

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETRA ZGAGA

SINTEZA HIDROKSIETILAMINSKIH IN GVANIDINSKIH ANTAGONISTOV
TOLL-U PODOBNEGA RECEPTORJA 4

SYNTHESIS OF HYDROXYETHYLAMINE AND GUANIDINE TOLL-LIKE
RECEPTOR 4 ANTAGONISTS

Ljubljana, 2013

Magistrsko naložko sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sovre, mag. farmacije.

Spektroskopske meritve, kromatografske tehnike in določanje tališča smo izvedli na Fakulteti za farmacijo in na Inštitutu Jožef Stefan (Center za masno spektroskopijo). Biološka testiranja so opravili na Zavodu za transfuzijsko medicino v Ljubljani.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sovre, mag. farmacije.

Zahvala

Za vse strokovne nasvete in pomoč pri delu se iskreno zahvaljujem mentorju doc. dr. Mateju Sovi, mag. farmacije.

Prav tako se zahvaljujem svojim najbližnjim, ki so mi stali ob strani ves čas študija.

Vsebina

Zahvala.....	4
Vsebina	5
Slikovno kazalo	7
Povzetek.....	8
Ključne besede	8
Abstract.....	9
Key words	9
Seznam okrajšav	10
1. Uvod.....	12
1. 1. Sepsa in septični šok	12
1. 2. Imunski odziv.....	14
1. 3. Tollu podobni receptorji.....	16
1. 4. Prenos signalov preko TLR4.....	17
1. 5. Klinični pomen manipulacije sistema TLR4.....	19
1. 6. Terapevtske tarče v sistemu LPS/TLR4.....	20
2. Načrt za delo in delovne hipoteze	25
3. Materiali in metode.....	26
3. 1. Materiali	26
3. 2. Metode.....	26
4. Eksperimentalno delo	29
Sinteza spojine 1 [1-(3-klorobenzil)-3,5-dimetil-1H-pirazol].....	30
Sinteza spojine 2 [1-(1-(3-klorobenzil)-3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)-N-metilmelan amin].....	31
Sinteza spojine 3 [1-(((1-(3-klorobenzil)-3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)metil)(metil) amino)-3-(4-etoksifenoksi)propan-2-ol].....	32

Sinteza spojine 4 [2-aminopirimidin-5-karbaldehid].....	34
Sinteza spojine 5 [(2-aminopirimidin-5-il)(2,4,5-trifluorofenil)metanol].....	35
Sinteza spojine 6 [5-bromopirimidin-2-amin].....	36
Sinteza spojine 7 [7-metoksi-4-okso-4H-kromen-3-karbaldehid].....	37
Sinteza spojina 8 [6,7-dimetoksi-4-okso-4H-kromen-3-karbaldehid].....	38
Sinteza spojine 9 [6-hidroksi-4-okso-4H-kromen-3-karbaldehid].....	39
Sinteza spojine 10 [6-kloro-4-okso-4H-kromen-3-karbaldehid].....	40
Sinteza spojine 11 [N-(5-(5-kloro-2-hidroksibenzoil)pirimidin-2-il)cianamid]	41
Sinteza spojine 12 [1-(5-(5-kloro-2-hidroksibenzoil)pirimidin-2-il)-2-(4-fluorofenil)gvanidin]	42
Sinteza spojine 13 [1-(5-(5-kloro-2-hidroksibenzoil)pirimidin-2-il)-2-(4-(dimetilamino)fenil)gvanidin]	43
Sinteza spojine 14 [6-fluoro-4-okso-4H-kromen-3-karbaldehid]	44
Sinteza spojine 12 [N-(5-(5-fluoro-2-hidroksibenzoil)pirimidin-2-il)cianamid]	45
Sinteza spojine 16 [1-(5-(5-fluoro-2-hidroksibenzoil)pirimidin-2-il)-2-(2-metoksietil)gvanidin]	46
Sinteza spojine 17 [2-((amino((5-(5-fluoro-2-hidroksibenzoil)pirimidin-2-il)amino)metilen)amino)-2-fenilocetna kislina]	48
5. Rezultati in razprava	49
5. 1. Komentar strukturnih sprememb izbranih analogov spojine α	49
5. 2. Komentar sinteznih postopkov	51
5. 3. Rezultati <i>in vitro</i> testiranja in testiranja na celičnih kulturah	55
Sklep	58
Literatura.....	59

Slikovno kazalo

Slika 1: Zgradba celične stene Gram negativnih bakterij [povzeto po (3)].....	12
Slika 2: Sproščanje DAMP in PAMP med patološkimi stanji [povzeto po (3)]	14
Slika 3: Struktura Tollu podobnega receptorja [povzeto po (8)].....	16
Slika 4: Prikaz zaporedja reakcij, ki vodijo do vezave LPS na TLR4 [povzeto po (15)]....	17
Slika 5: Lipid A (biološko aktivna podenota LPS) [povzeto po (19)]......	21
Slika 6: Struktura naravnega in sinteznega antagonista TLR4 (21)	22
Slika 7: Struktura spojine TAK-242 (resatorvid) [povzeto po (22)]	23
Slika 8: Struktura učinkovine paklitaksel (23)	23
Slika 9: Struktura antagonistov TLR4 z β -aminoalkoholnim skeletom [povzeto po (15)] .	24
Slika 10: Struktura molekule, odkrite z virtualnim rešetanjem [povzeto po (24)]	24
Slika 11: Spojina 3.....	25
Slika 12: Struktura spojine α [povzeto po (24)]	25
Slika 13: Prikaz strukturnih modifikacij na benzoilnem obroču	49
Slika 14: Prikaz strukturnih modifikacij na gvanidinskem delu molekule.....	50
Slika 15: Shema reakcije z Grignardovimi reagenti	51
Slika 16: Mehanizem reakcije z Grignardovimi reagenti [povzeto po (25)]	52
Slika 17: Možna shema sinteze analogov spojine α	52
Slika 18: Mehanizem Vilsmeier-Haackove reakcije [povzeto po (26)]	53
Slika 19: 3-formilkromona z dinukleofilom [povzeto po (28)]	54
Slika 20: Mehanizem tretje stopnje reakcije [povzeto po (30)]......	54
Slika 21: Prikaz citotoksičnosti spojin 13 in 16 glede na DMSO	55
Slika 22: Prikaz citotoksičnosti spojine 12 glede na DMSO.....	56
Slika 23: Graf prikazuje odvisnost absorbance od logaritma koncentracije spojine 12 [A=f(log(c))]	57

Povzetek

Sepsa ostaja eden od poglavitnih vzrokov smrti na oddelkih intenzivne nege. Pri tem stanju ne gre za pretiran imunski odgovor gostiteljskega organizma, kot je veljalo nekdaj, pač pa gre za porušeno ravnovesje med provnetnimi in protivnetnimi reakcijami. Kako do tega porušenja pride, še ni popolnoma razjasnjeno.

Na tržišču ni nobenega zdravila, ki bi bilo namenjeno zdravljenju tega stanja, pač pa si pri zdravljenju pomagajo predvsem s širokospektralnimi antibiotiki in vazokonstriktornimi zdravili. Tovrstno zdravljenje žal ne prinaša želenega uspeha, saj je smrtnost pri tej bolezni še vedno skoraj 50%. Z odkritjem Toll-u podobnih receptorjev (TLR) in njihovih signalnih poti, ki vodijo v sproščanje vnetnih mediatorjev, so se odprle nove možnosti za zdravljenje sepse.

V magistrski nalogi smo ponovili sintezo učinkovine s hidroksietilaminskim skeletom, za katero je bilo objavljeno antagonistično delovanje na TLR4. Sintetizirali smo tudi analoge spojine, ki je bila odkrita s pomočjo virtualnega rešetanja in je izkazovala antagonistične lastnosti na TLR4. Preizkusili smo več sinteznih pristopov; najboljše rezultate smo dobili pri tristopenjski sintezi, v kateri smo najprej sintetizirali ustrezen 3-formilkromon, nato smo v reakciji s cianogvanidinom tvorili pirimidinski obroč z vezano cianamidno skupino, v zadnji stopnji pa smo izvedli nukleofilno adicijo na ciano skupino – in tako dobili gvanidinski fragment.

Sintetiziranim spojinam smo preverili topnost v celičnem mediju in citotoksičnost na celični liniji HEK 293, nato pa smo jim izmerili antagonistično delovanje na TLR4.

Ključne besede

Toll-u podobni receptorji; TLR4 antagonisti; sepsa; β -aminoalkohol

Abstract

Sepsis remains one of the major causes of death in intensive care units. The problem with this condition is not uncontrolled hyper-inflammatory host response as was once thought, but the problem actually lies in the imbalance between pro-inflammatory reactions and anti-inflammatory reactions. The mechanisms underlying this imbalance are not entirely understood.

There are no medicines used specifically for sepsis treatment so the doctors use broad-spectrum antibiotics and vasopressors. This kind of treatment is unfortunately not very successful and mortality with sepsis stays as high as 50 %. Discovery of Toll-like receptors (TLR) and their signaling pathways opened new possibilities for sepsis treatment.

In this thesis we repeated the synthesis of a published compound with hydroxyethylamine moiety already known for its antagonistic properties towards TLR4. We also synthesized analogues of a compound found by virtual screening that showed antagonistic properties towards TLR4. We examined a few different synthetic approaches and the best was proven to be three-step reaction mechanism. In the first step we synthesized adequate 3-formylchromone which in the second step reacted with cyanoguanidine to form pyrimidine ring with attached cyanamide group. The last reaction was a nucleophilic addition of an amine to a cyano group which yielded the desired guanidine fragment.

We tested solubility of our compounds in cell medium and their citotoxicity towards cell line HEK 293. Afterwards we measured their antagonistic activity against TLR4.

Key words

Toll-like receptors; TLR4 antagonists; sepsis; β -aminoalcohol

Seznam okrajšav

Okrajšava	Pomen
Asp	aspartat
BTC	bis(triklorometil)karbonat, trifosgen
CDCl₃	devteriran kloroform
CD14	diferenciacijski faktor 14 (<i>cluster of differentiation 14</i>)
CpG	citozin-fosfat-gvanin; zaporedje v DNA
Cys	cistein
DAMP	z nevarnostjo povezani molekulski vzorci (<i>danger associated molecular patterns</i>)
DMF	dimetilformamid
DKM	diklorometan
DMSO-d₆	devterirani dimetilsulfoksid
FeCl₃	železov (III) klorid
HEK 293	celična linija človeških zarodnih jetrnih celic (<i>human embryonic kidney cells 293</i>)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IC₅₀	koncentracija učinkovine, ki povzroči polovično inhibicijo
IFN β	interferon beta
IL	interlevkin
IRF3	interferon-regulatorni faktor 3
KOH	kalijev hidroksid
LBP	protein, ki veže lipopolisaharide (<i>LPS binding protein</i>)
LPS	lipopolisaharid
mCD14	netopna oblika CD14 (<i>membrane-bound CD14</i>)
MD-2	MD-2 ali limfocitni antigen 96
MF	mobilna faza
MTS	tetrazolijev barvilo; za določevanje viabilnosti celic
NBS	<i>N</i> -bromosukcinimid
NLR	NOD-podobni receptorji (<i>NOD-like receptors</i>)

NMR	jedrna magnetna resonanca (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
PAF	faktor, ki aktivira trombocite (<i>platelet activating factor</i>)
PAMP	molekulski vzorci, povezani s patogenom (<i>pathogen associated molecular patterns</i>)
PBS	fosfatni pufer (<i>phosphate buffer saline</i>)
ppm	število delcev na milijon (<i>parts per million</i>)
PRR	receptorji, ki prepoznavajo molekulske vzorce (PAMP ali DAMP)
Rf	retencijski faktor
RLR	RIG-I podobni receptorji (<i>RIG-I like receptors</i>)
sCD14	topna oblika CD14 (<i>soluble CD14</i>)
Ser	serin
TAK-242	resatorvid
TFA	trifluoroacetna kislina (<i>trifluoroacetic acid</i>)
THF	tetrahidrofuran
TIR	Toll/IL-1 receptor
TLC	tankoplastna kromatografija (<i>thin layer chromatography</i>)
TLR	Toll-u podobni receptor (<i>Toll like receptor</i>)
TMS	tetrametilsilan
TMSCl	tetrametilsilik klorid
TNF α	faktor tumorske nekroze alfa
t_R	retencijski čas [min]

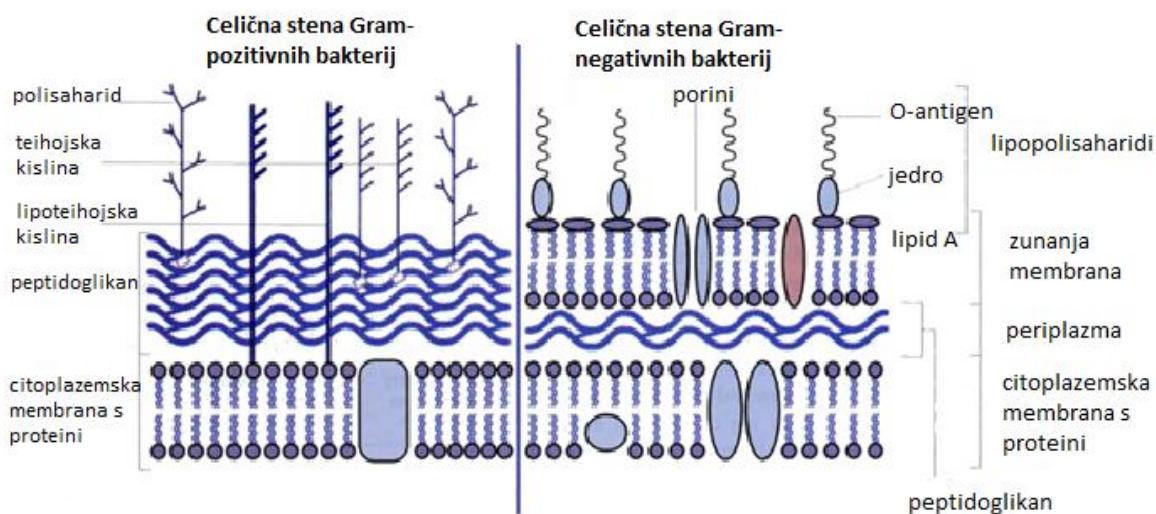
1. Uvod

1. 1. Sepsa in septični šok

Pojem sepsa označuje kompleksen klinični sindrom, ki je posledica škodljivega odziva organizma na neko okužbo. Sepsa se razvije, ko pride do odpovedi regulacije sprva zadostnega in primernega imunskega odziva – gre za neravnovesje med provnetnimi in protivnetnimi reakcijami. Prve so pomembne za uničevanje patogenih organizmov, a so hkrati vzrok za poškodbe okoljnega tkiva, protivnetne reakcije pa zagotavljajo omejitev prekomernega vnetja in s tem ščitijo okoljne tkivo, a gostiteljski organizem podvržejo sekundarnim okužbam (1, 2).

Ob mikrobiološkem pregledu kužnine lahko ugotovimo, da je v približno 60 % okužba povezana z Gram negativnimi bakterijami; za ostale okužbe pa odgovarjajo po Gramu pozitivne bakterije, glive in virusi. Pomembna razlika med obema vrstama bakterij je med drugim tudi v tem, kako sprožijo prirojeni imunski odziv. Induktorske molekule imenujemo molekulski vzorci patogena (*pathogen – associated molecular patterns*, PAMP) (1).

Celična stena Gram negativnih bakterij sestoji iz dveh plasti; zunanjemu membrano sestavlja lipidni dvosloj, notranjo citoplazemska membrano pa peptidoglikan (slika 1). V zunanjem membranu so vgrajeni lipopolisaharidi (LPS), ki pa se med bakterijami razlikujejo. Vsem



Slika 1: Zgradba celične stene Gram negativnih bakterij [povzeto po (3)]

je skupna osnovna zgradba iz treh komponent: **lipid A**, **oligosaharidna sredica** in polisaharidni **O-antigen**. Oligosaharidna sredica iz 6 – 12 sladkornih enot tvori strukturo in nudi funkcionalno integriteto zunanje membrane. O – antigen (ali O – specifična veriga)

se nahaja na površini po Gramu negativne bakterije in je posledično izpostavljen gostiteljevemu imunskemu odzivu. Lipid A je biološko aktivna podenota lipopolisaharidov, ki velja za **endotoksin** – ta pa je odgovoren za indukcijo prirojenega imunskega odziva. Biološka aktivnost LPS se med bakterijami razlikuje, ker se med njimi razlikuje tudi struktura lipida A. LPS oziroma lipid A sam po sebi nima nobenega toksičnega učinka, njegova toksičnost se pokaže šele v imunskega odgovoru organizma (1, 5).

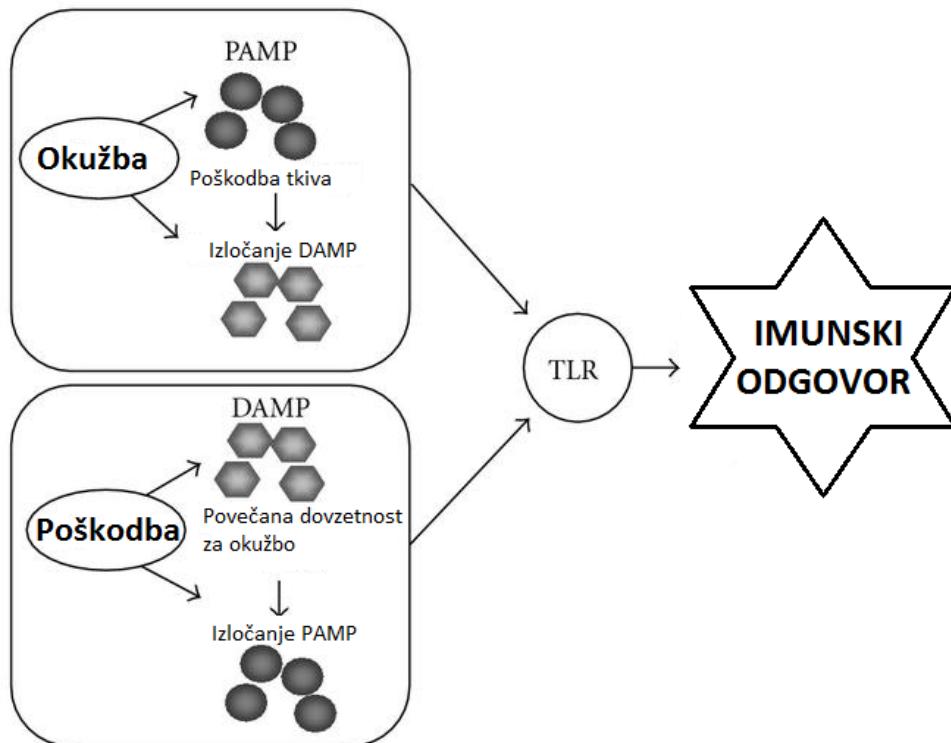
Pri Gram pozitivnih bakterijah ni prisotnega endotoksina, pač pa njihova celična stena sestoji iz peptidoglikana ter tehojske in lipotehojske kisline. Vse tri komponente lahko delujejo provnetno – čeprav je učinek veliko šibkejši kot pri lipopolisaharidih. Pomembno vlogo pri razvoju sepse pa imajo **eksotoksin**i, katere proizvajajo Gram pozitivne bakterije; nekateri so celo udeleženi pri razvoju septičnega šoka. Najnevarnejša oblika septičnega šoka je sindrom toksičnega šoka in ta je v večini primerov posledica eksotoksinov bakterij *Staphylococcus aureus* in *Streptococcus pyogenes*. Prav tako opažajo, da eksotoksin Gram pozitivnih bakterij povzročijo hipersenzitivnost gostiteljskega organizma za lipopolisaharide po Gramu negativnih bakterij, kar tudi deloma razjasni uničujočo naravo sindroma toksičnega šoka. Vendar prav slednja povezava omogoča zanimiv terapevtski pristop pri preprečevanju sepse – tarča zdravil so lipopolisaharidi, četudi je okužba primarno povzročena s strani po Gramu pozitivnih bakterij, saj bi s tem preprečili pretiran odziv hipersenzitivnega organizma na LPS (1).

Poleg že naštetih komponent bakterijskih celic pa lahko septični šok inducirajo še druge molekule (strukture celične stene ter nemetilirana CpG zaporedja bakterijske DNA). Ne glede na izvor induktorske molekule interakcija med slednjo in receptorjem aktivira prirojen imunski odziv in skoraj vedno vodi v vnetni proces, ki služi kot prva linija obrambe pred patogenimi organizmi (1, 2).

1. 2. Imunski odziv

Ob vdoru patogenih organizmov v človeško telo pride najprej do nespecifičnega prirojenega imunskega odziva. Slednji zaobjema veliko število **receptorjev**, ki prepoznavajo molekulske vzorce patogenov (*pattern recognition receptors*, PRR) in pa tudi **fagocite**, mukozne **epitelijske celice** in **endotelijske celice**. PRR niso antigen-specifični, a omogočajo hiter in obsežen imunski odgovor na nastalo grožnjo. Takojšnje prepoznavanje prisotnosti patogenov v gostiteljskem organizmu je pomembno tudi za razvoj pridobljenega imunskega sistema, ki je antigen-specifičen. Po prvem stiku z nekim patogenim organizmom se na površini B in T limfocitov izrazijo receptorji, ki specifično prepoznavajo antigene dotičnega patogena. Ob ponovnem stiku s tem patogenom pride do močnega imunskega odgovora – a lokaliziranega – hkrati pa se del limfocitov pretvori v spominske celice.

Prirojeni imunski odziv je nespecifičen in ker preko izločanja citokinov (TNF, IL-1, IL-6, IL-8) in drugih molekul (NO, PAF, komplement, eikozanoidi) povzroči uničenje celic okolnjega tkiva – zato te začnejo sproščati molekule, ki na nevarnost opozarjajo nepoškodovano tkivo, t.i. alarmine (*danger-associated molecular patterns*, DAMP) (slika 2). Tudi slednje prepoznavajo PRR.



Slika 2: Sproščanje DAMP in PAMP med patološkimi stanji [povzeto po (3)]

Alarmini običajno znotraj celičnih razdelkov opravljajo homeostatske funkcije, med patološkimi stanji (kot je sepsa) pa lahko pride do njihovega pasivnega sproščanja iz mrtvih celic ali pa do aktivnega sproščanja po spremenjenih sekrecijskih poteh iz poškodovanih celic. Ko se pojavi v ekstracelularnem okolju, inducirajo provnetne citokine in sprožijo kemotakso imunskih celic. Vsi ti pojavi vodijo do porušenja regulacije imunskega odgovora, kar je povod za razvoj sepse (4, 6).

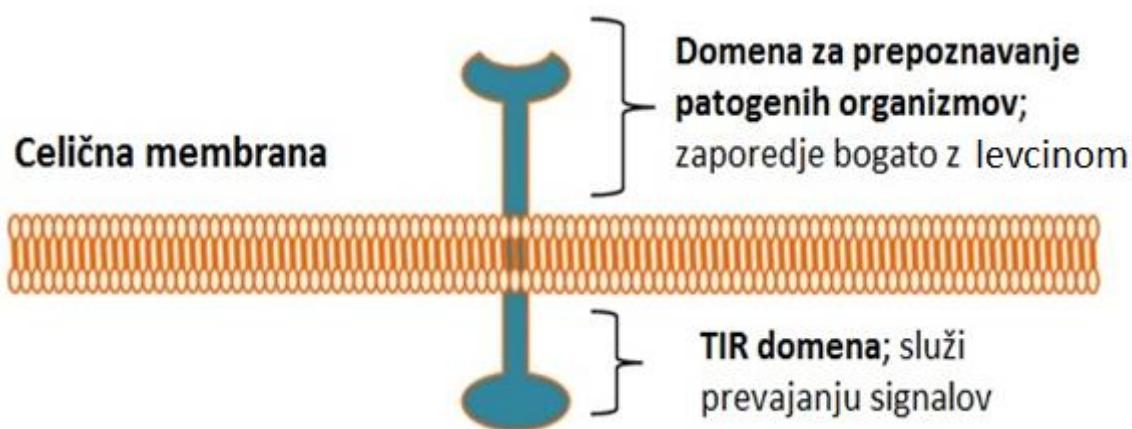
Ko gostiteljev organizem uspešno opravi z napadom patogena, je zelo pomembno vračanje v stanje homeostaze – tekom procesa eferocitoze pride do apoptoze in nadaljne fagocitoze imunskih celic, ki so svoje delo s patogenom že opravile. Če je regulacija tega procesa neustrezna, lahko pride do nekroze apoptotskih celic, kar vodi v sproščanje novih molekul alarminov iz ekstracelularnega okolja. Te pa nato spodbujajo prekomerne in še vedno prisotne vnetne procese (3).

1. 3. Tollu podobni receptorji

Skupino PRR delimo v tri družine receptorjev:

- Tollu podobni receptorji (*Toll-like receptors*, TLR),
- NOD-podobni receptorji (*NOD-like receptors*, NLR) in
- RIG-I podobni receptorji (*RIG-I like receptors*, RLR) (5, 7).

Glavno vlogo pri sprožanju prirojenega imunskega odziva med PRR imajo Toll-u podobni receptorji. Tovrstni receptorji so bili najprej odkriti pri vinski mušici (*Drosophila melanogaster*), do danes pa smo identificirali kar 13 homolognih sesalskih TLR (TLR 1 – 13, od tega se jih pri človeku izraža le prvih deset TLR 1 – 10). Vsi človeški TLR imajo ekstracelularne domene sestavljene iz zaporedij, bogatih z levcinom ter eno transmembransko regijo. Dobro ohranjena levcinska zaporedja skrbijo za prepoznavo PAMP. Deli receptorja, ki ležijo v citoplazmi, so v glavnem sestavljeni iz domen TIR (*Toll/IL-1 receptor*) – te domene so pomembne za nadaljnjo vezavo adapterskih proteinov in s tem proženja signalne kaskade (slika 3) (5, 8).

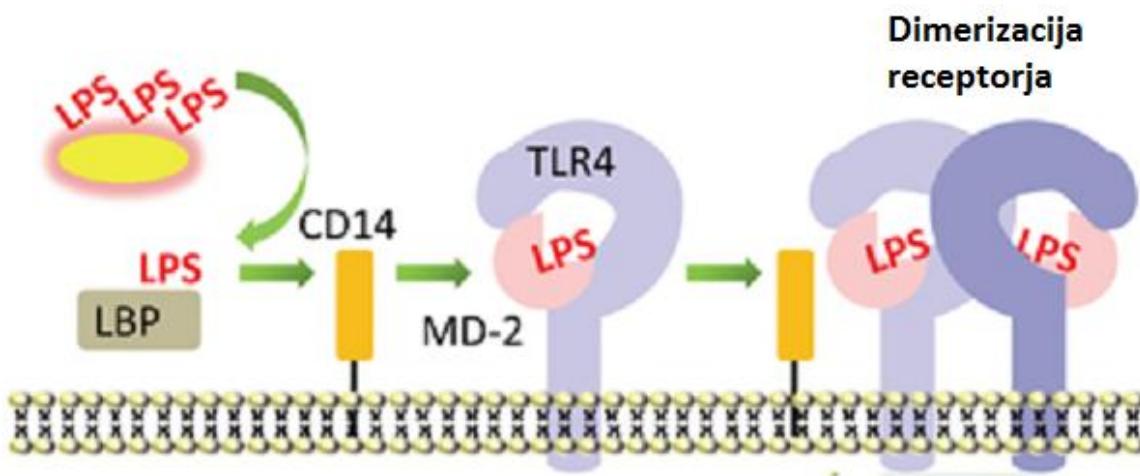


Slika 3: Struktura Tollu podobnega receptorja [povzeto po (8)]

TLR se lahko izražajo ali na površini celice (TLR 1, 2, 4, 5, 6 in 10) ali pa znotraj celice v endosomih (TLR 3, 7, 8 in 9). Prav tako različni TLR izkazujejo specifično vezavo do različnih substratov – TLR4 je receptor za LPS, TLR2 prednostno veže strukture celične stene Gram pozitivnih bakterij, TLR5 je receptor za flagelin (del bakterijske celične stene) in TLR9 prepoznavava elemente CpG znotraj bakterijske DNA (1,10).

1. 4. Prenos signalov preko TLR4

Ob vdoru Gram negativnih bakterij v gostiteljski organizem pride do vezave LPS na protein, ki veže lipopolisaharide (*lipopolysaccharide binding protein*, LBP). LBP nase veže podenoto LPS, katero imenujemo lipid A (slika 4). Do vezave pride ne glede na to, ali je lipid A v prosti obliki, ali je v fragmentih LPS ali pa če je zgolj del intaktne bakterijske celične stene (12).



Slika 4: Prikaz zaporedja reakcij, ki vodijo do vezave LPS na TLR4 [povzeto po (15)]

Sledi nastanek trojnega kompleksa [LPS-LBP-CD14]. Diferenciacijski faktor 14 (*cluster of differentiation 14*, CD14) je protein, ki se obnaša kot ko-receptor TLR in sodi med PRR. Obstaja v dveh oblikah; v topni in membransko vezani. Topna oblika (sCD14) se nahaja v plazmi, kjer prisotne celice (endotelijalne in epitelijalne) nimajo membransko vezane komponente CD14 in tako pomaga pri LPS signalizaciji. Netopna oblika (mCD14) je membransko vezana in se nahaja na površini mieloidnih celic, na katere je vezana preko glikozilfosfatidinozitolnega repa. Rep ji omogoča vezavo na membrano, četudi sama nima transmembranske regije. Funkcija komponente CD14 je ta, da v nadaljevanju signaliziranja predstavi vezan LPS receptorskemu sistemu za LPS, ki sestoji iz TLR4 in MD-2 (12, 15). MD-2 je ekstracelularni adapterski glikoprotein, ki je pomemben za aktivacijo TLR4 ob prisotnosti LPS. Je ključen za uspešno LPS signalizacijo, saj ob odsotnosti MD-2 ne pride do prenosa signala oziroma do odziva na LPS (dokazali s »knockout« študijami na miših) (12, 13).

Vezava liganda na receptor izzove konfomacijske spremembe in posledično dimerizacijo slednjega, kar omogoči vezavo adapterskih proteinov. Te so prvi v znotrajcelični signalni kaskadi, ki vodi translokacijo jedrnega faktorja κβ (NF-κβ) v jedro – ta dogodek povzroči

spodbujeno transkripcijo in translacijo provnetnih citokinov, kot so interlevkin 1 (IL-1), interlevkin 6 (IL-6) in faktor tumorske nekroze alfa (TNF- α), prav tako pa pride tudi do aktivacije imunskih celic (makrofagi in dendritične celice) (12,16).

Odziv TLR na LPS lahko razdelimo na zgodnjo in pozno signalizacijo. Zgoden odziv privede do aktivacije jedrnega faktorja $\kappa\beta$ (NK- $\kappa\beta$), pozen odziv pa prav tako pripomore k aktivaciji NK- $\kappa\beta$, hkrati pa aktivira tudi interferon-regulatorni faktor 3 (IRF3), pride do translokacije tega faktorja v jedro in do transkripcije interferonov alfa in beta (12, 15, 16).

1. 5. Klinični pomen manipulacije sistema TLR4

Zdravljenje sepse je problem, na katerega še nismo našli pravega in dokončnega odgovora. Ene od prvih študij so pokazale, da se umrljivost laboratorijskih živali zelo izmanjša, v kolikor so uspeli nevtralizirati en sam proinflamatorni citokin – faktor tumorske nekroze alfa (TNF- α). Z uporabo monoklonskih protiteles proti TNF- α so uspeli zaščititi proučevane živali pred z Gram negativnimi bakterijami povzročeno sepson. Prav tako so z antagonisti rekombinantnih IL-1 receptorjev zmanjšali smrtnost pri živalih, pri katerih so nevtralizirali IL-1. Žal se je tekom kliničnih študij izkazalo, da tovrstni pristopi niso učinkoviti pri zdravljenju sepse na človeku (2).

Z napredkom medicinske znanosti in podrobnejšim poznavanjem molekularnih osnov delovanja imunskega sistema se je ponudilo nekaj novih terapevtskih pristopov, ki ne ciljajo samih mediatorjev vnetja, ampak vplivajo na različne stopnje v signalni kaskadi in s tem okrepijo oziroma ošibijo imunski odziv. Manipulacija imunskega odziva je zaželjena (in potrebna) pri številnih patoloških stanjih, kjer gre lahko tako za premočan imunski odgovor, kot tudi za prešibkoga. V ta namen so z raziskovanjem odkrili agoniste, ki imunski odziv ojačajo, in antagoniste na TLR, ki imunski odziv oslabijo. Uporaba enih ali drugih se razlikuje glede na klinično sliko. Uporaba agonistov TLR se je izkazala za potencialno koristno pri zdravljenju alergijskih stanj (alergijski rintis, astma), tumorskih obolenj (tumor dojk, kolorektalni tumor – tudi metastatski, melanom, karcinom ledvičnih celic,...) in kroničnih virusnih okužb (hepatitis C, HIV, genitalni hepres, humani papilomavirus,...) (15, 16).

TLR antagonisti so lahko zelo različne molekule;

- strukturni analogi agonistov, ki se vežejo na receptor a niso sposobni izzvati signala,
- anti-TLR protiteesa ali
- majhne antagonistične molekule, izbrane iz knjižnice spojin (16).

Problem prve skupine antagonistov (strukturni analogi agonistov, torej analog lipopolisaharida) je v tem, da so to zelo velike molekule, pri katerih je praktično nemogoče doseči želene farmakološke lastnosti. Primer tovrstne učinkovine je Eritoran, mimetik lipida A, ki se je v fazi III kliničnih študij izkazal za premalo učinkovitega (15).

Potencialna klinična vrednost antagonistov TLR se kaže pri vnetjih, katera so sprožena zaradi okužbe z mikroorganizmi (predvsem sepsa zaradi Gram negativnih bakterij), pri nevropski bolečini in pri sterilnem vnetju (tj vnetje, ki ni povzročeno zaradi okužbe z mikroorganizmi; običajno je posledica poškodbe tkiva) (16).

1. 6. Terapevtske tarče v sistemu LPS/TLR4

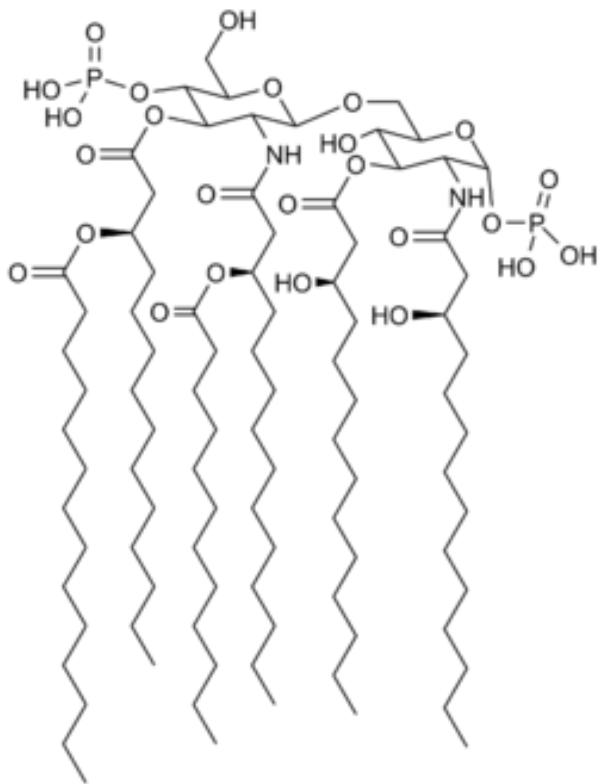
Kot že opisano, se LPS signalizacija prične z vezavo LBP na LPS, nato pride do prenosa LPS z LBP na CD14. Funkcija CD14 je prenašanje molekul LPS do MD-2 oziroma do heterodimernega kompleksa [MD-2 – TLR4], nato pa pride do dimerizacije trojnega kompleksa – [MD-2 – TLR4 – endotoksin]₂. Heterodimerizacija povzroči aktivacijo in premik adapterskih proteinov do intracelularne domene TLR4, kar sproži znotrajcelično signalno kaskado, ki se konča s translokacijo transkripcijskih faktorjev v jedro in izražanjem citokinov in interferonov. Že iz opisa poti je razvidno, da je potencialnih terapevtskih tarč več (18).

Možnosti so:

1. Učinkovina je LPS ligand.
2. Učinkovina cilja CD14.
3. Učinkovina cilja MD-2 oziroma kompleks [MD-2 – TRL4].
4. Učinkovina se direktno veže na TLR4 oziroma MD-2 (18).

1. 6. 1. Učinkovina je LPS ligand

Večina ligandov se veže na podenoto LPS, ki jo imenujemo lipid A. Ta izkazuje anionsko amfifilno naravo, zato so kationske amfifilne molekule idealne za močne interakcije. Ob vezavi tovrstnih učinkovin na LPS je onemogočena udeležba slednjega v CD14/MD-2/TLR4 signalni poti in je torej preprečen imunski odgovor. Optimizacija strukture učinkovine omogoča povečevanje afinitete za LPS, hkrati pa zmanjševanje toksičnosti zaradi površinsko aktivnih lastnosti (18).



Slika 5: Lipid A (biološko aktivna podenota LPS) [povzeto po (19)]

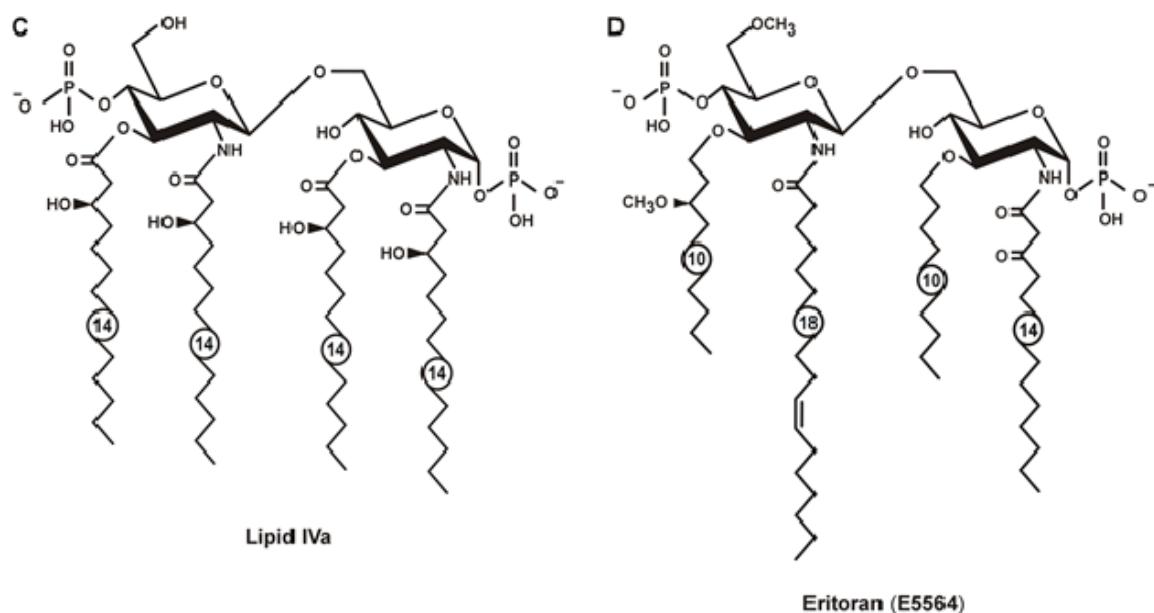
1. 6. 2. Učinkovina cilja CD14

CD14 ima v signalni poti pomembno vlogo, saj nase veže molekule LPS, jih dostavlja do TLR4 oziroma do kompleksa [MD-2 – TLR4] in s tem povečuje občutljivost imunskih celic na lipopolisaharide. Večina molekul, ki se vežejo na CD14 in aktivirajo TLR4 signalno pot (poleg LPS so to še lipotehojska kislina, topni peptidoglikani in lipoproteini), je negativno nabitih. V kolikor se pa učinkovina veže na CD14 in s tem onemogoči prenos signalov po TLR4 signalni poti, bo tudi preprečen imunski odgovor (18).

1. 6. 3. Učinkovina cilja MD-2 oziroma kompleks [MD-2 – TRL4]

Večina sintetiziranih analogov lipida A, ki lahko delujejo agonistično ali antagonistično na TLR4, tvori interakcije z vezavnim mestom na MD-2 in zavzame podobno konformacijo kot lipid A. Ali je učinkovina agonist ali antagonist, določuje število in prostorska razporeditev lipidnih verig. Agonisti imajo teh verig 5 ali 6 in tvorijo stožčasto hidrofobno jedro, med tem ko imajo antagonisti manj kot 6 lipidnih verig, ki tvorijo valjasto hidrofobno jedro. Dva bolj podrobno raziskana analoga lipida A sta naravni lipid IVa in sintetični Eritoran (slika 6) – ta se veže v hidrofobni žep MD-2 in s tem zavira nastajanje vnetnih mediatorjev. Eritoran se v fazi III kliničnih testiranj žal ni izkazal kot učinkovito sredstvo za zdravljenje sepse (18, 20).

Sintetizirali so tudi peptidni antagonist iz 17 aminokislinskih ostankov, ki se veže na kompleks [MD-2 – TLR4]. Molekula vsebuje enako vezavno regijo za TLR4, kot jo ima MD-2, ter poseduje vse potrebne AK ostanke za vezavo, ne pride pa do aktivacije TLR4 signalne poti (18).

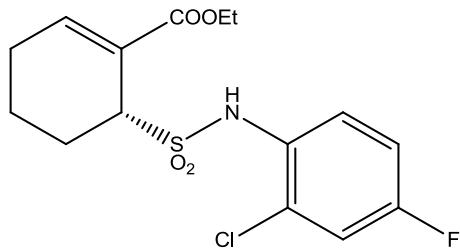


Slika 6: Struktura naravnega in sinteznega antagonista TLR4 (21)

1. 6. 4. Učinkovina se direktno veže na TLR4 oziroma MD-2

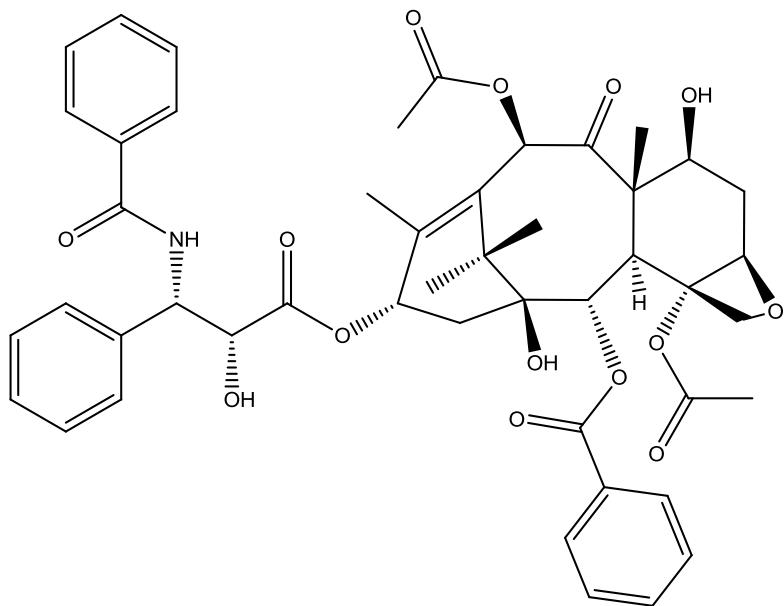
Nekatere molekule (to ne velja za LPS) se lahko vežejo direktno na TLR4 ali MD-2 in ne potrebujejo predhodne vezave na LBP in CD14. Primer takšne učinkovine je derivat cikloheksena TAK-242 (resatorvid, slika 7), ki se preko Cys⁷⁴⁷ veže na intracelularno domeno TLR4, s tem preprečuje interakcije med TLR4 in njegovimi adaptorskimi

molekulami in posledično zaustavi signalo kaskado, ki vodi do produkcije številnih citokinov (18, 22).



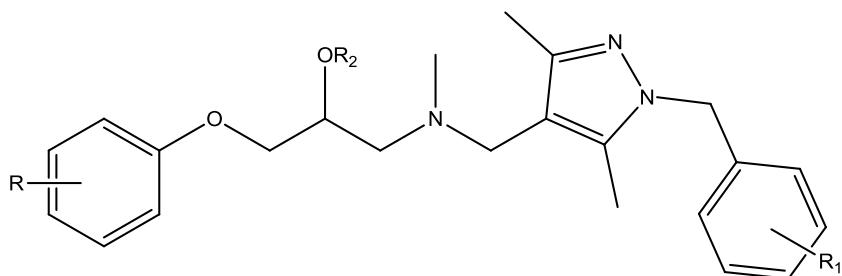
Slika 7: Struktura spojine TAK-242 (resatorvid) [povzeto po (22)]

Protitumorna učinkovina paklitaksel se veže direktno na MD-2 in s tem prekrije del vezavnega mesta za LPS, zato se slednji ne more vezati. Ponovno je preprečena LPS/TLR4 signalizacija (18).



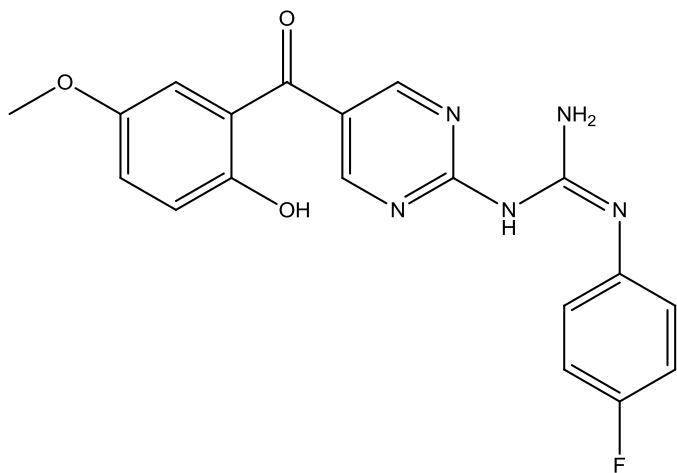
Slika 8: Struktura učinkovine paklitaksel (23)

Nastanek kompleksa TLR4/MD-2 prav tako ovirajo nekatere molekule, ki so derivati β -aminoalkoholov (slika 9). Dokazali so, da so tovrstne molekule učinkovite pri preprečevanju aktivacije jedrnega faktorja $\kappa\beta$ na celični liniji HEK 293, kar pomeni, da zavirajo vnetje, povzročeno s strani lipopolisaharidov (15).



Slika 9: Struktura antagonistov TLR4 z β -aminoalkoholnim skeletom [povzeto po (15)]

Z virtualnim rešetanjem pa je bila odkrita molekula (slika 10), ki se veže med TLR4 in MD-2 in tako prepreči prevajanje signalov, ki bi sprožili vnetne procese. Za to molekulo so dokazali antagonistično delovanje na TLR4 z IC₅₀ vrednostjo $16,6 \pm 1,2 \mu\text{M}$, prav tako pa so s pomočjo površinske plazmonske rezonance dokazali, da se molekula zares veže na TLR4. Predpostavljen mehanizem vezave je ta, da molekula preko gvanidinske skupine tvori vodikove vezi z aminokislinskimi ostanki Asp²³⁴, Asp²⁰⁹ in Ser²¹¹ (24).



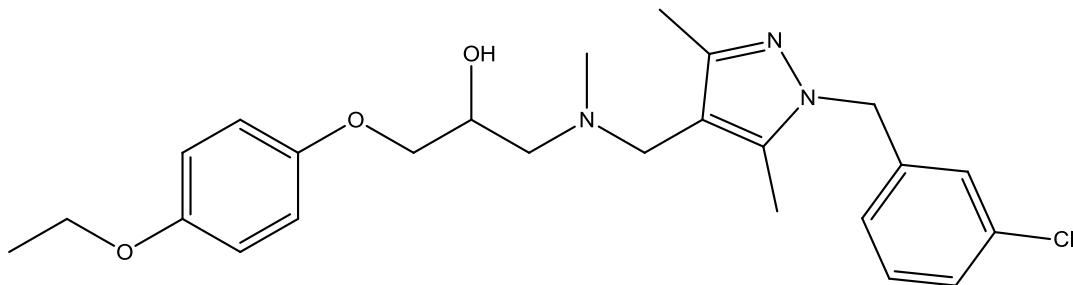
Slika 10: Struktura molekule, odkrite z virtualnim rešetanjem [povzeto po (24)]

2. Načrt za delo in delovne hipoteze

Namen dela je sintetizirati antagoniste Toll-u podobnega receptorja 4 s hidroksietilaminskim in gvanidinskim skeletom.

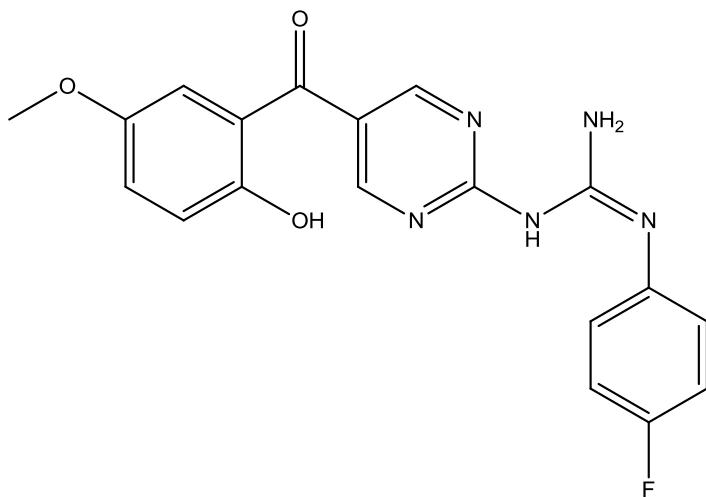
Postavili smo si naslednje cilje:

- 1) Ponovili bomo sintezo že znanega antagonista na TLR4 (spojina 3; slika 11), katerega bomo v nadalnjem testiranju antagonističnega delovanja sintetiziranih spojin uporabili kot pozitivno kontrolo.



Slika 11: Spojina 3

- 2) Glede na literaturne podatke bomo poiskali najbolj ustrezeno sintezno pot za izgradnjo spojine, ki je bila odkrita z virtualnim rešetanjem – spojina **a** (slika 12).



Slika 12: Struktura spojine **a** [povzeto po (24)]

- 3) Sinteza analogov spojine **a**, da bomo pridobili nove informacije o odnosu med strukturo in antagonističnim delovanjem na TLR4.
- 4) Testirali bomo topnost sintetiziranih spojin in njihovo citotoksičnost na celični liniji HEK 293 ter jim določili jakost antagonističnega delovanja na TLR4.

3. Materiali in metode

3. 1. Materiali

Pri sinteznem delu smo uporabili reagente in topila različnih proizvajalcev (Acros, Sigma Aldrich, Fluka, TCI). Brezvodna topila smo pripravili z destilacijo in sušenjem nad molekularnimi siti.

3. 2. Metode

3. 2. 1. Kromatografske metode

a) Tankoplastna kromatografija (TLC)

TLC smo izvajali na aluminijastih ploščah z 0,20 mm debelim nanosom silikagela proizvajalca Merck (Merck DC Fertigplatten Kieselgel 60 GF₂₅₄ z dodanim fluorescenčnim indikatorjem. Za razvijanje kromatogramov smo pripravili različne mobilne faze (navedeno pri vsaki spojini posebej). Spojine smo detektirali z UV svetlobo pri valovni dolžini 254 nm in z uporabo orositvenih reagentov (ninhidrin, 2,4-dinitrofenilhidrazin, FeCl₃).

b) Kolonska kromatografija

Kolonsko kromatografijo smo uporabili pri nekaterih sintezah kot tehniko ločevanja oziroma čiščenja spojin, pri čemer je bila velikost delcev silikagela v vseh primerih enaka (0,04-0,063 nm), mobilne faze pa so se razlikovale (navedeno pri vsaki spojini posebej).

c) HPLC

Analizirali smo s pomočjo reverznofazne tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) na sistemu Agilent 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ZDA). Sistem je opremljen s kvarterno črpalko in detektorjem, ki zaznava več valovnih dolžin. Uporabili smo 5 µm kolono Agilent Eclipse Plus C18 (4,6 x 50 mm, 5 µm), pretok 1 mL/min, detekcija je potekala pri 254 nm, uporabljena zmes topil za elucijo je A = 0,1 % TFA v vodi in B = metanol. Uporabili smo naslednji gradient: 0.-20. min: 10% B → 90% B v A; 20.-25. min: 90% B v A; 25.-30. min 90% B → 10% B v A. Analiza je potekala 30 minut pri temperaturi 25°C.

3. 2. 2. Spektroskopske metode

a) Jedrska magnetna resonanca (NMR)

NMR spektri so bili posneti na spektrometru Bruker AVANCE 400 DPX (400 MHz) pri 298K. Kemijski premiki so podani v ppm glede na razdaljo od tetrametilsilana (TMS, δ 0.00 ppm), ki nam je služil kot interni standard. Za topila smo uporabljali DMSO- d_6 , CDCl₃, devteriran aceton. Sklopitvene konstante (J) so podane v Hz, sklopitveni vzorci pa so podani z oznakami **s** (singlet), **bs** (široki singlet), **d** (doublet), **dd** (doublet doubleta), **t** (triplet) in **m** (multiplet). Za reševanje NMR spektrov smo uporabili računalniški program MestReNova 8. 1. 2 – 11880 proizvajalca MASTERLAB RESEARCH S. L.

b) Masna spektroskopija

Masni spektri so bili posneti na spektrometru VG- Analytical Autospec Q v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

3. 2. 3. Drugo

a) Določanje tališča

Trdnim spojinam smo določili tališče s pomočjo Koflerjevega mikroskopa z ogrevalno mizico Leica; vrednosti so nekorigirane.

b) Mikrovalovni reaktor

Pri delu smo uporabili tudi mikrovalovni reaktor CEM Discover z IR in optičnim načinom merjenja temperature.

c) Nomenklatura in risanje spojin

Strukturne formule spojin in njihovo IUPAC poimenovanje smo dobili s pomočjo programa ChemDraw Ultra 12.0.2.1076. Program SciFinder Scholar nam je omogočil iskanje spojin in sinteznih postopkov v podatkovnih bazah.

3. 2. 4. In vitro testiranje in testiranje na celičnih kulturah

a) Preverjanje topnosti in citotoksičnosti

Za testiranje topnosti uporabimo pripravljene 25 mM raztopine izbranih analogov v DMSO, katere dodajamo v medij za celične kulture (RPMI 1640). V raztopinah s pomočjo invertnega svetlobnega mikroskopa (Nikon Eclipse TE300, Tokio, Japonska) opazujemo tvorbo precipitatov – v kolikor do slednjih ni prišlo, dokažemo topnost.

Študije citotoksičnosti topnih substanc izvedemo na celični kulturi HEK 293 (Invivogen, San Diego, CA, ZDA). Celice nacepimo na gojišča in jih inkubiramo v prisotnosti (v koncentracijah 20 µM in 100 µM) ali odsotnosti naših analogov. Za kontrolo uporabimo DMSO. Po 24 urah izvedemo MTS test (31), pri katerem celicam dodamo substrat (tetrazolijev barvilo MTS), le-tega pa žive celice metabolizirajo do produkta, ki ga spektrofotometrično določimo (merimo absorbanco). Rezultate spremljamo tudi s pretočno citometrijo.

b) Študije antagonistične aktivnosti

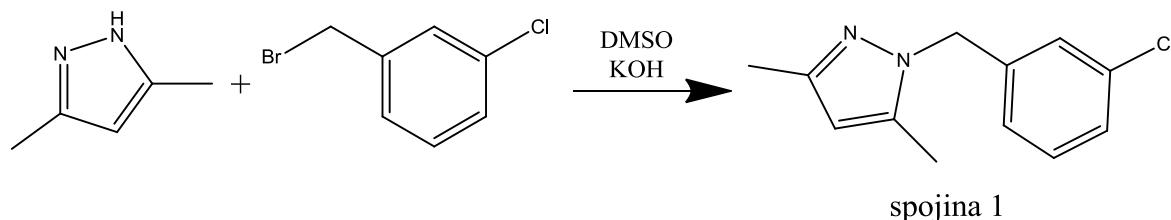
Antagonistično delovanje naših spojin določimo preko za TLR4 specifične signalne poti, zato uporabimo reportersko celično linijo HEK-BlueTM-hTLR4 (Invivogen), saj le-ta selektivno izraža TLR4 in preko TLR4 agonistov aktivira alkalno fosfatazo kot reporterski gen. Antagonizem izbranih spojin je bil dokazan po navodilih proizvajalca. Za negativno kontrolo uporabimo zgolj lipopolisaharid (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, ZDA), ki je TLR4 agonist. Za pozitivno kontrolo pa uporabimo komercialno dostopni TLR4 antagonist TAK-242 (Invivogen), katerega uporabimo v skladu z navodili proizvajalca. Za oceno antagonizma izbranih spojin celice gojimo v skladu z navodili dobavitelja. Celice najprej inkubiramo z izbranimi substancami v različnih koncentracijah (2 uri pri 37 °C), nato pa jim dodamo LPS in inkubiramo 20 ur. Po 20 urah kolorimetrično analiziramo supernatante na prisotnost alkalne fosfataze. IC₅₀ vrednosti izbranih spojin izračunamo glede na inhibicijo izražanja alkalne fosfataze v medij, torej glede na upad izmerjene absorbance.

4. Eksperimentalno delo

Najprej smo ponovili sintezo že znanega TLR4 antagonista s hidroksietilaminskim fragmentom (spojina **3**), pri čemer smo uvedli spremembe glede na postopek, opisan v literaturi (15). Spojino **3** smo želeli uporabiti kot pozitivno kontrolo pri testiranju antagonističnega delovanja ostalih sintetiziranih spojin. V naslednjem koraku smo se osredotočili na spojino **a**, ki je bila odkrita z virtualnim rešetanjem (24). Glede na literaturne podatke smo želeli poiskati najbolj ustrezne sintezne postopke za pripravo te spojine oziroma njenih strukturnih analogov. Pripravili nekaj analogov spojine **a** in pri tem pridobili nove informacije o povezavi med strukturo spojine in njenim antagonističnim delovanjem na TLR4.

Končnim spojinam smo preverili topnost in citotoksičnost na celični liniji HEK 293, nato pa smo jim izmerili tudi inhibitorno aktivnost na TLR4 signalni poti.

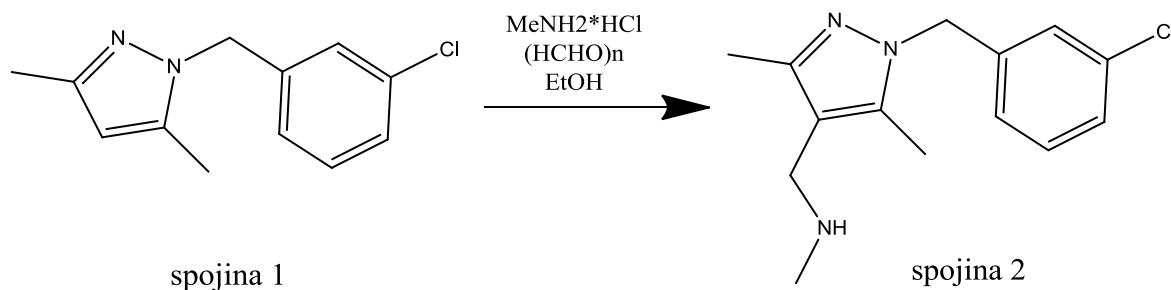
Sinteza spojine 1 [1-(3-klorobenzil)-3,5-dimetil-1H-pirazol]



3,5-dimetilpirazol (6,00 g; 62,4 mmol) in KOH (2,64 g; 46,8 mmol) raztopimo v DMSO (45 ml) in segrevamo 1,5 ure pri 80 °C, nato pa ohladimo na sobno temperaturo. Po kapljicah dodajamo 1-(bromometil)-3-klorobenzen (8,44 ml; 62,4 mmol) in mešamo pri sobni temperaturi 20 ur. Nato reakcijski zmesi dodamo 150 ml vode in izvedemo ekstrakcijo s kloroformom (3 x 200 ml). Združene organske faze speremo z vodo (3 x 200 ml) in nasičeno raztopino NaCl (1 x 200 ml), jih posušimo nad Na₂SO₄, odfiltriramo soli in odparimo topila. Oljni zaostanek čistimo s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc / Heksan = 1 / 3).

1-(3-klorobenzil)-3,5-dimetil-1H-pirazol (1)	
Izgled	Svetlo rumeno olje
Rf (MF)	0,43 (etilacetat / heksan = 1 / 3)
Izkoristek	45,8 %
T tališča	/ (olje)

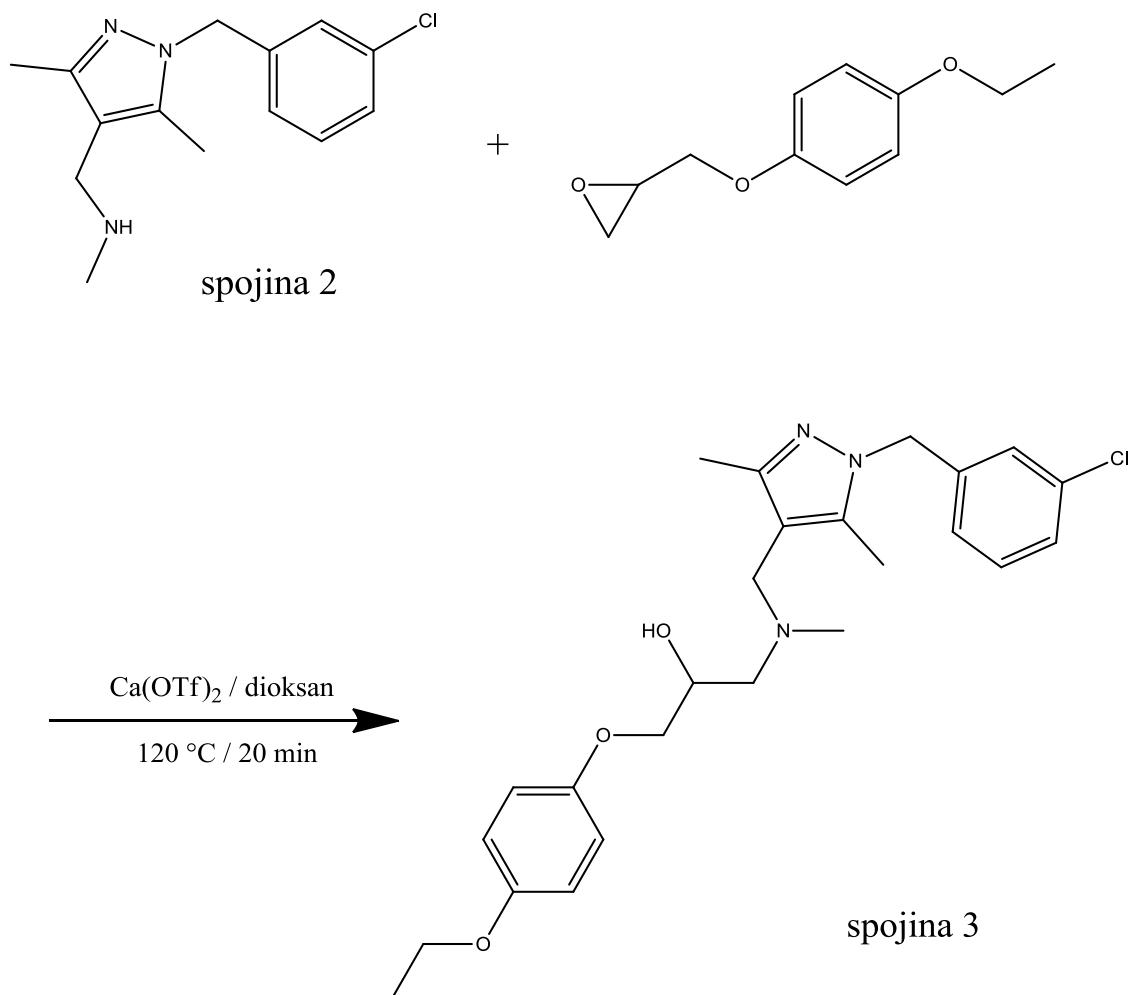
Sinteza spojine 2 [1-(1-(3-klorobenzil)-3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)-N-metilmantanamin]



V etanolu (5,00 ml; 85,9 mmol) raztopimo $\text{MeNH}_2 \cdot \text{HCl}$ (5,80 g; 85,9 mmol) in paraformaldehid (5,17 g; 171,8 mmol) ter mešamo 2 uri pri 60°C. Nato dodamo spojino **1** (6,3 g; 28,6 mmol) in segrevamo 24 ur pri 75°C. Ohladimo, odparimo etanol in zaostanek raztopimo v kloroformu (200 ml). Speremo z nasičeno raztopino NaHCO_3 (100 ml) in vodno fazo speremo s kloroformom (3 x 200 ml). Združimo organske faze, jih sušimo nad Na_2SO_4 , odfiltriramo soli in odparimo topila. Surov produkt smo pretvorili v sol s HCl in izvedli reverznofazno kolonsko kromatografijo. Najbolj čiste frakcije smo raztopili v 50 ml 0,1 M NaOH in vodno fazo spirali z EtOAc (3 x 50 ml), nato pa smo združene organske faze sušili nad Na_2SO_4 , odfiltrirali soli ter odparili topila.

1-(1-(3-klorobenzil)-3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)-N-metilmelan amin (2)	
Izgled	Svetlo rumeno olje
Rf (MF)	0,16 (etilacetat / metanol = 9 / 1)
Izkoristek	6,33 %
T tališča	/ (olje)

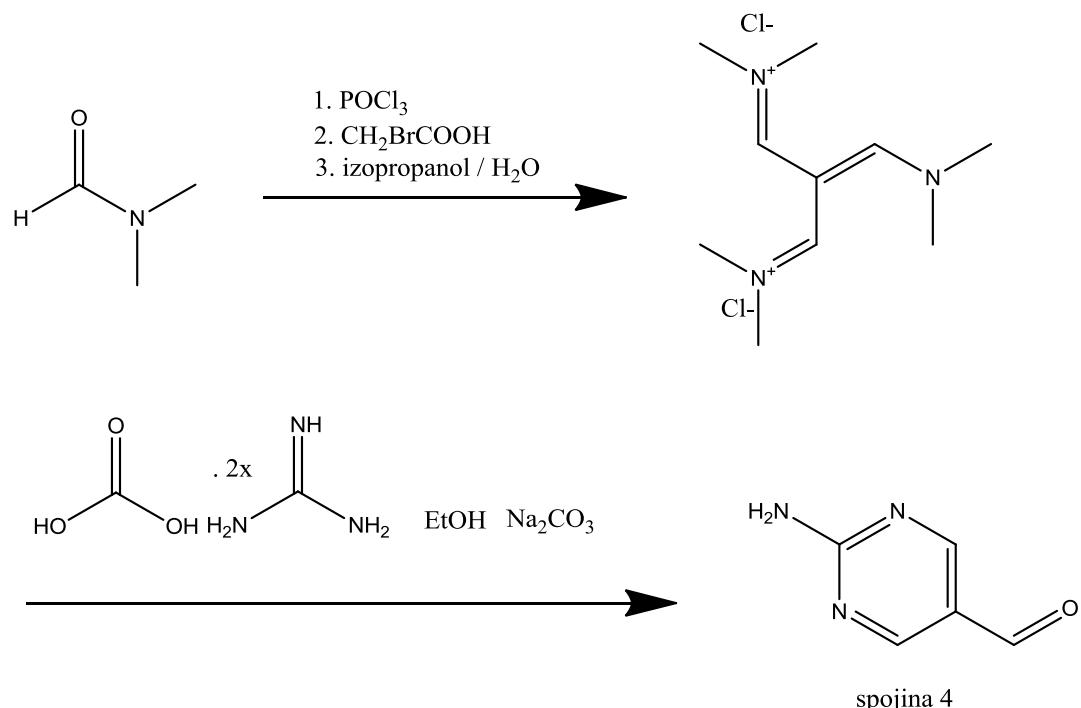
Sinteza spojine 3 [1-(((1-(3-klorobenzil)-3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)metil)(metil)amino)-3-(4-etoksifenoksi)propan-2-ol]



Spojino 2 (0,48 g; 1,81 mmol) smo raztopili v brezvodnem dioksanu (5,00 ml) in dobljeni raztopini dodali 2-[(4-metoksifenoksi)metil]oksiran (0,32 g; 1,65 mmol) ter katalizator $\text{Ca}(\text{OTf})_2$ (0,31 g; 0,91 mmol). Reakcijo smo izvedli v mikrovalovnem reaktorju pod pogoji: 50 W, 120°C , 20 min, P_{\max} 10 bar. Reakcijsko zmes smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: etilacetat / metanol = 10 / 1).

1-(((1-(3-klorobenzil)-3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)metil)(metil)amino)-3-(4-etoksifenoksi) propan-2-ol (3)	
Izgled	Brezbarvno olje
Rf (MF)	0,23 (etilacetat/metanol=10/1)
Izkoristek	77,8 %
¹H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ(ppm) = 1,37 (t, 3H, J=7,0 Hz; CH ₃); 2,12 (s, 2H, CH ₂); 2,24 (s, 3H, CH ₃); 2,25 (s, 3H, CH ₃); 2,47 (dd, 1H, J ₁ =4,2 Hz, J ₂ =12,3 Hz; CH ₂ -Ha); 2,61 (dd, 1H, J ₁ =9,6 Hz, J ₂ =12,3 Hz; CH ₂ -Hb); 3,23 (bs, 1H, OH); 3,38 (ABq, 2H, J=12,3 Hz; Δv= 49,0 Hz; CH ₂); 3,89 (d, 2H, J=5,1 Hz, CH ₂); 3,96 (q, 2H, J=7,0 Hz, CH ₂); 4,05-4,12 (m, 1H, CH); 5,17 (s, 2H, CH ₂); 6,78-6,84 (m, 2H, Ar-H); 6,89-6,91 (m, 1H, Ar-H); 6,99-7,02 (m, 1H, Ar-H); 7,19-7,22 (m, 2H, Ar-H)
¹³C NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ(ppm)= 9,8 (CH ₃), 12,1 (CH ₃); 14,9 (CH ₃); 41,7 (CH ₃); 51,4 (CH ₂); 52,0 (CH ₂); 59,3 (CH ₂); 63,9 (CH ₂); 66,0 (CH); 70,9 (CH ₂); 113,2 (C); 115,3 (CH); 115,4 (CH); 124,5 (CH); 126,5 (CH); 127,7 (CH); 130,0 (CH); 134,6 (C); 138,1 (C); 139,2 (C); 147,6 (C); 152,7 (C); 153,2 (C)
ESI-HRMS	Izračunano za C ₂₅ H ₃₃ ClFN ₃ O ₃ (m/z): 458,2205 [M+H] ⁺ ; izmerjena vrednost (m/z): 458,2226
T tališča	/ (olje)

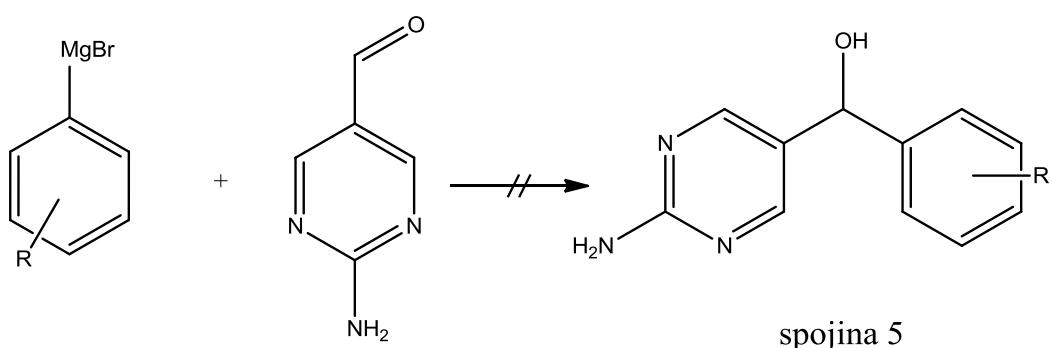
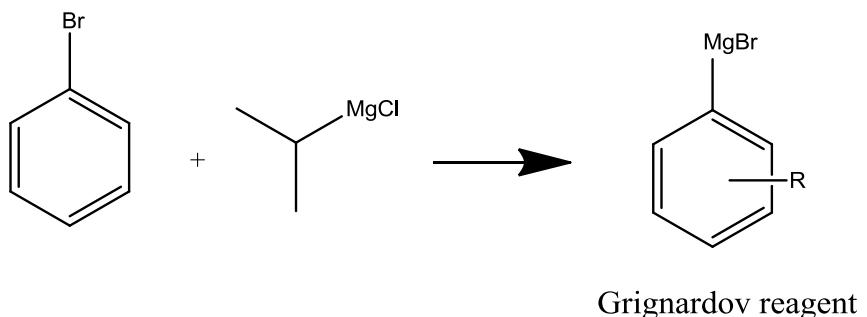
Sinteza spojine 4 [2-aminopirimidin-5-karbaldehid]



Fosforil triklorid (98 ml; 1,05 mol) smo počasi dodajali v DMF (420 ml) pri 0 °C in ohranjali temperaturo pod 10 °C (reakcija je eksotermna). Zmes mešamo dve uri, nato pa dodamo 2-bromoocetno kislino (50,0 g; 0,36 mol) ter čez noč mešamo pri 90 °C. Po 17 urah mešanja raztopino ohladimo na sobno temperaturo, jo zlijemo v izopropanol (200 ml) pri 0 °C ob stalnem mešanju in dodamo vodo (15 ml). Dobljeno goščo razredčimo z izopropanolom (150 ml) in izopropil acetatom (150 ml), pri čemer se intermediat obori. Rumeno oborino intermediata odfiltriramo, speremo s CH_3CN (150 ml) in posušimo pod vakuumom. Zmes intermediata (30,285 g; 0,119 mol), gvanidinkarbonata (10,68 g; 0,059 mol) in Na_2CO_3 (19,21 g) v etanolu (200 ml) segrevamo čez noč (20 ur) na 80 °C. Po koncu reakcije oborino odfiltriramo ter filtrat sušimo nad MgSO_4 , odfiltriramo soli ter odparimo topilo.

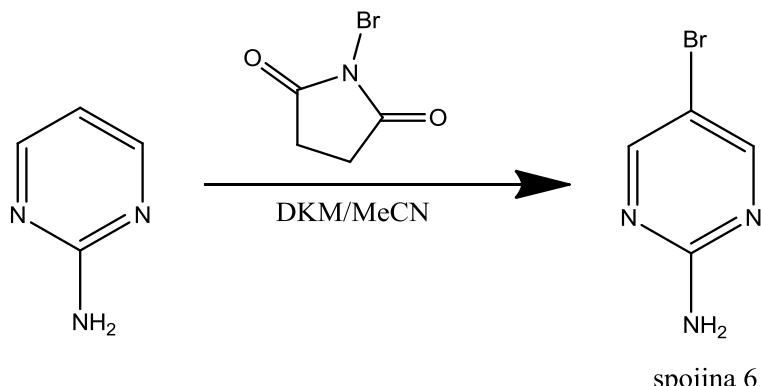
2-aminopirimidin-5-karbaldehid (4)	
Izgled	Rumeni kristali
Rf (MF)	0,31 (etilacetat/metanol=10/1)
Izkoristek	45,2 %
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz; $\text{DMSO}-d_6$)	$\delta(\text{ppm}) = 7,30$ (bs, 2H, NH_2); 8,69 (s, 2H, 2 x pirimidin-H); 9,71 (s, 1H, CHO)
T tališča	> 300 °C

Sinteza spojine 5 [(2-aminopirimidin-5-il)(2,4,5-trifluorofenil)metanol]



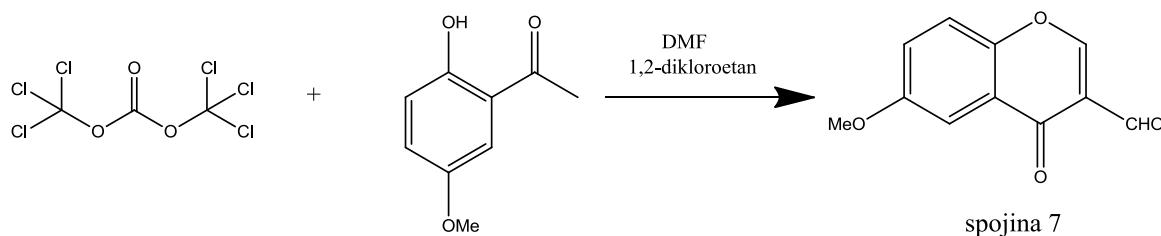
V ohlajeno raztopino (-20 °C) substituiranega bromobenzena ($R = 4\text{-NO}_2$ ali 2,4,5-trifluoro) (100 mmol) v THF kapljamo izopropilmagnezijev klorid (200 mmol) ter mešamo 2 uri pri -20 °C. Nastali Grignard reagent (12 mmol) nato kapljamo v raztopino spojine 4 (1,525 g; 6 mmol) v THF ob prisotnosti katalizatorja (Co ali Fe-soli) in liganda/baze (HMTA, TMEDA), mešamo pri -20 °C ter spremljamo reakcijo s tankoplastno kromatografijo. Po koncu reakcije smo reakcijsko zmes naalkalili z NaHCO_3 (50 ml), nato pa smo izvedli ekstrakcijo spojine 5 v EtOAc (100 ml), katerega smo spirali z vodo (1 x 50 ml) in nasičeno raztopino NaCl (1 x 50 ml). Dobili smo množico produktov in izolacija spojine 5 ni bila mogoča, zato reakcijsko zmes zavrzemo.

Sinteza spojine 6 [5-bromopirimidin-2-amin]



2-aminopirimidin (1,9 g; 20 mmol) in NBS (5,34 g; 30 mmol) raztopimo v zmesi diklorometana (40 ml) in acetonitrila (40 ml), nato pa reakcijsko zmes mešamo 72 ur pri sobni temperaturi. Po koncu reakcije reakcijsko zmes spiramo z natrijevim bisulfitom (1 x 50 ml), vodo (1 x 50 ml) in kloroformom (1 x 50 ml). Izpadlo oborino odfiltriramo in speremo z acetonom.

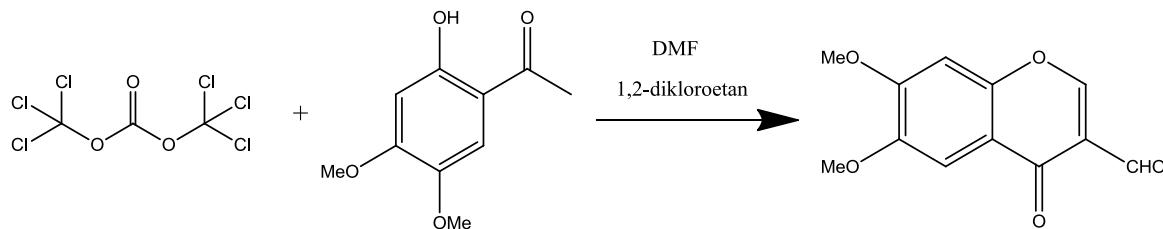
5-bromopirimidin-2-amin (6)	
Izgled	beli kristali
Rf (MF)	0,62 (DKM/metanol=15/1)
Izkoristek	62,4 %
¹ H NMR (400MHz, DMSO-d ₆)	δ (ppm) = 6,78 (s, 2H, NH ₂); 8,28 (s, 2H, Ar-H)
T tališča	271 – 275 °C

Sinteza spojine 7 [7-metoksi-4-okso-4H-kromen-3-karbaldehid]

Vse spodaj naštete postopke izvajamo pod brezvodnimi pogoji v argonovi atmosferi. Trifosgen (1,01 g; 3,4 mmol) raztopimo v 1,2-dikloroetanu (5,00 ml) ter dobljeno raztopino po kapljicah dodajamo v zmes DMF/1,2-dikloroetan (2,0 ml/2,5 ml) na ledu. Mešamo 20 minut, nato ledeno kopel odstranimo. Pustimo, da se segreje do sobne temperature in mešamo še eno uro, da nastane Vilsmeierjev reagent.

2-hidroksi-5-metoksiacetofenon (0,25 g; 1,5 mmol) v 1,2-dikloroetanu (5 ml) dodajamo reakcijski mešanici pri 0°C, saj je reakcija eksotermna. Nastalo zmes segrejemo na sobno temperaturo. Po končani reakciji (potek reakcije smo spremljali s tankoplastno kromatografijo v mobilni fazi etilacetat : cikloheksan : ocetna kislina = 50 : 50 : 1) reakcijsko zmes zlijemo na mješanico ledu in vode ter mešamo dodatno uro. Nato ločimo organsko in vodno fazo ter slednjo spiramo z 1,2-dikloroetanom (2 x 15 ml). Združene organske faze speremo z 10% raztopino NaHCO₃ (2 x 15 ml) in nasičeno raztopino NaCl (3 x 15 ml) ter jih sušimo nad Na₂SO₄. Topilo odparimo na rotavaporju in produkt očistimo s kolonsko kromatografijo (uporabljeni mobilni fazi je etilacetat : heksan = 1 : 1).

7-metoksi-4-okso-4H-kromen-3-karbaldehid (7)	
Izgled	Rjavi kristali
Rf (MF)	0,37 (etilacetat/heksan=1/3)
Izkoristek	76,8 %
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ(ppm) = 3,96 (s, 3H, OCH ₃); 6,94 (d, 1H, J = 2,4 Hz, Ar-H); 7,08 (dd, 1H, J ₁ = 2,4 Hz, J ₂ = 8,9 Hz, Ar-H); 8,22 (d, 1H, J = 8,9 Hz, Ar-H); 8,50 (s, 1H, 2-H); 10,40 (s, 1H, CHO) Izmerjeni spekter se ujema s podatki v literaturi (27)
T tališča	170-174 °C

Sinteza spojina 8 [6,7-dimetoksi-4-okso-4H-kromen-3-karbaldehid]

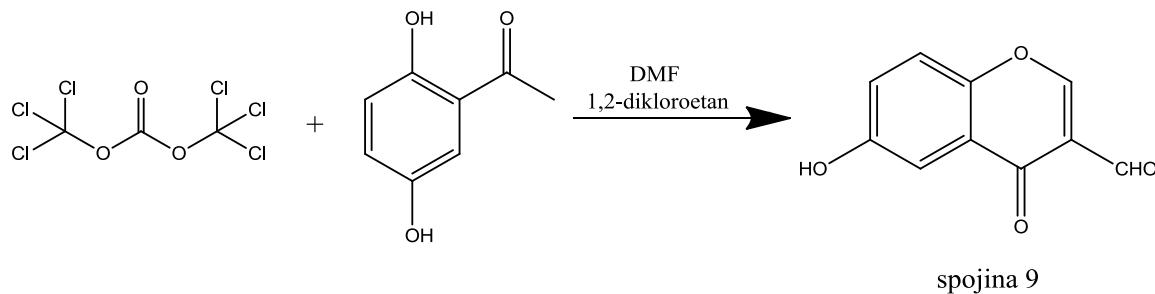
spojina 8

Vse spodaj naštete postopke izvajamo pod brezvodnimi pogoji v argonovi atmosferi. Trifosgen (2 g; 6,73 mmol) raztopimo v 1,2-dikloroetanu (10,00 ml) ter dobljeno raztopino po kapljicah dodajamo v zmes DMF/1,2-dikloroetan (3 ml / 5 ml) na ledu. Mešamo 20 minut, nato ledeno kopel odstranimo. Pustimo, da se segreje do sobne temperature in mešamo še eno uro da nastane Vilsmeierjev reagent.

2-hidroksi-4,5-dimetoksiacetofenon (0,67 g; 3,4 mmol) v 1,2-dikloroetanu (8 ml) dodajamo reakcijski mešanici pri 0°C, saj je reakcija eksotermna. Nastalo zmes segrejemo na sobno temperaturo. Po končani reakciji (potek reakcije smo spremljali s tankoplastno kromatografijo v mobilni fazi etilacetat : heksan = 1 : 2) reakcijsko zmes zlijemo na mešanico ledu in vode ter mešamo še eno uro. Nato ločimo organsko in vodno fazo ter slednjo spiramo z 1,2-dikloroetanom (2 x 15 ml). Združene organske faze speremo z 10% raztopino NaHCO₃ (2 x 15 ml) in nasičeno raztopino NaCl (3 x 15 ml) ter jih sušimo nad Na₂SO₄. Topilo odparimo pod znižanim tlakom in produkt očistimo s kolonsko kromatografijo (uporabljeni mobilni faza je etilacetat : heksan = 1 : 2).

6,7-dimetoksi-4-okso-4H-kromen-3-karbaldehid (8)	
Izgled	Rumeno-rjavi kristali
Rf (MF)	0,23 (etilacetat/heksan=1/2)
Izkoristek	8,8 %
¹H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ(ppm) = 4,02 (s, 6H, 2 x OCH ₃); 6,96 (s, 1H, Ar-H); 7,62 (s, 1H, Ar-H); 10,42 (s, 1H, CHO)
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₂ H ₁₀ O ₅ (m/z): 235,0606 [M+H] ⁺ ; izmerjena vrednost (m/z): 235,0612
T tališča	103-105 °C

Sinteza spojine 9 [6-hidroksi-4-okso-4H-kromen-3-karbaldehid]

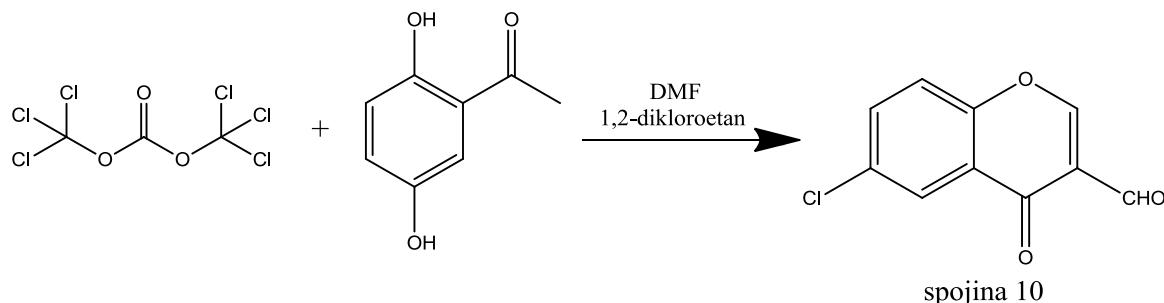


Vse spodaj naštete postopke izvajamo pod brezvodnimi pogoji v argonovi atmosferi. Trifosgen (2 g; 6,73 mmol) raztopimo v 1,2-dikloroetanu (10 ml) ter dobljeno raztopino po kapljicah dodajamo v zmes DMF/1,2-dikloroetan (3 ml / 5 ml) na ledu. Mešamo 20 minut, nato ledeno kopel odstranimo. Pustimo, da se segreje do sobne temperature in mešamo še eno uro da nastane Vilsmeierjev reagent.

2,5-dihidroksiacetofenon (0,52 g; 3,76 mmol) v 1,2-dikloroetanu (8,5 ml) dodajamo reakcijski mešanici pri 0°C, saj je reakcija eksotermna. Nastalo zmes segrejemo na sobno temperaturo. Po dveh urah smo reakcijo ustavili (potek reakcije smo spremljali s tankoplastno kromatografijo v dveh različnih mobilnih fazah etilacetat : heksan = 1 : 1 in etilacetat : cikloheksan : ocetna kislina = 50 : 50 : 1), tako, da smo reakcijsko zmes zlili na mešanico ledu in vode ter mešali dodatno uro in pol. Nato ločimo organsko in vodno fazo ter organski fazi odparimo topilo pod znižanim tlakom. Surov produkt raztopimo v čim manjši količini diklorometana ter dodamo zmes etra in petroletra, ob čemer se produkt izobori.

6-hidroksi-4-okso-4H-kromen-3-karbaldehid (9)	
Izgled	Rjavi kristali
Rf (MF)	0,34 (etilacetat/heksan=2/1)
Izkoristek	14,2 %
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ(ppm) = 7,49-7,63 (m, 3H, Ar-H); 8,37 (s, 1H, C=C-H); 10,41 (s, 1H, CHO)
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₀ H ₆ O ₄ (m/z): 191,0344 [M+H] ⁺ ; izmerjena vrednost (m/z): 191,0341
T tališča	224-229 °C

Sinteza spojine 10 [6-kloro-4-okso-4H-kromen-3-karbaldehid]

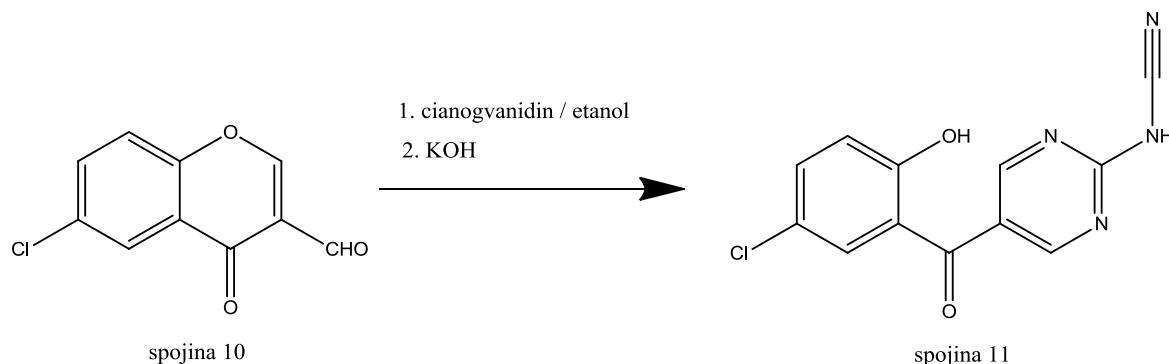


Vse spodaj naštete postopke izvajamo pod brezvodnimi pogoji v argonovi atmosferi. Trifosgen (2 g; 6,73 mmol) raztopimo v 1,2-dikloroetanu (10 ml) ter dobljeno raztopino po kapljicah dodajamo v zmes DMF/1,2-dikloroetan (3 ml / 5 ml) na ledu. Mešamo 20 minut, nato ledeno kopel odstranimo. Pustimo, da se segreje do sobne temperature in mešamo še eno uro da nastane Vilsmeierjev reagent.

2-hidroksi-5-kloroacetofenon (0,59 g; 3,77 mmol) v 1,2-dikloroetanu (8,5 ml) dodajamo reakcijski mešanici pri 0°C, saj je reakcija eksotermna. Nastalo zmes segrejemo na sobno temperaturo. Po dveh urah reakcijo ustavimo (potek reakcije smo spremljali s tankoplastno kromatografijo v mobilni fazi etilacetat : heksan = 1 : 1) tako, da reakcijsko zmes zlijemo na mešanico ledu in vode ter mešamo dodatno uro in pol. Nato ločimo organsko in vodno fazo ter vodno fazo spiramo z diklorometanom (2 x 15 ml), organsko fazo posušimo nad Na₂SO₄, odfiltriramo soli in odparimo topilo pod znižanim tlakom. Surov produkt raztopimo v malem volumnu diklorometana ter dodamo zmes etra in petroletra, ob čemer se produkt izobori.

6-kloro-4-okso-4H-kromen-3-karbaldehid (10)	
Izgled	Rumeni kristali
Rf (MF)	0,47 (etilacetat/heksan=2/1)
Izkoristek	49,1 %
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ(ppm) = 7,86 (d, 1H, J=8,8 Hz, Ar-H); 7,96 (dd, 1H, J ₁ =2,8 Hz, J ₂ =8,8 Hz, Ar-H); 8,09 (d, 1H, J=2,4 Hz, Ar-H); 8,98 (s, 1H, C=C-H); 10,11 (s, 1H, CHO)
T tališča	165-168 °C

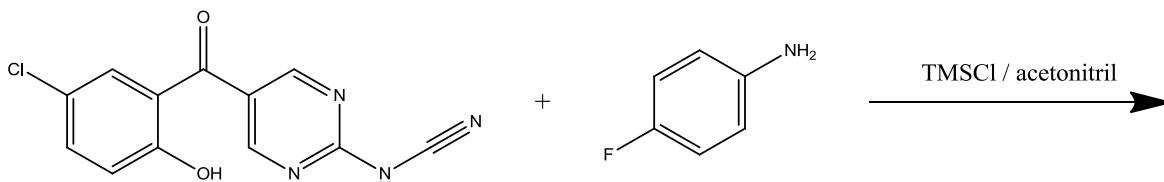
Sinteza spojine 11 [N-(5-(5-kloro-2-hidroksibenzoil)pirimidin-2-il)cianamid]



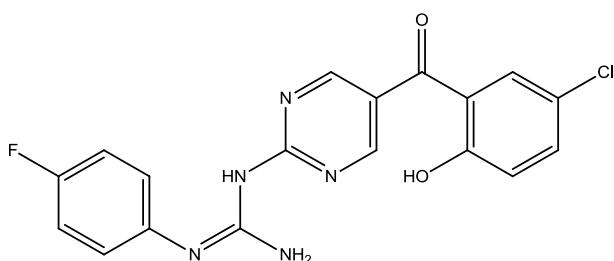
Vse spodaj naštete postopke izvajamo pod brezvodnimi pogoji v argonovi atmosferi. Spojino **10** (0,39 g; 1,85 mmol) in cianogvanidin (0,23 g; 2,78 mmol) raztopimo v brezvodnem etanolu (20 ml), nato pa k reakcijski zmes dodamo še uprašen KOH (0,312 g; 5,27 mmol) in pod refluxom segrevamo štiri ure. Po končani reakciji zmes ohladimo na sobno temperaturo ter jo zlijemo na led. Dodamo acetno kislino za nevtralizacijo KOH ter pustimo mešati čez noč. Ker se nam po nakisanju produkt ne obori, surov produkt očistimo s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc : MeOH = 5 : 1).

N-(5-(5-kloro-2-hidroksibenzoil)pirimidin-2-il)cianamid (11)	
Izgled	Rumeni kristali
Rf (MF)	0,36 (etilacetat/metanol=5/1)
Izkoristek	48,0 %
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3)	$\delta(\text{ppm}) = 7,10$ (d, 1H, $J=8,8$ Hz, Ar-H); 7,53 (dd, 1H, $J_1=2,8$ Hz, $J_2=8,8$ Hz, Ar-H); 8,0 (d, 1H, $J=2,4$ Hz, Ar-H); 8,35 (s, 2H, 2 x pirimidin-H); 2H od OH in NH se izmenjata.
ESI-HRMS	Izračunano za $\text{C}_{12}\text{H}_7\text{ClN}_4\text{O}_2$ (m/z): 273,0179 $[\text{M}+\text{H}]^+$; izmerjena vrednost (m/z): 273,0173
T tališča	284-285 °C
HPLC	$t_{\text{R}}=16,51$ min; 98,8 % čistost

Sinteza spojine 12 [1-(5-(5-kloro-2-hidroksibenzoil)pirimidin-2-il)-2-(4-fluorofenil)gvanidin]



spojina 11

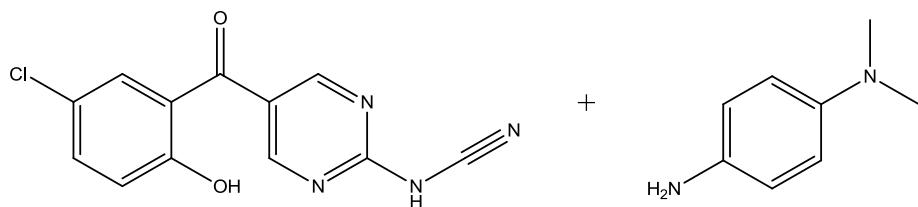


spojina 12

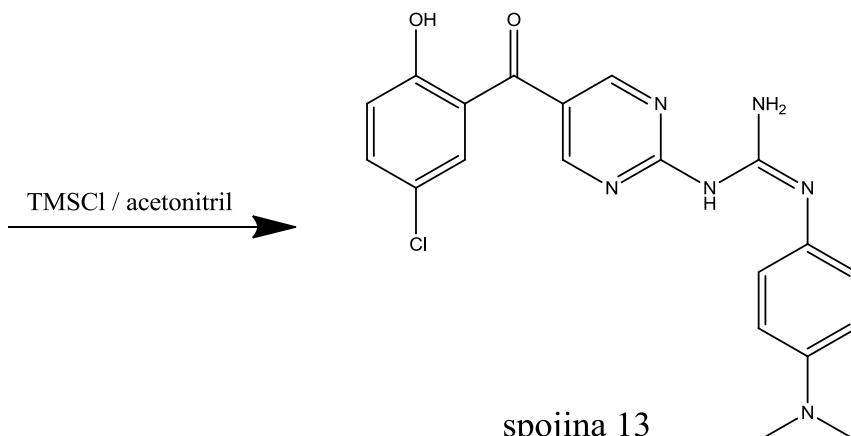
V vialo za mikrovalovni reaktor zatehtamo spojino **11** (0,105 g; 0,38 mmol) in 4-fluoroanilin (0,038 ml; 0,40 mmol) ter ju raztopimo v acetonitrilu (4,5 ml). Nato dodamo TMSCl (0,107 ml; 0,84 mmol) in izvedemo reakcijo s pomočjo mikrovalov v mikrovalovnem reaktorju, kjer mešamo 20 minut pri 120°C, nato pa za prekinitev reakcije dodamo izopropanol (0,07 ml). Surov produkt očistimo s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc : MeOH = 5 : 1).

1-(5-(5-kloro-2-hidroksibenzoil)pirimidin-2-il)-2-(4-fluorofenil)gvanidin (12)	
Izgled	Rjavi kristali
Rf (MF)	0,50 (etilacetat/metanol=5/1)
Izkoristek	35,5%
¹H NMR (400 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆)	δ (ppm) = 7,00 (d, 1H, <i>J</i> =8,8 Hz, Ar-H); 7,15-7,21 (m, 2H, Ar-H); 7,39 (d, 1H, <i>J</i> =2,7 Hz, Ar-H); 7,46 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ =2,8 Hz, <i>J</i> ₂ =8,8 Hz, A-H); 7,54 (m, 2H, Ar-H); 8,04 (bs; 1H, NH); 8,72 (s, 2H, 2 x pirimidin-H); 9,90 (bs; 2H, NH ₂)
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₈ H ₁₃ ClFN ₅ O ₂ (m/z): 386.0820 [M+H] ⁺ ; izmerjena vrednost (m/z): 386.0810
T tališča	125-130 °C
HPLC	t _R =16,52 min; 97,2 % čistost

Sinteza spojine 13 [1-(5-(5-kloro-2-hidroksibenzoil)pirimidin-2-il)-2-(4-(dimetilamino)fenil)gvanidin]



spojina 11

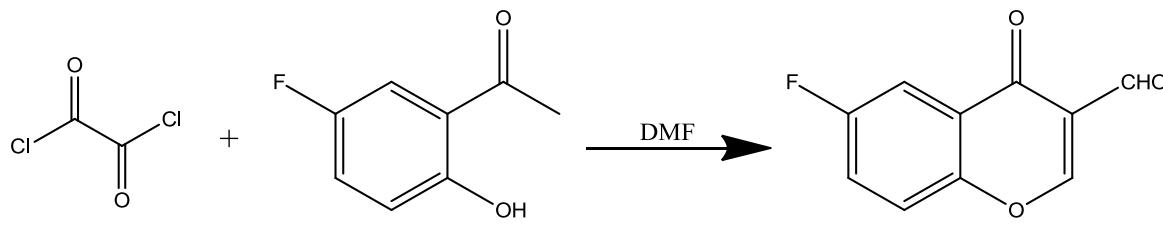


spojina 13

V vialo za mikrovalovni reaktor zatehtamo spojino **11** (0,130 g; 0,47 mmol) in *N,N*-dimetilbenzen-1,4-dimetil (0,067 g; 0,49 mmol) ter ju raztopimo v acetonitrilu (4,5 ml). Nato dodamo TMSCl (0,133 ml; 1,04 mmol) in izvedemo reakcijo s pomočjo mikrovalov v mikrovalovnem reaktorju, kjer mešamo 20 minut pri 120 °C, nato pa za prekinitve reakcije dodamo izopropanol (0,07 ml). Surov produkt očistimo s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc : MeOH = 5 : 1).

1-(5-(5-kloro-2-hidroksibenzoil)pirimidin-2-il)-2-(4-(dimetilamino)fenil)gvanidin (13)	
Izgled	Rumeno-rjavi kristali
Rf (MF)	0,15 (etilacetat/metanol=5/1)
Izkoristek	15,5 %
¹H NMR (400 MHz; aceton- <i>d</i> ₆)	δ(ppm) = 2,97 (s, 6H, 2 x CH ₃); 6,78-6,81 (m, 2H, Ar-H); 7,11 (d, 1H, <i>J</i> =8,8 Hz, Ar-H); 7,26 (d, 2H, <i>J</i> =2,6 Hz, Ar-H); 7,54 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ =2,6 Hz, <i>J</i> ₂ =8,8 Hz, Ar-H,); 7,68 (d, 1H, Ar-H, <i>J</i> =2,7 Hz); 8,86 (s, 2H, 2 x pirimidin-H) 4H (gvanidinski in fenolni H) so izmenjani.
ESI-HRMS	Izračunano za C ₂₀ H ₁₉ ClN ₆ O ₂ (m/z): 411.1336 [M+H] ⁺ ; izmerjena vrednost (m/z): 411.1331
T tališča	211-214 °C
HPLC	t _R =16,50 min; 98,3 % čistost

Sinteza spojine 14 [6-fluoro-4-okso-4H-kromen-3-karbaldehid]

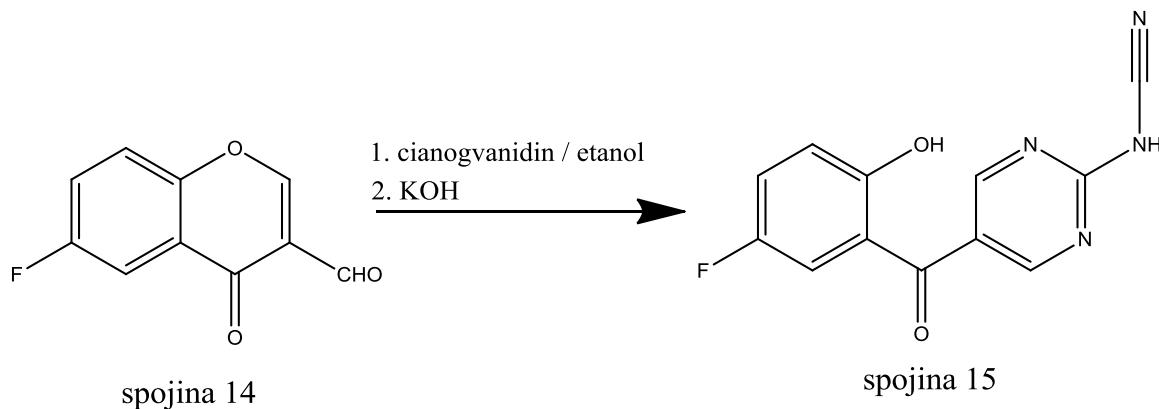


spojina 14

Oksalil klorid (8,29 ml; 97,3 mmol) počasi dodamo v dobro ohlajeno zmes DMF (7,5 ml; 97,3 mmol) in 2-hidroksi-5-fluoroacetofenon (3,0 g; 19,5 mmol) ($T=0\text{--}5\text{ }^\circ\text{C}$) ob mešanju. Pri $0\text{ }^\circ\text{C}$ mešamo še 30 minut. Nato odstranimo ledeno kopel in reakcijsko zmes pri sobni temperaturi mešamo 12 ur. Po dvanajstih urah reakcijsko zmes med mešanjem zlijemo na zdrobljen led in ločimo fazi. Vodno fazo speremo s kloroformom (2 x 30 ml). Združene organske faze posušimo nad Na_2SO_4 , odfiltriramo soli in delno uparimo topila. V koncentrirano organsko fazo nakapljam eter, pri čemer se oborijo vijoličasto-rjavi kristali.

6-fluoro-4-okso-4H-kromen-3-karbaldehid (14)	
Izgled	Vijolično-rjavi kristali
Rf (MF)	0,46 (etilacetat/heksan=2/1)
Izkoristek	21,0 %
¹ H NMR (400 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆)	$\delta(\text{ppm}) = 7,83$ (m, 2H, Ar-H); 7,90 (dd, 1H, $J_1=4,3$ Hz, $J_2=9,1$ Hz, Ar-H); 8,97 (s, 1H, C=C-H), 10,12 (s, 1H, CHO)
ESI-HRMS	Izračunano za $\text{C}_{10}\text{H}_5\text{O}_3$ (m/z): 193,0301 [M+H] ⁺ ; izmerjena vrednost (m/z): 193,0298
T tališča	154-158 °C

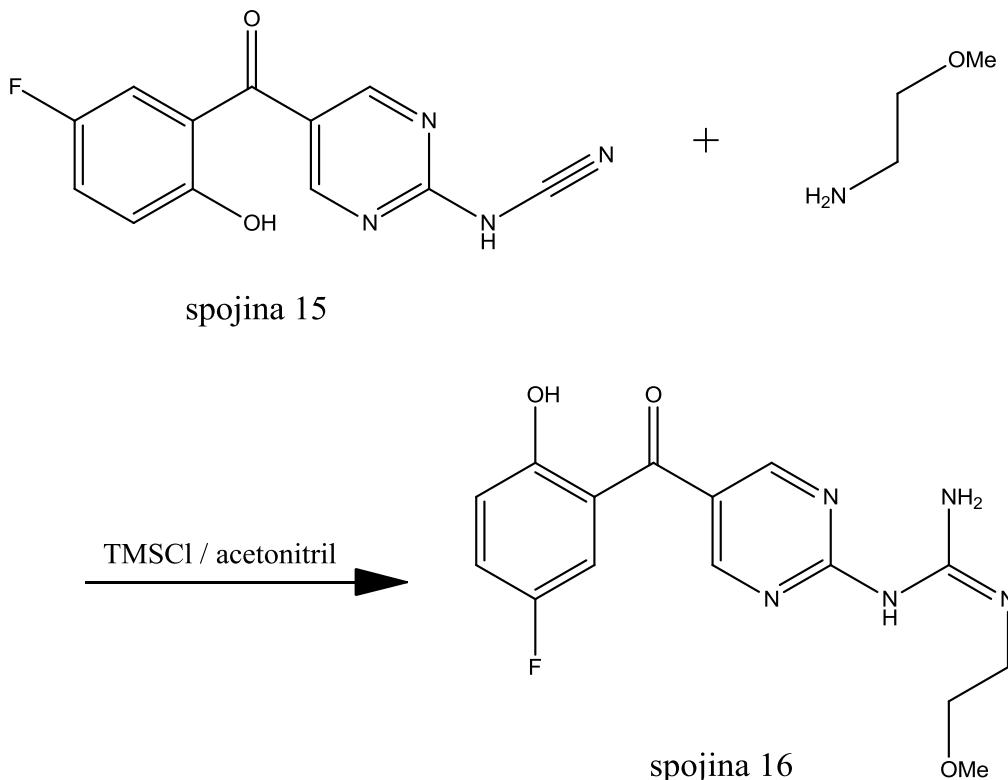
Sinteza spojine 15 [N-(5-(5-fluoro-2-hidroksibenzoil)pirimidin-2-il)cianamid]



V vialo za mikrovalovni reaktor zatehtamo spojino **14** (0,775 g; 4,08 mmol), cianogvanidin (0,512 g; 6,11 mmol) in KOH (0,688 g; 11,6 mmol) in dodamo brezvodni etanol (4 ml). V mikrovalovnem reaktorju segrevamo 20 minut pri 120°C (50W). Po 20 minutah reakcijsko zmes zlijemo na led in med mešanjem dodajamo ocetno kislino (do pH=4,5), pri tem začne izpadati oborina, to pa odfiltriramo.

N-(5-(5-fluoro-2-hidroksibenzoil)pirimidin-2-il)cianamid (15)	
Izgled	Svetlo-rjavi kristali
Rf (MF)	0,15 (etilacetat/metanol=10/1)
Izkoristek	61,0 %
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)	$\delta(\text{ppm}) = 6,98$ (dd, 1H, $J_1=4,1$ Hz, $J_2=8,6$ Hz, Ar-H), 7,21 (m, 1H, Ar-H), 7,30 (m, 1H, Ar-H), 8,68 (s, 2H, 2x[N=C-H]), 10,30 (s, 1H, OH)
ESI-HRMS	Izračunano za $\text{C}_{12}\text{H}_7\text{FN}_4\text{O}_2$ (m/z): 257,0475 [M+H] ⁺ ; izmerjena vrednost (m/z): 257,0471
T tališča	232-235 °C
HPLC	$t_{\text{R}}=13,66$ min; 95,2 % čistost

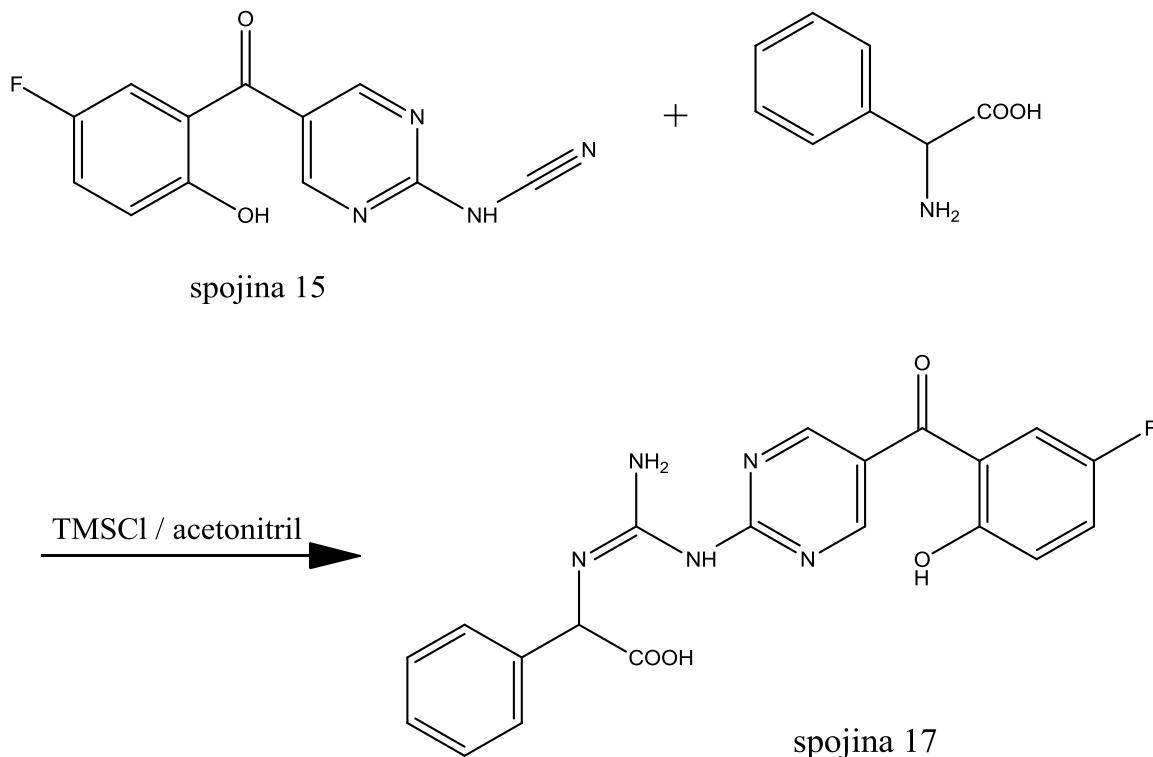
Sinteza spojine 16 [1-(5-(5-fluoro-2-hidroksibenzoil)pirimidin-2-il)-2-(2-metoksietyl)gvanidin]



V vialo za mikrovalovni reaktor zatehtamo spojino **15** (0,250 g; 0,97 mmol) in 2-metoksietylamin (0,182 g; 2,42 mmol) ter ju raztopimo v acetonitrilu (4,5 ml). Nato dodamo TMSCl (0,272 ml; 2,13 mmol) ter izvedemo reakcijo s pomočjo mikrovalov. V mikrovalovnem reaktorju segrevamo 20 minut pri 120°C, nato pa za prekinitve reakcije dodamo izopropanol (0,12 ml). Surov produkt očistimo s kolonsko kromatografijo, mobilna faza je gradient etilacetat/metanol od 10/1 proti 5/1.

(5-(5-fluoro-2-hidroksibenzoil)pirimidin-2-il)-2-(2-metoksietil)gvanidin (16)	
Izgled	Sivo - beli kristali
Rf (MF)	0,21 (etilacetat / metanol = 3 / 1)
Izkoristek	20,3 %
¹H NMR (400 MHz, aceton)	δ (ppm) = 3,42 (s, 3H, OCH ₃); 3,50-3,56 (m, 2H, N-CH ₂); 3,57-3,63 (m, 2H, O-CH ₂); 6,96-7,02 (m, 1H, Ar-H); 7,25-7,29 (m, 2H, Ar-H); 8,80 (s, 2H, 2 x pirimidin-H). 4H (<i>gvanidinski in fenolni H</i>) so izmenjani.
¹H NMR (400 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 3,23 (s, 3H, OCH ₃); 3,46 – 3,52(m, 4H, 2 x CH ₂); 6,05 (s, 1H, gvanidin-H); 6,92 (bs, 1H, gvanidin-H); 7,05 (d, 1H, J =2,4 Hz, Ar-H); 7,17 (d, 1H, J =8,4 Hz, Ar-H); 7,27 (d, 1H, J =8,4 Hz, Ar-H,); 8,00 (bs, 1H, gvanidin-H); 8,66 (s, 2H, 2 x pirimidin-H); 10,26 (bs, 1H, OH)
¹³C NMR (400 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 40,7 (CH ₂); 58,0 (CH ₃); 70,9 (O-CH ₂); 115,5 (d, $^2J_{C,F}$ =23,9 Hz, CH); 117,9 (d, $^3J_{C,F}$ =7,5 Hz, CH); 119,3 (d, $^2J_{C,F}$ =22,4 Hz, CH); 120,3 (pirimidin-C); 120,6 (C) 125,9 (d, $^3J_{C,F}$ =6,2 Hz, C); 151,9 (pirimidin-CH); 155,1 (d, $^1J_{C,F}$ =235,8 Hz, C); 159,1 (gvandin-C); 167,2 (pirimidin-C); 190,7 (C=O)
ESI- HRMS	Izračunano za C ₁₅ H ₁₆ FN ₅ O ₃ (m/z): 334,1315 [M+H] ⁺ ; izmerjena vrednost (m/z): 334,1319
T tališča	153-158 °C
HPLC	t _R =14,12 min; 97,5 % čistost

Sinteza spojine 17 [2-((amino((5-(5-fluoro-2-hidroksibenzoil)pirimidin-2-il)amino)methilen)amino)-2-fenilacetna kislina]



Najprej izvedemo pretvorbo 2-fenilglicina v prosto obliko (reagent je v obliki soli). To storimo tako, da 1,5 g reagenta suspendiramo v diklorometanu (20 ml), nato pa organsko fazo spiramo z 0,1M NaOH (2 x 15 ml) in nasičeno raztopino NaCl (1 x 15 ml). Organsko fazo nato posušimo nad Na₂SO₄, odfiltriramo soli ter uparimo topilo. Zaostane nam brezbarvno olje.

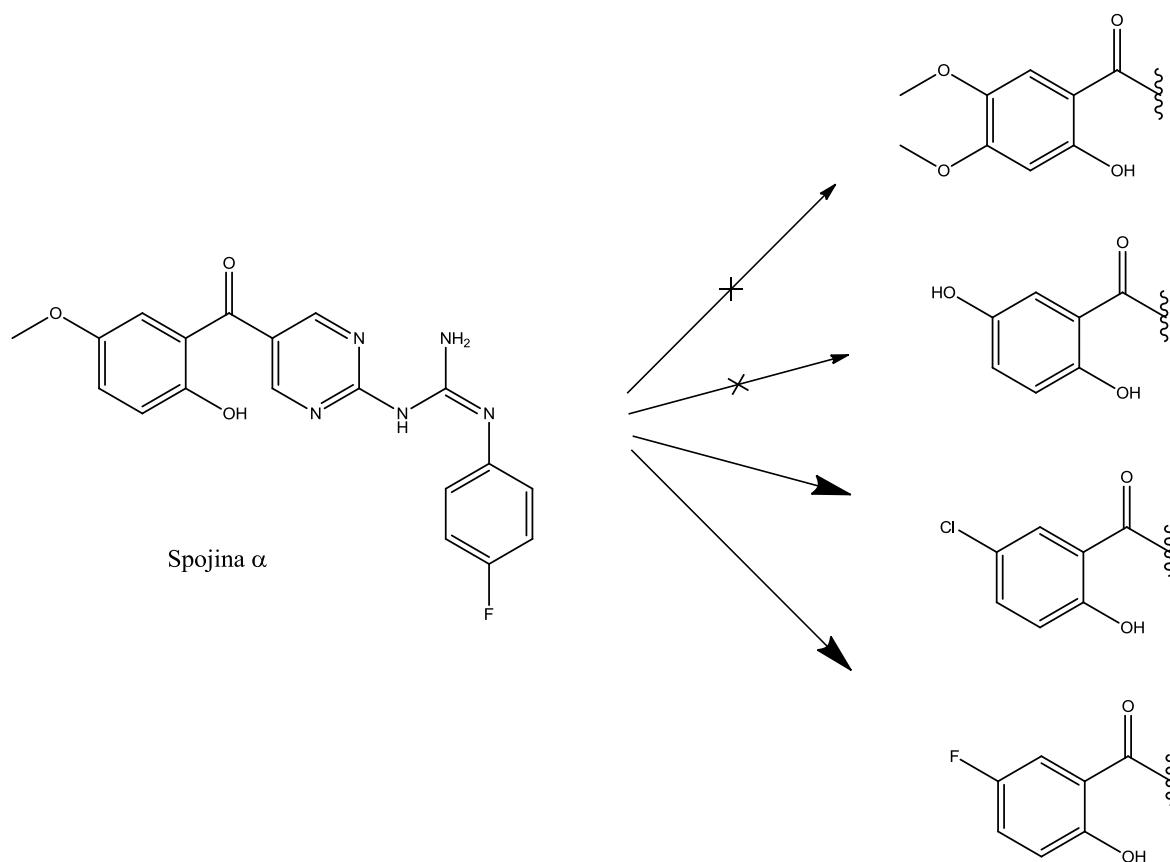
V vialo za mikrovalovni reaktor zatehtamo spojino **15** (0,350 g; 1,36 mmol) in prosti 2-fenilglicin (0,514 g; 3,40 mmol) ter ju raztopimo v acetonitrilu (4,5 ml). Nato dodamo TMSCl (0,622 ml; 4,87 mmol) ter izvedemo reakcijo s pomočjo mikrovalov, segrevamo v mikrovalovnem reaktorju 20 minut pri 120°C, nato pa za prekinitev reakcije dodamo izopropanol (0,15 ml). Surov produkt očistimo s kolonsko kromatografijo, mobilna faza je gradient etilacetat/metanol od 10/1 proti 5/1. Nastali so številni stranski produkti. Morebitnega produkta nismo mogli očistiti, zato smo reakcijsko zmes zavrgli.

5. Rezultati in razprava

5. 1. Komentar strukturnih sprememb izbranih analogov spojine α

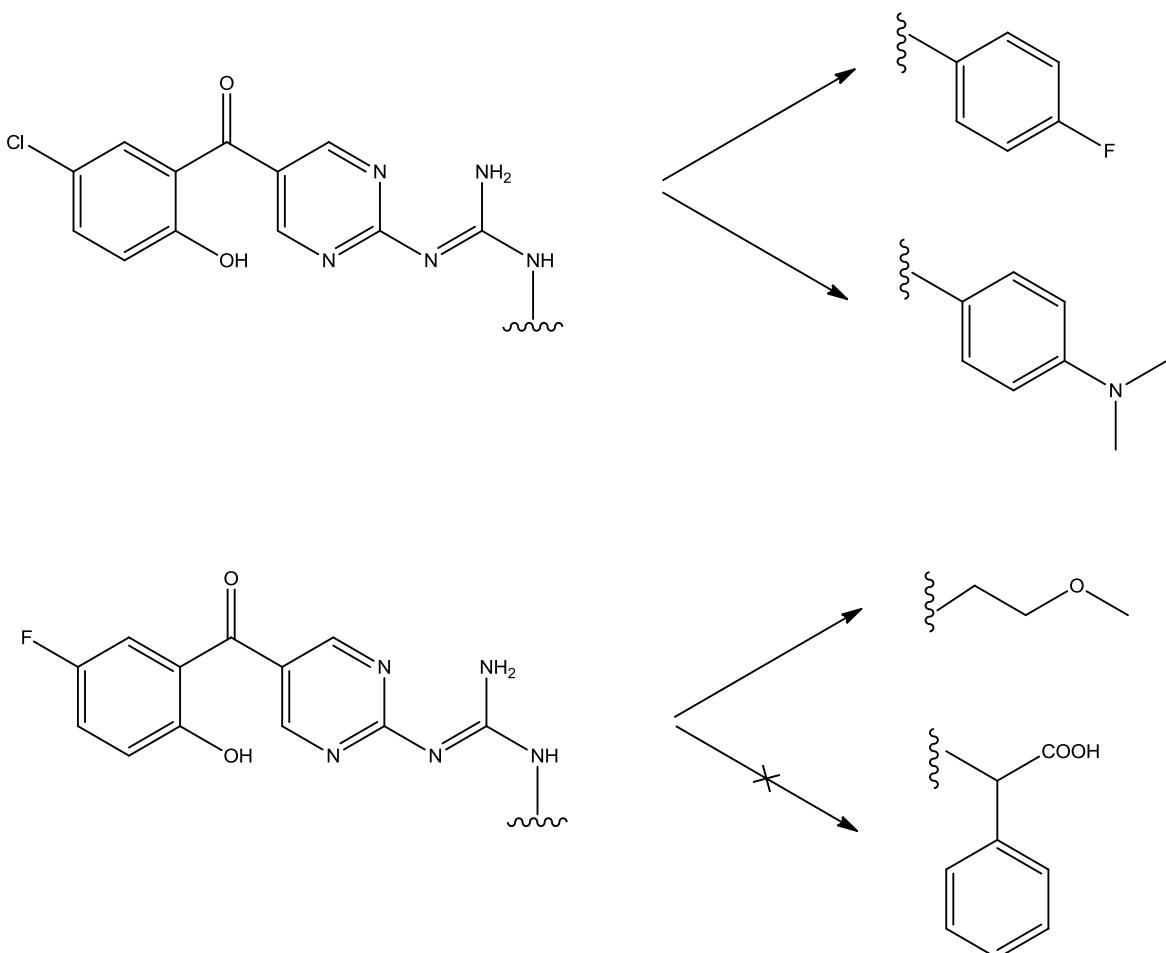
Sinteza spojine α žal ni uspela, smo pa izvedli sinteze nekaj njenih analogov. Pri tem smo spremenjali določene strukturne fragmente in s tem vplivali na velikost molekule, njeni lipofilnost in elektronske efekte. Z biološkim testiranjem smo nato preverili, kakšen vpliv je imela vsaka od modifikacij na aktivnost spojin.

Sinteza s 4,5-dimetoksi in 5-hidroksi substituiranim 2-hidroksiacetofenonom ni uspela, zato vpliva uvajanja dodatne metoksi oziroma zamenjave v hidroksilno skupino nismo mogli opredeliti. Nato smo 5-metoksi skupino zamenjali s halogenom (klor in fluor) (slika 13) in na ta način preverili, če je 5-metoksi skupina ključna za delovanje in kakšen vpliv imata klor in fluor.



Slika 13: Prikaz strukturnih modifikacij na benzoilnem obroču

Ker so bile spojine tega tipa slabše topne – z uvajanjem Cl/F smo namreč povečali lipofilnost – smo preko gvanidinskega dela uvajali bolj polarne substituente 2-metoksiet-1-il in aminokislino fenilglicin (slika 14). Z uvajanjem alkilne verige na gvanidinski del smo lahko ovrednotili vpliv aromatskega obroča na tem delu molekule na njeni aktivnosti.

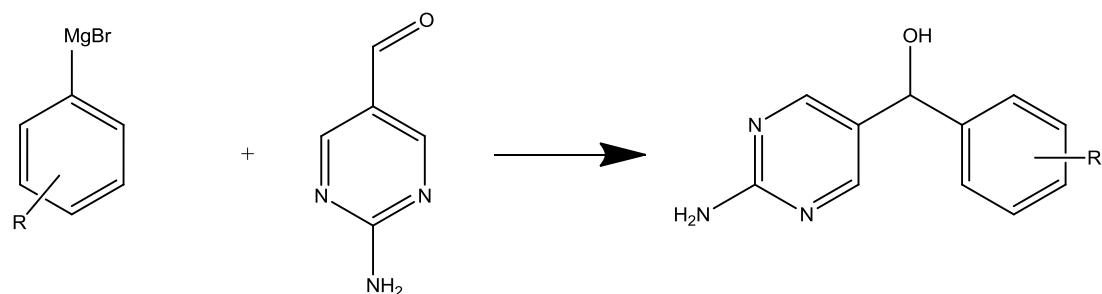


Slika 14: Prikaz strukturnih modifikacij na gvanidinskem delu molekule

5.2. Komentar sinteznih postopkov

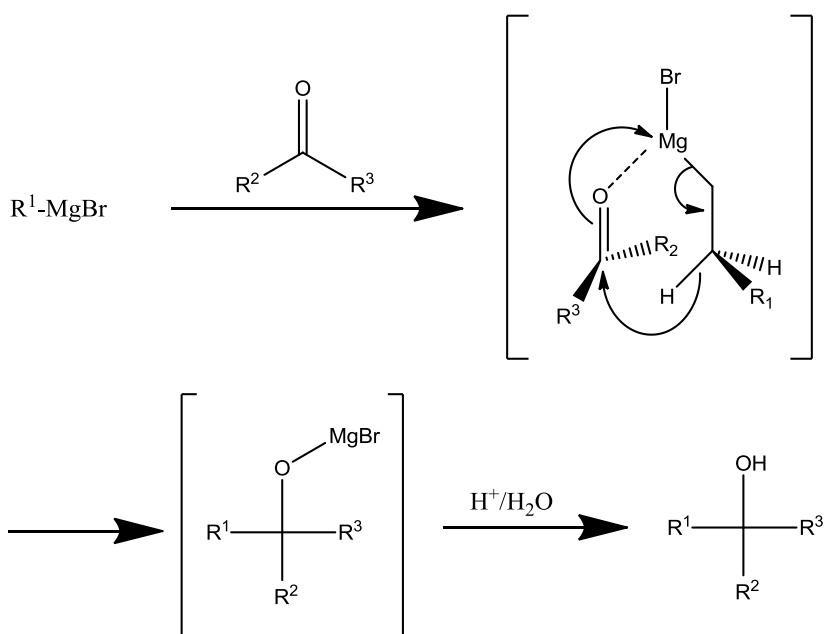
Najprej smo ponovili sintezo že znanega TLR4 antagonista (spojina 3). V prvem koraku smo sintetizirali ustrezeno substituirani pirazolni fragment, ki ima na mestu 4 preko metilenskega mostička pripet amin. Tovrstni fragment smo dobili v reakciji, podobni Mannichovi, pri čemer je paraformaldehid vir ogljika. Amin na mestu 4 v naslednji stopnji kot nukleofil reagira z zelo reaktivnim oksiranskim obročem, pri čemer se slednji odpre in dobimo β -amino alkohol.

Temu je sledila sinteza spojine α (spojina, odkrita z virtualnim rešetanjem) in njenih analogov. V literaturi je opisanih več različnih sinteznih pristopov za pridobivanje tovrstnih spojin, za najboljšega pa se je izkazala tristopenjska sinteza, pri kateri izhajamo iz ustrezeno substituiranega 2-hidroksiacetofenona. Pred tem smo se poslužili več različnih sinteznih pristopov, ki pa se pri našem delu niso obnesli. Končno strukturo smo želeli sprva zgraditi tako, da bi na sintetizirani 2-amino-4-piridinkarbaldehid preko (hidroksi)metilenskega mostička pripeli drug aromatski obroč. Novo C-C vez bi tvorili z uporabo t. i. Grignardovih reagentov (aryl- ali alkil-magnezijevi halidi) (slika 15). Temu bi sledila tvorba ustrezeno substituiranega gvanidinskega dela in oksidacija hidroksilne skupine na metilenskem mostičku do karbonilne.



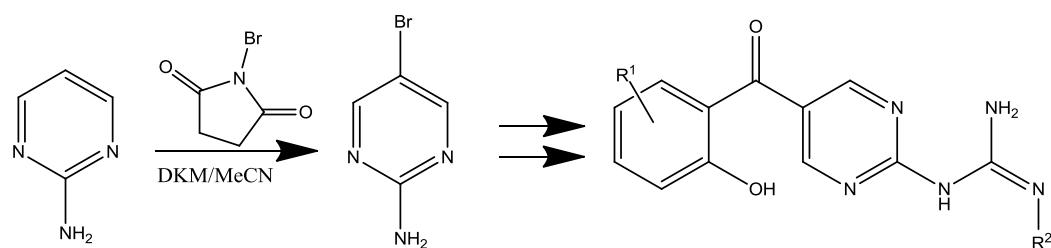
Slika 15: Shema reakcije z Grignardovimi reagenti

Grignardovi reagenti se obnašajo kot nukleofili, ki reagirajo z elektrofilnim ogljikovim atomom karbonilne skupine (slika 16), nastali kompleks pa se ob prisotnosti protona in/ali vode pretvori v alkohol (25).



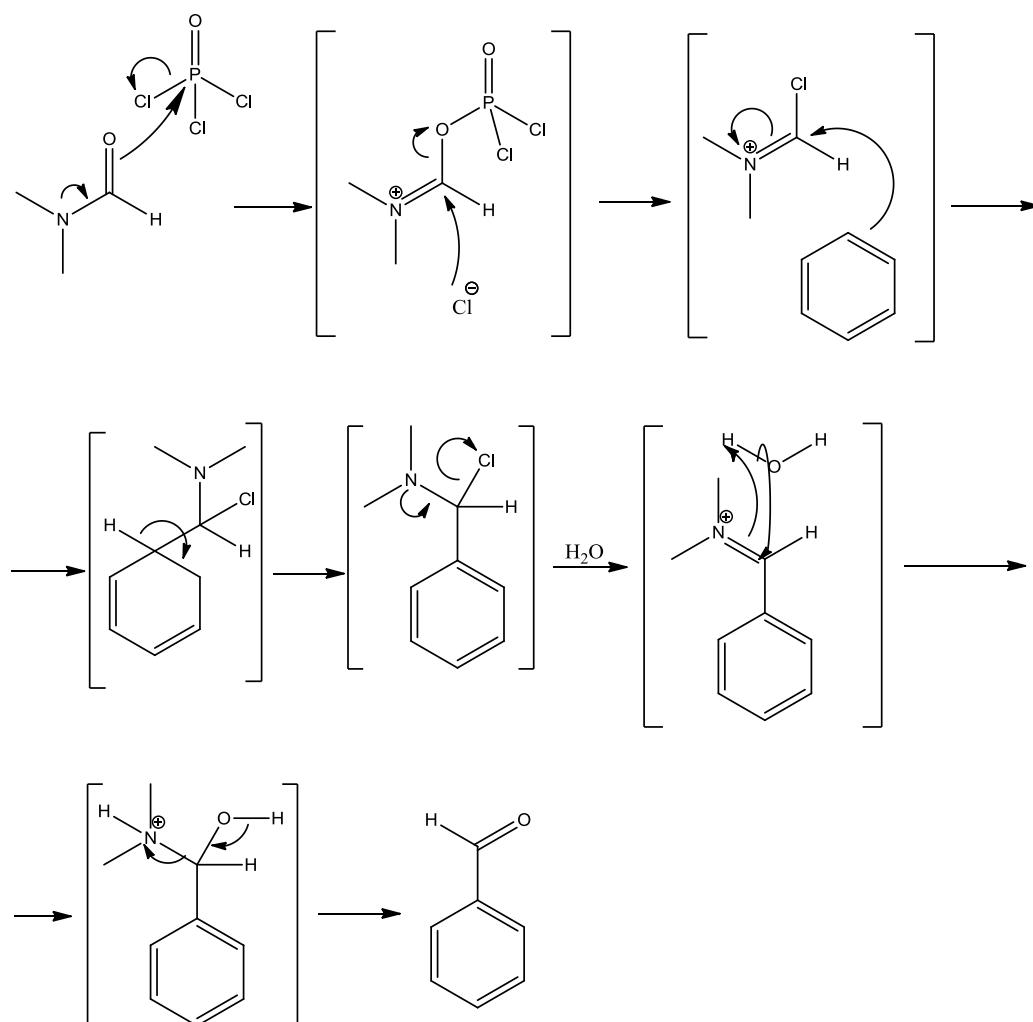
Slika 16: Mehanizem reakcije z Grignardovimi reagenti [povzeto po (25)]

Nato smo želeli tvoriti Grignardov reagent na 2-aminopirimidinskem obroču. Na molekulo 2-aminopiridina smo uvedli brom na mesto 5 (slika 17). Reakcijo smo izvedli z *N*-bromosukcinimidom (NBS), ki služi kot vir bromata. V naslednji stopnji bi novonastali Grignardov reagent reagiral z ustrezno substituiranim benzaldehidom, oksidirali bi v reakciji tvorjen alkohol, nato pa bi naredili še gvanidinski fragment.



Slika 17: Možna shema sinteze analogov spojine a

Reakcija bromiranja je sicer potekla, a smo zaradi prejšnjih neuspešnih postopkov zamenjali sintezno pot. V nadalnjih reakcijah smo izhajali iz različno substituiranih 2-hidroksiacetofenonov, katere smo v tristopenjskem sinteznem postopku pretvorili v končne spojine – v spojino **a** in njene analoge. V prvi stopnji pretvorimo 2-hidroksiacetofenon v 3-formilkromon, pri čemer v reakciji med DMF in trifosogenom najprej pride do tvorbe Vilsmeierjevega reagenta (slika 18), šele nato pa v reakcijo dodamo 2-hidroksiacetofenon, s katerim Vilsmeierjev reagent reagira.



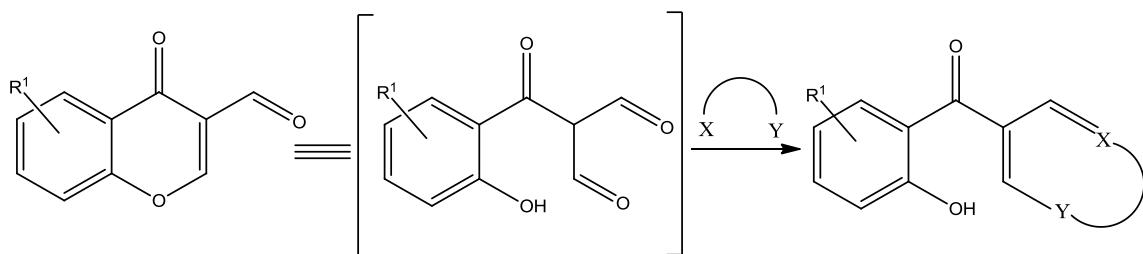
Slika 18: Mehanizem Vilsmeier-Haackove reakcije [povzeto po (26)]

Izvedena reakcija se malce razlikuje od klasične Vilsmeier-Haackove, saj namesto POCl_3 uporabimo BTC (bis(triklorometil)karbonat = trifosgen) v 1,2-dikloroetanu. Reakcija med amidom (DMF) in POCl_3 (ozioroma trifosgenom) privede do tvorbe elektrofilnega iminijevega kationa, ta pa nato reagira z aromatskim obročem v reakciji elektrofilne aromatske substitucije. Tekom reakcije nastane intermedijat iminijev ion, ki pa se ob nadaljnji hidrolizi pretvori v aril keton ozioroma aril aldehid (26, 27).

Reakcija dobro poteka tako z *ortho*-hidroksiacetofenoni z vezanimi elektron privlačnimi skupinami, kot tudi s tistimi, ki imajo vezane elektron-donorske skupine. Pokazalo pa se je, da reakcija teče precej slabo, kadar je na 4. ali 5. mestu o-hidroksiacetofenona metoksi skupina - razvidno tako iz literature kot tudi iz našega eksperimentalnega dela (to pojasni tudi neuspeh pri sintezi spojine **a**). Prav tako reakcija poteka s slabimi izkoristki, če je acetofenonskem skeletu prisotna več kot ena hidroksi skupina (kot na primer pri sintezi

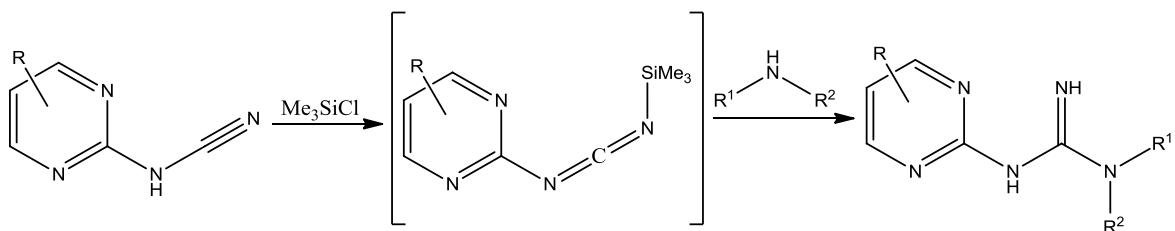
spojine 6). Razlog za to je, da prisotnost dodatnih hidroksi skupin precej zmanjša kislost metilenskega protona acetilne skupine, kar spremeni potek reakcije (spodbuja formilacijo obroča in polikondenzacijo intermediatov) (27).

V drugi reakcijski stopnji gre za pretvorbo 3-formilkromona v ustrezeno substituiran 2-(cianoamino)-5-saliciloil pirimidin. V reakciji pride do nukleofilnega napada amino skupine cianogvanidina na ogljikov atom na mestu 2 v 3-formilkromonu in do odprtja piran-4-on-skega obroča. Med drugo prosto amino skupino cianogvanidina in aldehidno karbonilno skupino poteče ciklokondenzacija (slika 19) (28, 29).



Slika 19: 3-formilkromona z dinukleofilom [povzeto po (28)]

V tretji stopnji pa poteče reakcija med ciano skupino produkta druge stopnje in amino skupino ustreznega reagenta. Me_3SiCl ne služi zgolj kot vir brezvodne HCl , ampak tudi aktivira ciano skupino (slika 20), na katero kasneje poteče nukleofilna adicija. V tej stopnji dobimo želen gvanidinski derivat (30).



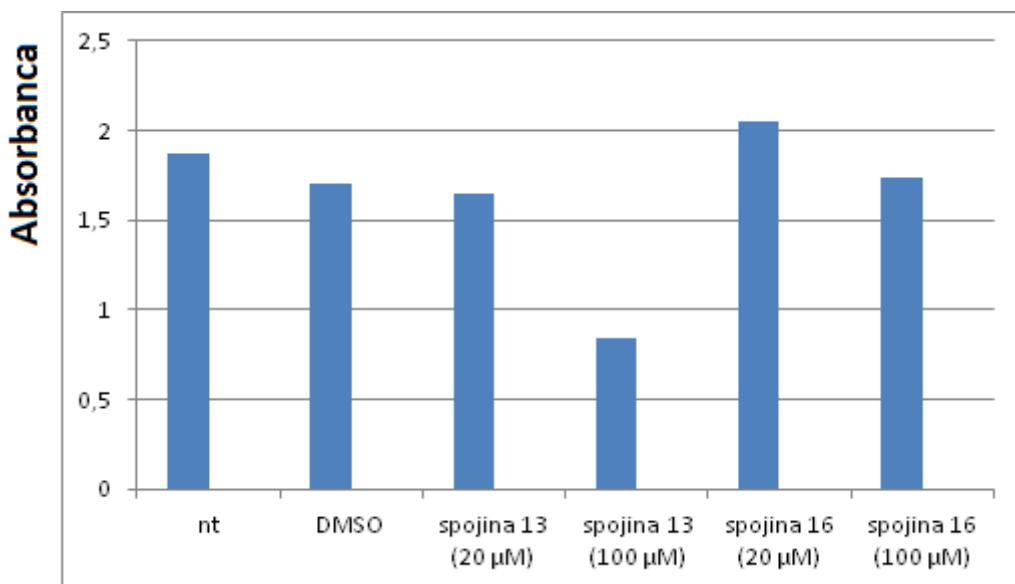
Slika 20: Mehanizem tretje stopnje reakcije [povzeto po (30)]

5.3. Rezultati *in vitro* testiranja in testiranja na celičnih kulturah

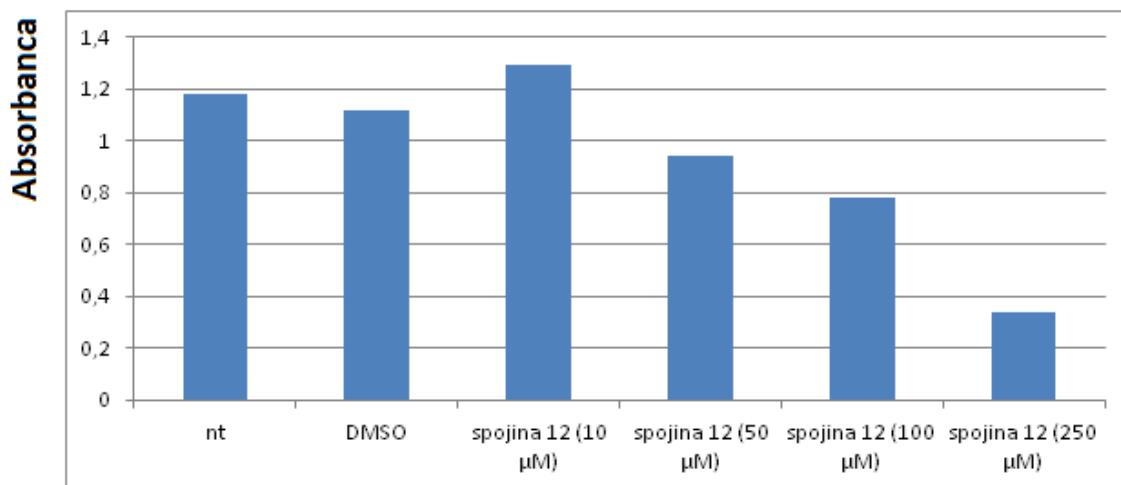
a) Preverjanje topnosti in citotoksičnosti

Spojine so bile različno dobro topne v mediju za celične kulture (RPMI 1640). Najmanj topna je bila spojina **12**, vendar je bila topnost pri nižjih koncentracijah vseeno zadostna za izvedbo nadaljnjih testov. Testirali smo citotoksičnost spojin na celični liniji HEK 293 tako, da smo dan po nacepljanju celic na gojišče dodali raztopino spojine v DMSO z določeno koncentracijo. Za negativno kontrolo smo uporabili DMSO. Celične kulture s spojinami oziroma brez njih smo inkubirali nadaljnih 24 ur, nato pa smo naredili MTS test – ta test je specifičen za žive celice. Uporabimo substrat, katerega celice metabolizirajo v produkt – tega pa mi spektrofotometrično določimo. Več, kot je celic živih in bolj kot so (metabolno) aktivne, več substrata se bo pretvorilo in izmerili bomo višji signal. Bolj, ko je spojina citotoksična, nižjo absorbanco izmerimo.

Vidimo, da spojina **13** pri koncentraciji 20 µM še ne izkazuje citotoksičnosti na celični liniji HEK 293, pri 100 µM pa je upad absorbance že precej velik (in s tem zmanjšano število živih, aktivnih celic). Spojina **16** je v koncentacijskem območju od 20 – 100 µM praktično necitotoksična. Spojina **12** pri koncentraciji 10 µM ni citotoksična, medtem ko citotoksičnost naraste ob povečanju koncentracije spojine **12** na 50 µM. Izrazito citotoksičnost je izkazovala tudi spojina **3**, zato je nismo mogli uporabiti kot pozitivno kontrolo pri testiranju antagonističnih lastnosti sintetiziranih spojin na TLR4.



Slika 21: Prikaz citotoksičnosti spojin **13** in **16** glede na DMSO



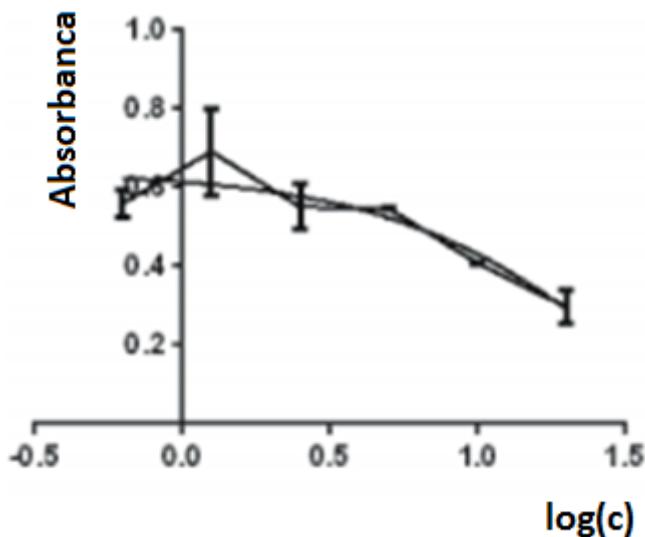
Slika 22: Prikaz citotoksičnosti spojine 12 glede na DMSO

b) Študije antagonistične aktivnosti

Za oceno antagonističnih lastnosti sintetiziranih spojin na TLR4 smo uporabili reportersko celično linijo HEK-BlueTM-hTLR4 (Invivogen), ki selektivno izraža TLR4; ob prisotnosti agonistov TLR4 pride do izražanja reporterskega gena in sinteze alkalne fosfataze. Če bomo celicam dodali TLR4 antagonist, ob nadalnjem dodatku LPS (TLR4 agonist) ne bo prišlo do izražanja alkalne fosfataze. Če pa dodana spojina ne deluje kot antagonist, bo do izražanja alkalne fosfataze prišlo, kar mi nato izmerimo kot povečanje absorbance. Za negativno kontrolo smo uporabili sam DMSO, za pozitivno kontrolo pa LPS v DMSO.

Od sintetiziranih spojin sta upad absorbance povzročili spojini **3** in **13**, vendar smo z opazovanjem celic pod mikroskopom ugotovili, da to ni posledica antagonističnega delovanja teh dveh spojin, temveč gre za inhibicijo celične rasti. Spojina **16** tudi ne kaže antagonističnega delovanja na TLR4 receptorje.

Antagonistično delovanje na Toll-u podobne receptorje 4 pa kaže spojina **12**, ki ima $IC_{50} = 40,1 \mu M$. Graf (slika 23) predstavlja vrednosti absorbanc, ki so bile izmerjene pri različnih koncentracijah spojine 12 ($0,6 \mu M$; $1,25 \mu M$; $2,5 \mu M$; $5 \mu M$; $10 \mu M$; $20 \mu M$):



Slika 23: Graf prikazuje odvisnost absorbance od logaritma koncentracije spojine 12 [$A=f(\log(c))$]

Sklep

V magistrski nalogi smo sintetizirali antagoniste Tollu podobnega receptorja 4 s hidroksietilaminskim in gvanidinskim skeletom.

Glede na postavljene cilje smo:

- 1) Uspešno ponovili sintezo že znanega antagonista na TLR4 (spojina **3**), pri čemer smo postopek glede na obstoječo literaturo nekoliko spremenili in ga optimizirali. Spojino **3** smo želeli uporabiti kot dodatno pozitivno kontrolo pri naših testih, a se je izkazala, da je preveč citotoksična na celični liniji HEK 293.
- 2) Na podlagi literaturnih podatkov smo poiskali ustrezen postopek za sintezo spojine, odkrite z virtualnim rešetanjem in dokazanim antagonistično delovanjem na TLR4 (spojina **a**), in njenih analogov. Sinteza spojine **a** nam ni uspela, ker se je izkazalo, da reakcije slabo potekajo, če je na mestu 5 aromatskega obroča vezana metoksi skupina. Potrebna bi bila še dodatna optimizacija sinteze pri takem tipu spojin.
- 3) Sintetizirali smo tri analoge spojine **a** (spojina **12**, spojina **13** in spojina **16**).
- 4) Preverili smo topnost vseh treh analogov v celičnem mediju in določili njihovo citotoksičnost na celični liniji HEK 293. Antagonistično delovanje na TLR4 izkazuje le spojina **12** z $IC_{50} = 40,1 \mu M$.

Glede na dobljene rezultate lahko zaključimo, da so potrebne še dodatne strukturne spremembe na spojinah, saj moramo zagotoviti ustrezeno topnost v celičnem mediju, obdržati antagonistično delovanje na TLR4, hkrati pa zagoviti, da spojine niso citotoksične za človeški organizem.

Literatura

1. Cohen, J.: The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002, *420*, 885–91.
2. Anas A.A., Wiersinga W.J., de Vos A.F., van der Poll T.: Recent insights into the pathogenesis of bacterial sepsis. *The Netherlands Journal of Medicine* 2010, *68*, 147-52.
3. <http://buffonescience9.wikispaces.com/UNIT+7+-+Taxonomy> (21. 6. 2013, 20:52)
4. <http://www.hindawi.com/journals/mi/2010/916425/fig1/> (21. 6. 2013, 23:34)
5. Sharma, J.: Sepsis: What We Know and What We Don't. *Journal of Medical Microbiology & Diagnosis* 2012, *01*, 1–2.
6. Jean-Baptiste, E.: Cellular mechanisms in sepsis. *Journal of Intensive Care Medicine* 2007, *22*, 63–72.
7. Van der Poll, T., Opal, S. M.: Host-pathogen interactions in sepsis. *The Lancet Infectious Diseases* 2008, *8*, 32–43.
8. <http://www.hindawi.com/isrn/oncology/2012/642141/fig1/> (22. 6. 2013, 0:06)
9. Takeda, K., Akira, S.: TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology* 2004, *16*, 3-9.
10. Gay, N. J., Gangloff, M.: Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annual Review of Biochemistry* 2007, *76*, 141–65.
11. Lu, Y., Yeh, W., Ohashi, P. S.: LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 2008, *42*(2), 145–51.
12. Pålsson-McDermott, E. M., O'Neill, L. A. J.: Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* 2004, *113*(2), 153–62.
13. Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., Akira S.: Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *Journal of Immunology* 1999, *162*(7), 3749–52.
14. Maeshima, N., Fernandez, R. C.: Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2013, *3*, 1–13.
15. Chavez, S. A., Martinko, A. J., Lau, C., Pham, M. N., Cheng, K., Bevan, D. E., Mollnes, T. E., Yin, H.: Development of β -Amino Alcohol Derivatives That

- Inhibit Toll-like Receptor 4 Mediated Inflammatory Response as Potential Antiseptics. *Journal of Medicinal Chemistry* 2011, (54), 4659–4669.
16. Kanzler, H., Barrat, F. J., Hessel, E. M., Coffman, R. L.: Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nature Medicine* 2007, 13(5), 552–9.
17. Mogensen, T. H.: Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical Microbiology Reviews* 2009, 22(2), 240–73.
18. Peri, F., Piazza, M., Calabrese, V., Damore, G., Cighetti, R.: Exploring the LPS/TLR4 signal pathway with small molecules. *Biochemical Society Transactions* 2010, 38(5), 1390–5.
19. Raetz, C. R., Guan, Z., Ingram, B. O., Six, D. A., Song, F., Wang, X., Zhao, J.: Discovery of new biosynthetic pathways: the lipid A story. *Journal of Lipid Research* 2009, 50(Suppl), 103–108.
20. http://www.drugs.com/clinical_trials/phase-iii-study-eritoran-does-not-meet-primary-endpoint-11082.html (17. 6. 2013; 01:06)
21. Scior, T., Alexander, C., Zaehringer, U.: Reviewing and identifying amino acids of human, murine, canine and equine TLR4 / MD-2 receptor complexes conferring endotoxic innate immunity activation by LPS/lipid A, or antagonistic effects by Eritoran, in contrast to species-dependent modulation by lipid IVa. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 2013, 5(6).
22. Matsunaga, N., Tsuchimori, N., Matsumoto, T., Ii, M.: TAK-242 (Resatorvid), a Small-Molecule Inhibitor of Toll-Like Receptor (TLR) 4 Signaling, Binds Selectively to TLR4 and Interferes with Interactions between TLR4 and Its Adaptor Molecules. *Molecular Pharmacology* 2010, 242, 34–41.
23. <http://www.drugs.com/pro/paclitaxel.html> (24. 6. 2013; 15:56)
24. Švajger U., Brus B., Turk S., Sova M., Hodnik V., Anderluh G., Gobec S. Novel Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Antagonists Identified By Structure- and Ligand-Based Virtual Screening. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2013, manuscript in revision
25. <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/grignard-reaction.shtm> (4. 7. 2013; 21:18)
26. <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/vilsmeier-reaction.shtm> (4. 7. 2013; 20:07)

27. Su, W. K., Li, Z. H., Zhao, L. Y.: One-pot synthesis of 3-formylchromones from bis-(trichloromethyl)carbonate / DMF. *Organic Preparations and Procedures International* 2007, 39(5), 495-502.
28. Plaskon, A. S., Grygorenko, O. O., Ryabukhin, S. V.: Recyclizations of 3-formylchromones with binucleophiles. *Tetrahedron* 2012, 68(1), 2743-2757.
29. Ibrahim, M. A., Abdel-Megid Abdel-Hamed, M., El-Gohary, N. M.: A New Approach for the Synthesis of Bioactive Heteroaryl Thiazolidine-2,4-diones. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2011, 22(6), 1130–1139.
30. Sachdeva, N., Dolzhenko, A., Chui, W.: Regioselective synthesis of pyrimido triazin-6-ones via reaction of 1-(6-oxo-1, 6-dihydropyrimidin-2-yl) guanidines with triethylorthoacetate: observation of an unexpected rearrangement. *Organic & Biomolecular Chemistry* 2012, 10(23), 4586–4596.
31. Mosmann, T.: Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* 1983, 65, 55-63