na toll-u podobnem receptorju 4 in 7. Diplomsko delo, Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani, 2016.

46. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/imiquimod#section=Top> [Navedeno: 7.3.2016]. [Elektronski]

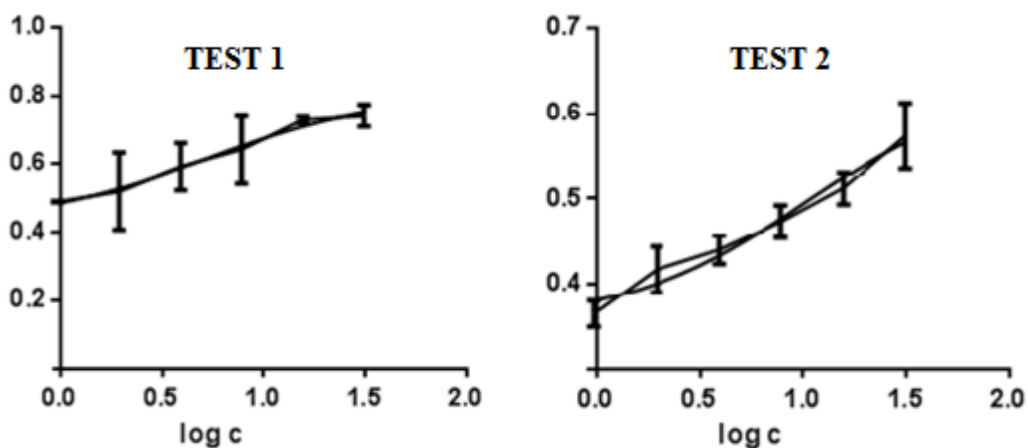
47. Gerster J. F., Lindstrom K. J., Miller R. L., Tomai M. A., Birmachu W., Bomersine S. N., Gibson S. J., Imbertson L. M., Jacobson J. R., Knafla T. R., Maye P. V., Nikolaides N., Oneyemi F. Y., Parkhurst G. J., Pecore E. S., Reiter M. J., Scribner L. S., Testerman T. L., Thompson N. J., Wagner T. L., Weeks C. E., Andre J., Lagain D., Bastard Y. and Lupu M.: Synthesis and Structure-Activity-Relationships of 1H-Imidazo[4,5-c]quinolines: *Journal of Medicinal Chemistry*, 2005; 48, 3481–91.

48. Shukla N. M., Malladi S. S., Mutz C. A., Balakrishna R., David S. A.: Structure-Activity Relationships in Human Toll-like Receptor 7-Active Imidazoquinoline Analogues. *Journal of Medical Chemistry* 2010; 53: 4450–65.

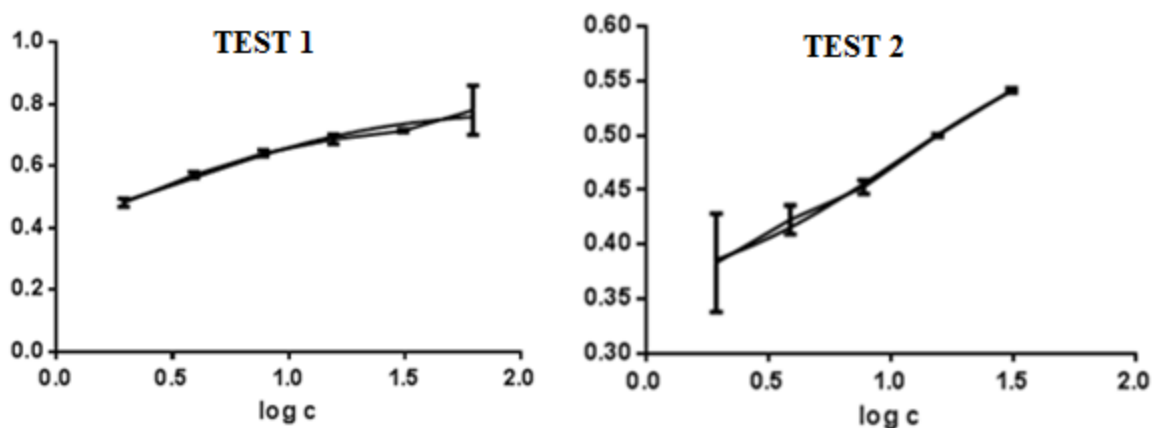


# PRILOGE

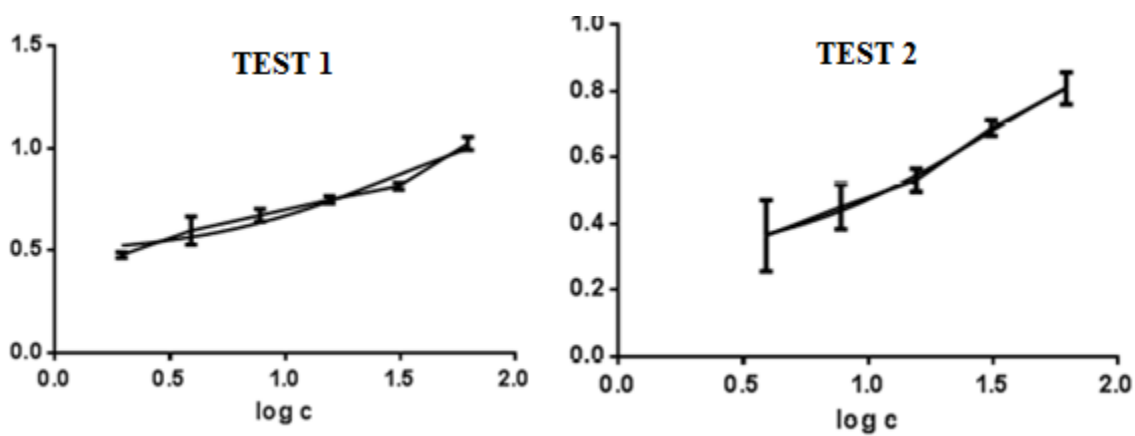
Priloga 1: Grafi krivulj določanja EC<sub>50</sub> spojin.



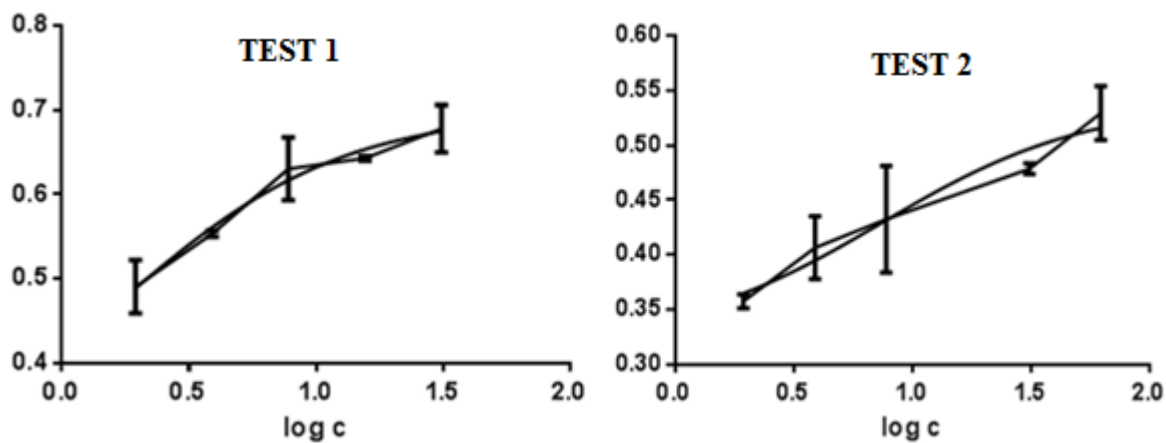
Grafa odzivov v odvisnosti od logaritma koncentracije spojine 712.



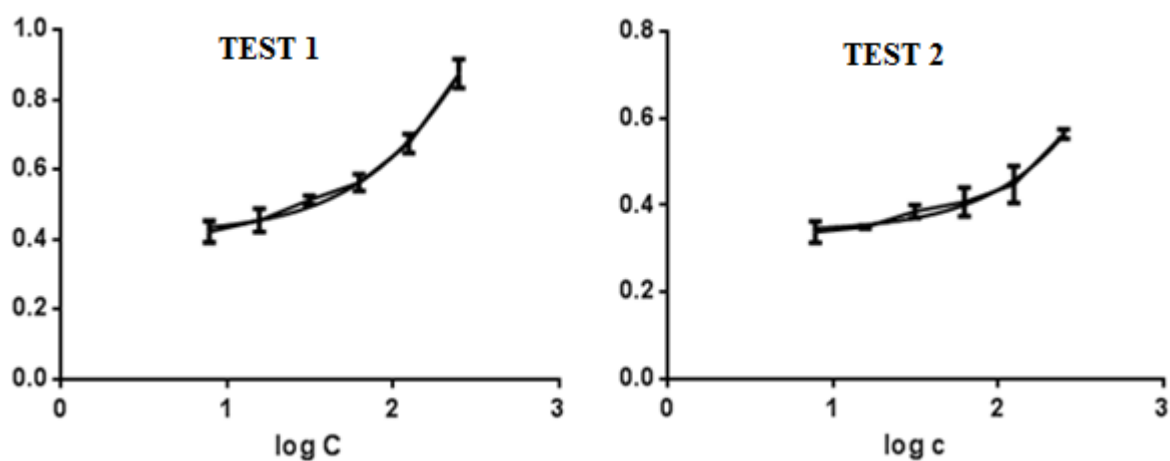
Grafa odzivov v odvisnosti od logaritma koncentracije spojine 421.



Grafa odzivov v odvisnosti od logaritma koncentracije spojine 8.



Grafa odzivov v odvisnosti od logaritma koncentracije spojine 6.



Grafa odzivov v odvisnosti od logaritma koncentracije spojine 9.