

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA HERTIŠ

**SINTEZA IN VREDNOTENJE DERIVATOV 2-(5-
BENZOILPYRIMIDIN-2-IL) GVANIDINA KOT
POTENCIALNIH ANTAGONISTOV TOLL-U PODOBNEGA
RECEPTORJA 4**

**SYNTHESIS AND EVALUATION OF 2-(5-
BENZOYLPYRIMIDIN-2-YL) GUANIDINE DERIVATIVES AS
POTENTIAL ANTAGONISTS OF TOLL-LIKE RECEPTOR 4**

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sove, mag. farm., in somentorstvom doc. dr. Urbana Švajgerja, mag. farm.

Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo in Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani (Center za masno spektrometrijo). Teste na celičnih linijah je opravil doc. dr. Urban Švajger, mag. farm., na Zavodu za transfuzijsko medicino Republike Slovenije.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sove, mag. farm., in somentorstvom doc. dr. Urbana Švajgerja, mag. farm.

Urška Hertiš

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Mateju Sovi, mag. farm., za pomoč in vodenje pri opravljanju magistrske naloge. Prav tako se zahvaljujem somentorju doc. dr. Urbanu Švajgerju, mag. farm.

Posebna zahvala velja staršem, ki so mi omogočili študij in mi nudili podporo pri izdelavi magistrske naloge.

Prav tako se zahvaljujem vsem, ki so na kakršenkoli način sodelovali pri nastajanju te magistrske naloge.

POVZETEK

Organizmi, kot so vretenčarji, so za zaščito pred škodljivimi mikrobi iz okolja razvili poseben obrambni mehanizem, imenovan imunski sistem. Toll-u podobni receptorji (TLR) so pomemben del prirojene imunosti, ki deluje kot prva linija obrambe ob vdoru tujkov v telo. Receptorji selektivno prepoznajo širok spekter molekulskih vzorcev mikroorganizmov in sprožijo provnetni odziv. Izmed družine več kot desetih humanih TLR je najboljše raziskan in klinično pomemben Toll-u podoben receptor 4 oziroma TLR4.

Spremenjen, prekomeren ali nereguliran odziv TLR4 na različne ligande je lahko vpleten v patogenezo bolezni, kot so ateroskleroza, avtoimunske bolezni, nevropatska bolečina, vnetne bolezni in sepsa. Kljub številnim raziskavam na tem področju, zaenkrat še ni bil odkrit učinkovit antagonist TLR4, ki bi uspešno prestal klinična testiranja in prišel na tržišče kot nova učinkovina.

V magistrskem delu smo sintetizirali analoge znanega antagonista 1-(4-fluorofenil)-2-(5-(2-hidroksi-4-metoksibenzoil)pirimidin-2-il) gvanidina, za katerega je bilo ugotovljeno, da se z nekovalentnimi interakcijami veže na TLR4 in prepreči tvorbo kompleksa MD-2/TLR4. Pri sintezi spojin smo izhajali iz različno substituiranih 2-hidroksiacetofenonov. V prvi stopnji sinteze smo s pomočjo Vilsmeier-Haack-ovega reagenta tvorili 3-formilkromon, iz katerega smo v drugi stopnji s cianogvanidinom tvorili pirimidinski obroč. V tretji stopnji pa smo izvedli nukleofilno adicijo na ciano skupino produkta 2. stopnje in tako pripravili ustrezen derivat gvanidina.

Končnim spojinam smo preverili topnost v celičnem mediju in citotoksičnost ter določili antagonistično delovanje na celični liniji z izraženim TLR4. Večina spojin je bila zadovoljivo topna v celičnem mediju RPMI 1640 in pri nizkih koncentracijah, pod 50 μM , ni bila citotoksična za celično linijo HEK293. Antagonistično delovanje na TLR4 smo opazili samo pri 1-(4-fluorofenil)-3-(5-(2-hidroksi-4-metoksibenzoil)pirimidin-2-il) gvanidinu (spojina **6**), kateremu smo določili tudi IC_{50} vrednost 17,9 μM . Ugotovili smo, da je za antagonistično delovanje ustrezna metoksi skupine tako na mestu 4 (spojina **6**) kot tudi na mestu 5 (spojina **1**) na aromatskem obroču. Spojina **6** zato predstavlja pomembno izhodišče pri razvoju novih nizkomolekularnih antagonistov TLR4.

ABSTRACT

Organisms, like vertebrates have developed a special mechanism called immune defense that serves as a protection against harmful microbes. Toll-like receptors are important part of the innate immune system which presents the first line of host defense against microbial pathogens. Receptors selectively recognize a wide variety of pathogen-associated molecular patterns and trigger a pro-inflammatory immune response. Among the family of 10 human TLRs already identified, TLR4 is the most studied and clinically relevant.

Dysregulation of TLR4 signaling has been directly implicated in an array of human diseases, such as atherosclerosis, autoimmune diseases, neuropathic pain, inflammatory and sepsis. Despite extensive research in this area, they still have not found active antagonists being successful in clinical trials and come to the market as novel drug.

Within our research, as a part of this master's thesis, we synthesized derivatives of recently published TLR4 antagonist, 1-(4-fluorophenyl)-2-(5-(2-hydroxy-4-methoxybenzoyl) pyrimidin-2-yl) guanidine which binds to TLR4 with non-covalent interactions and target the MD-2/TLR4 complex. All of the compounds were synthesized from diverse set of 2-hydroxyacetophenones. In the first step we formed 3-formylchromones by using Vilsmeier-Haack reagent. In the second step, the addition of cyanoguanidine to 3-formylchromone lead to the formation of a pyrimidine ring. Finally, the nucleophilic addition of different amines to the cyano group formed the final guanidine derivatives.

All compounds were tested for their solubility in cell-culture medium, cytotoxicity and antagonistic activity on cell line HEK293. Most of compounds were sufficiently soluble in cell-culture medium RPMI 1640 and non-cytotoxic for cell line HEK293 at low concentration under 50 μ M. Antagonistic activity on TLR4 was detected only for 1-(4-fluorophenyl)-3-(5-(2-hydroxy-4-methoxybenzoyl) pyrimidin-2-yl) guanidine (compound **6**), which has an IC_{50} value of 17,9 μ M. It was also found that the change in the position of a methoxy group on the aromatic ring from position 5 (compound **1**) to position 4 (compound **6**) does not significantly change antagonistic activity. Compound **6** represents important starting point for the development of novel small-molecule antagonists of TLR4.

SEZNAM OKRAJŠAV

Angl	angleško
APC	antigen predstavitvene celice (angl. antigen-presenting cells)
Ar-H	aromatski vodikov atom
br s	široki singlet (angl. broad singlet)
bRNA	bakterijska RNA (angl. bacterial RNA)
BTC	bis(triklorometil) karbonat - trifosgen
CDCl ₃	devteriran kloroform
CD	označevanje celične površinske molekule z monoklonskimi protitelesi (angl. cluster of differentiation)
CLR	receptorji lektina tipa C (angl. C-type lectin receptors)
CŽS	centralno-živčni sistem
d	dublet
DAMP	s poškodbami povezani molekularni motivi (angl. damage-associated molecular patterns)
DC	dendritične celice (angl. dendritic cells)
Dd	dublet dubleta
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
dsRNA	dvojno-vijačna RNA (angl. double-stranded RNA)
dt	dublet tripleta
ESI-MS	masna spektrometrija z ionizacijo z elektrorazprševanjem
GABA	γ -aminomaslena kislina (angl. γ -aminobutyric acid)
HEK 293	trajna celična kultura iz človeških embrionalnih ledvičnih celic (angl. human embryonic kidney cell line)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HRMS	visoko ločljiva masna spektrometrija
HSP	stresni proteini (angl. heat-shock proteins)
IC ₅₀	srednja inhibitorna koncentracija (angl. median inhibition concentration)
IFN	interferon
IL-1 β	interlevkin-1 β
IL-6	interlevkin-6

<i>i</i> PrOH	izopropanol
IRF3	IFN-regulacijski faktor 3 (angl. IFN-regulatory factor 3)
IUPAC	ime določeno po predpisanem sistemu Mednarodne zveze za čisto in uporabno kemijo
LBP	LPS-vezavni protein (angl. LPS-binding protein)
LPS	lipopolisaharid, tudi endotoksin (angl. lipopolysaccharide)
LRR	z levcinom bogata ekstracelularna domena (angl. leucin rich repeats domane)
m	multiplet
MAPK	mitogen aktivirana proteinska kinaza (angl. mitogen-activated protein kinase)
MD-2	diferenciacijski mielodni protein 2 (angl. myeloid differentiation protein 2)
MF	mobilna faza
MHC	glavni histokompatibilni kompleks (angl. major histocompatibility complex)
MMP-9	matriksna metaloproteaza 9
mol. Ekv	molarni ekvivalent
MS	masna spektrometrija
MyD88	diferenciacijski mielodni protein 88 (angl. myeloid differentiation primary-response protein 88)
NFκB	jedrni dejavnik kapa B
NK-celice	celice naravne ubijalke (angl. natural killer cells)
NLR	NOD-u podobni receptorji (angl. NOD-like receptors)
NMR	jedrsko magnetna resonanca (angl. nuclear magnetic resonance)
nt	ni tretirana
PAMP	za patogene značilni molekularski motivi (angl. pathogen-associated molecular patterns)
pH	negativni logaritem molarne koncentracije [H ₃ O] ⁺ ionov
PRR	receptorji, ki prepoznavajo molekulske vzorce (angl. pattern-recognition receptors)
Rf	retencijski faktor
RLR	RIG-1 podobni receptorji (angl. RIG-1-like receptors)
RNA	ribonukleinska kislina (angl. ribonucleic acid)
ROS	reaktivne kisikove spojine

RSV	respiratorni sincicijski virus (angl: respiratory syncytial virus)
Rt	retencijski čas
s	singlet
SAR	odnos med strukturo in delovanjem spojine (angl. structure-activity relationship)
SEAP	alkalna fosfataza, ki jo izločajo embrionske celice (angl. secreted embryonic alkaline phosphatase)
ssRNA	enojno-vijačna RNA (angl. single-stranded RNA)
THF	tetrahidrofuran
TIR	domena Toll-interlevkinskega receptorja (angl. Toll-interleukin receptor domain)
TIRAP	adaptorski protein podoben MyD88 (angl. TIR-domain-containing adaptor protein)
TLC	tankoplastna kromatografija (angl. thin-layer chromatography)
TLR	Toll-u podobni receptorji (angl. Toll-like receptors)
TNF- α	dejavnik tumorske nekroze α (angl. tumor necrosis factor α)
TMS-Cl	tetrametilsilil klorid
TPK	tankoplastna kromatografija
TRAM	adaptorski protein soroden TRIF (angl. TRIF-related adaptor molecule)
TRIF	adaptorski protein, ki vsebuje domeno TIR (angl. TIR-domain-containing adaptor protein including IFN- β)
Ttal	temperatura tališča
q	kvartet

KAZALO

1. UVOD	1
1. 1. IMUNSKI SISTEM.....	1
1. 2. RECEPTORJI NARAVNE IMUNOSTI	2
1. 3. TLR RECEPTORJI.....	4
1. 4. RECEPTOR TLR 4.....	8
1. 4. 1. Vpletenost TLR4 v razvoj bolezni	9
1. 4. 2. Inhibicija TLR4 signalizacije	10
2. NAMEN DELA	15
3. MATERIALI IN METODE	16
3. 1. MATERIALI	16
3. 2. METODE.....	16
4. EKSPERIMENTALNI DEL	20
4. 1. REAKCIJSKA SHEMA SINTEZE SPOJIN 5, 6 IN 7	20
4. 1. 1. Sinteza 7-metoksi-4-okso-4H-kromen-3-karbalhida (3).....	21
4. 1. 2. Sinteza N-(5-(2-hidroksi-4-metoksibenzoil)pirimidin-2-il)cianamida (4).....	22
4. 1. 3. Sinteza 1-(4-metoksifenil)-3-(5-(2-hidroksi-4-metoksibenzoil)pirimidin-2-il)gvanidina (5).....	23
4. 1. 4. Sinteza 1-(4-fluorofenil)-3-(5-(2-hidroksi-4-metoksibenzoil)pirimidin-2-il)gvanidina (6).....	25
4. 1. 5. Sinteza 1-(5-(2-hidroksi-5-metoksibenzoil)pirimidin-2-il)-3-(piperazin)gvanidina (7).....	26
4. 2. REAKCIJSKA SHEMA SINTEZE 1-(5-(2-HIDROKSI-4,5-DIMETOKSIBENZOIL)PIRIMIDIN-2-IL)-3-(MORFOLIN)GVANIDINA (11).....	28
4. 2. 2. Sinteza N-(5-(2-hidroksi-4,5-dimetoksibenzoil)pirimidin-2-il)cianamida (10)	30
4. 2. 3. Sinteza 1-(5-(2-hidroksi-4,5-dimetoksibenzoil)pirimidin-2-il)-3-(morfolin)gvanidina (11).....	31
4. 2. 4. Poskus sinteze 1-(4-fluorofenil)-3-(5-(2-hidroksi-4,5-dimetoksibenzoil)pirimidin-2-il)gvanidina (12)	32
4. 3. POSKUS SINTEZE SPOJINE 7-HIDROKSI-4-OKSO-4H-KROMEN-3-KARBALDEHIDA (14).....	33
5. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	34
6. SKLEP	43
7. LITERATURA	44

SLIKOVNO KAZALO

Slika 1: Mehanizmi obrambe naravne imunost, ki jih stimulirajo PRR. Povzeto po viru [11].	3
Slika 2: Struktura TLR.	5
Slika 3: Signalna pot TLR in načini inhibicije TLR4 receptorja. Povzeto po [11, 26].	8
Slika 4: Molekulska struktura Eritorana.	12
Slika 5: Molekulska struktura TAK-242.	13
Slika 6: Molekulska struktura Ibudilasta (AV4II).	13
Slika 7: Molekulska struktura spojine 1.	14
Slika 8: Molekulska struktura spojine 1 na levi in splošna struktura spojine z označenimi modifikacijami na desni.	15
Slika 9: Reakcijska shema sinteze končnih spojin 5, 6 in 7.	20
Slika 10: Reakcijska shema sinteze spojine 3.	21
Slika 11: Reakcijska shema sinteze spojine 4.	22
Slika 12: Reakcijska shema sinteze spojine 5.	23
Slika 13: Reakcijska shema sinteze spojine 6.	25
Slika 14: Reakcijska shema sinteze spojine 7.	26
Slika 15: Reakcijska shema sinteze končne spojine 11.	28
Slika 16: Reakcijska shema sinteze spojine 9.	29
Slika 17: Reakcijska shema sinteze spojine 10.	30
Slika 18: Reakcijska shema sinteze spojine 11.	31
Slika 19: Reakcijska shema sinteze spojine 12.	32
Slika 20: Reakcijska shema sinteze spojine 14.	33
Slika 21: Mehanizem tvorbe Vilsmeier-Haack-ovega reagenta s trifosgenom. Povzeto po [40].	34
Slika 22: Mehanizem tvorbe Vilsmeier-Haack-ovega reagenta z oksalil kloridom. Povzeto po viru [37].	34
Slika 23: Mehanizem tvorbe kromonskega obroča. Povzeto po viru [40].	35
Slika 24: Različne strukture 3-formilkromona in možni stranski produkti. Povzeto po viru [43].	36
Slika 25: Možen mehanizem reakcije 2. Stopnje. Povzeto po viru [44].	36
Slika 26: Mehanizem reakcije 3. stopnje, drugi postopek. Povzeto po viru [46, 47].	37
Slika 27: Strukture končnih spojin 5, 6 in 7.	37
Slika 28: Strukture končnih spojin 11 in 12.	38
Slika 29: Prikaz citotoksičnosti spojin 5 in 6 pri koncentracijah 10 in 50 μM .	39
Slika 30: Prikaz citotoksičnosti spojin 5 in 6 pri koncentracijah 100 in 250 μM .	40
Slika 31: Prikaz citotoksičnosti spojin 7 in 11 pri koncentraciji 20 μM .	41
Slika 32: Prikaz odvisnosti absorbanca od logaritma koncentracije za spojino 6.	41

KAZALO TABEL

Tabela 1: TLR receptorji, njihova lokacija in eksogeni oziroma endogeni ligandi. Povzeto po [6, 14].	7
--	---

1. UVOD

1. 1. Imunski sistem

Okolje, v katerem živimo, je preplavljeno z mikroorganizmi in naše telo je neprestano v stiku z bakterijami, glivami, virusi in drugimi paraziti. Zaradi številnih nevarnosti iz okolja, so organizmi razvili poseben obrambni mehanizem, imenovan imunski sistem. [5] Mikroorganizme, ki lahko prodrejo v naše telo in povzročajo infekcije ali se nenadzorovano množijo, imenujemo patogeni. Primarna naloga imunskega sistema je zaščita gostitelja pred patogeni, odstranitev in zmanjšanje posledic. Imunski sistem sestavljata naravna (nespecifična, prirojena) in pridobljena (adaptivna, specifična) imunost. Prvo linijo obrambe predstavlja naravna imunost in ima pomembno vlogo pri prepoznavi in omejitvi patogenov med zgodnjo okužbo. Na mikrobe se odzove hitro, v nekaj minutah do urah. Pridobljen imunski sistem, ki so ga razvili samo vretenčarji se aktivira po enem tednu ali v primeru, kadar obrambni odziv naravne imunosti sam ni zmožen odstraniti patogena. Zaradi imunskega spomina si zapomni vsako srečanje s tujim antigenom in ob ponovnem stiku z njim posreduje hitrejši in močnejši odziv. Za naravno imunost je značilno nespecifično ali široko specifično in neselektivno prepoznavanje tujkov, medtem ko je za pridobljeno imunost značilno specifično in selektivno prepoznavanje antigenov. Naravni obrambni mehanizem vključuje anatomsko-fiziološke bariere, celične ovire in vnetja. Anatomske pregrade obsegajo kožo in sluznico dihal, prebavila ter sečil. Nizek pH želodčne kisline in hidrolitični encimi (lizocimi) iz izločkov žlez lojnic predstavljajo fiziološke ovire, ki imajo mikrobicidno delovanje in preprečujejo razmnoževanje bakterij. Makrofagi in nevtofilci tujek najprej prepoznajo z ustreznimi receptorji, nato pa ga fagocitirajo ali uničijo s pomočjo aktivacije komplemента in vnetja. Dendritične celice po drugi strani skrbijo predvsem za vzorčenje in predstavitev antigenov na svoji površini. Pomen makrofagnega požiranja tujkov je torej uničenje patogenov in predstavitev razgrajenih tujih molekul celicam T pomagalkam ter sprožitev specifičnega imunskega odziva, ki se kaže z nastankom protiteles ali citotoksičnih limfocitov T, usmerjenih proti antigenom. Pridobljena imunost je posredovana preko specifičnih levkocitov, limfocitov, kamor prištevamo celice B in T. Limfociti so celice s posebnimi, bolj dolgoročno usmerjenimi nalogami v zvezi z imunskim odzivom. So evolucijsko mlajši od fagocitov in

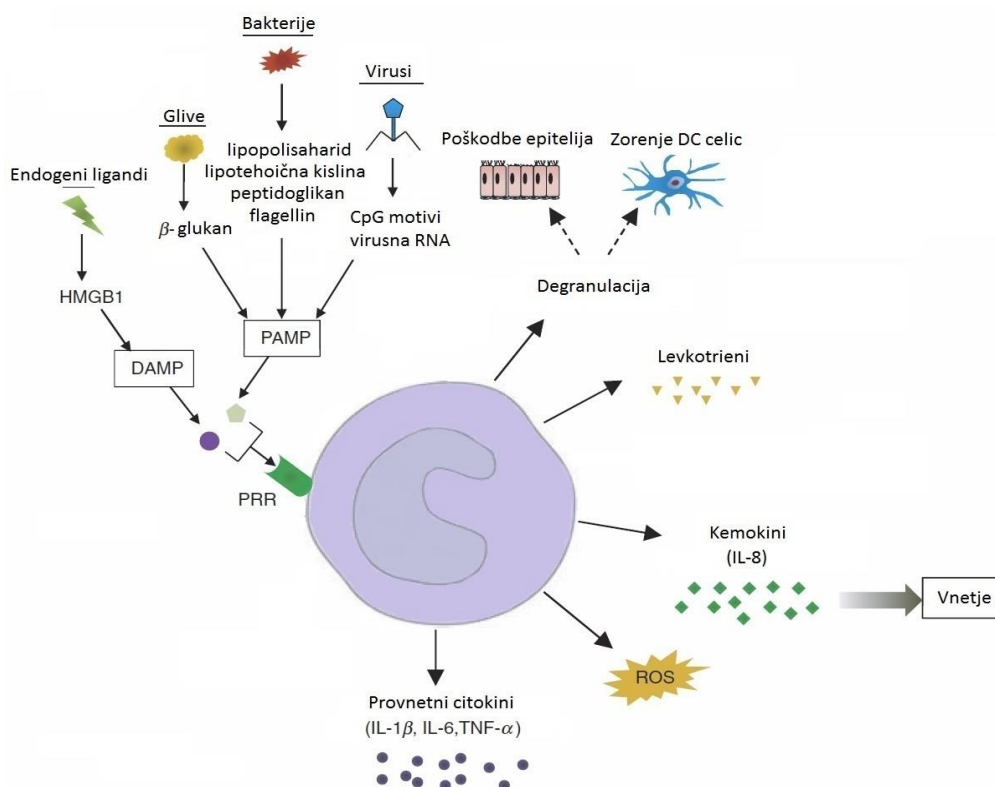
okrepijo prvo linijo obrambe (prirojene fizične pregrade in nespecifični imunski odziv – fagocitozo in aktivacijo vnetja) s specifičnim imunskim odzivom. Namen pridobljene imunosti je predvsem sprožitev odziva, specifično usmerjenega proti antigenom povzročitelja bolezni, in nastanek imunskega spomina. Limfociti B in njihova protitelesa posredujejo humoralno posredovano imunost in nas branijo pred zunajceličnimi mikrobi, medtem ko celični imunski odziv posredujejo celice T, ki nas ščitijo pred znotrajceličnimi patogeni. Limfociti T imajo še dodatne naloge, kot je stimulacija diferenciacije limfocitov B in proizvodnja protiteles ter reguliranje zaščitnega mehanizma naravne imunosti. [1-7, 9] Kljub temu da se obrambna sistema razlikujeta po svoji vlogi in mehanizmi prepoznavanja tujkov, sta tesno povezana. Celice naravne imunosti so ključne pri predstavitvi antigenov naivnim limfocitom T in aktivaciji komplementa, ki stimulirata specifično imunost. Po diferenciaciji limfociti T sproščajo v okolico signalne molekule, citokine, ki stimulirajo fagocite za fagocitozo patogenov. Prav tako tudi limfociti B s protitelesi pomagajo fagocitom pri privzemu antigenov. [1]

Za naravno odpornost je dolgo veljalo, da gre za nespecifičen način uničenja patogenov in nato predstavitev antigenov celicam, ki sodelujejo pri imunosti. Danes vemo, da je način naravne odpornosti mnogo bolj specifičen in da je prav tako kot pridobljen imunski sistem, sposoben ločiti med lastnimi in tujimi molekulami. Specifičnost temelji na prepoznavanju ohranjenih mikrobnih struktur oz. molekulskih vzorcev, povezanih s patogeni (PAMPs). Te vzorce prepoznajo evolucijsko ohranjeni receptorji PRRs, ki so opisani v nadaljevanu. [2, 6, 23]

1. 2. Receptorji naravne imunosti

Celice naravne imunosti imajo na svoji površini receptorje za prepoznavanje molekulskih vzorcev imenovane PRR (angl. *pattern recognition receptors*), s katerimi prepoznajo tujek. Ti receptorji prepoznajo tako eksogene kot tudi endogene molekulske vzorce. Slednje, telesu lastne molekule, ki se sprostijo iz poškodovanih celic, imenujemo s poškodbo povezani molekulski vzorci ali krajše DAMPs (angl. *damage-associated molecular patterns*), ki vključujejo molekule, kot je sečna kislina. PRR prepoznajo tudi ohranjenje strukture na vrsti mikroorganizmov, imenovane s patogeni povezani molekulski vzorci oziroma PAMPs (angl. *pathogen-associated molecular patterns*). Značilne PAMP

strukture so komponente celične stene, npr. lipopolisaharidi, peptidoglikani in bakterijski lipoproteini ter genski material mikroorganizmov, npr. virusna DNA oziroma RNA. Med PRR uvrščamo: lektinske receptorje tipa C (CLRs), NOD-u podobne receptorje (NLRs), RIG-u podobne receptorje (RLRs) in Toll-u podobne receptorje (TLRs). CLRs so pomembni za prepoznavo gliv in mikobakterij, RLRs pa za prepoznavo virusov. Komponente patogenih bakterij v večini prepoznajo NLR in TLR. V družino PRR uvrščamo tudi RAGE receptorje. Gre za transmembranske receptorje, ki prepoznajo DAMP strukture, predvsem oksidirane proteine, lipide in nukleinske kisline ter glikane, ki nastanejo kot posledica oksidativnega stresa ali hiperglikemije. PRRs lahko delimo na dva razreda glede na funkcijo (endocitozni ali signalni) in lokacijo (na membrano vezani ali znotrajcelični). Transmembranski receptorji so CLR, RAGE in TLR, medtem ko so NLR in RLR locirani znotraj celic. Receptorji naravne imunosti ob prepoznavi PAMP molekul posredujejo signal, ki stimulira fagocitozo patogenov, lizo poškodovanih celic in izločanje vnetnih mediatorjev (primer interleukinov tipa 1 (IL-1 β) in tumorje nekrotizirajoče faktorje (TNF)) (Slika 1). Zanje je značilno hitro posredovanje signala in sprožitev tako naravne kot tudi pridobljene imunosti. [1, 5, 10-15]



Slika 1: Mehanizmi obrambe naravne imunost, ki jih stimulirajo PRR. Povzeto po viru [11].

CLR so transmembranski receptorji z domeno, ki veže ogljikove hidrate. Najbolj raziskan je Dectin-1, ki prepozna patogene komponente glivičnih celičnih sten (β -glukane) in posreduje provnetne citokine. [10-12]

NLR so znotrajcelični receptorji. Mednje uvrščamo več kot 20 citoplazemskih proteinov, od katerih so najbolj raziskani NOD-1, NOD-2 in NLRP3. NOD1 in NOD2 prepoznata komponente bakterijske membrane in aktivirata od TLR neodvisni protibakterijski odgovor ter sprožita transkripcijo provnetnih citokinov preko NF- κ B odvisne poti. Po drugi strani NLRP3 prepozna DAMPs, npr. nekrotične celice, sečno kislino, ATP in stimulira produkcijo IL-1 β , IL-18 molekul ter tako posreduje celično smrt. [11-12]

RLR so prav tako znotrajcelični receptorji, ki preko helikazne domene prepoznajo virusno RNA. Slednji stimulirajo produkcijo INF-1 vnetnih citokinov in posredujejo protivirusni odgovor. [11]

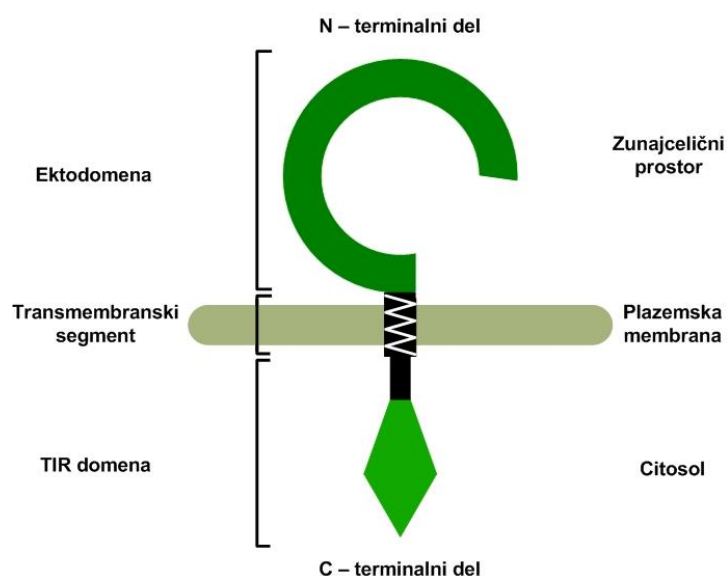
TLR so najbolj raziskana skupina PRR receptorjev in jih bomo podrobneje opisali v naslednjem poglavju.

1. 3. TLR receptorji

Najbolje raziskani receptorji iz skupine PRR so Toll-u podobni receptorji, ki so odgovorni za prepoznavo patogenov zunaj in znotraj celic. Ime so dobili po evolucijsko podobnemu proteinu Toll, ki ga je leta 1985 pri vinski mušici *Drosophila melanogaster* odkrila nemška znanstvenica K.V. Anderson s sodelavci. Ugotovili so, da gre za gen, ki sodeluje pri embriogenezi in pri imunskem odzivu na glivične okužbe pri mušicah. Do danes so identificirali več kot 10 članov TLR skupine, vendar funkcija za TLR10 še ostaja neznana. Gre za veliko družino receptorjev, kjer vsak prepozna specifične molekulske vzorce mikroorganizmov. [1, 9, 14]

TLR so transmembranski glikoproteini tipa I in so sestavljeni iz zunajcelične domene, pomembne za prepoznavo ligandov, transmembranskega heliksa in znotrajcelične signalne domene (Slika 2). Ekstracelularna domena se nahaja zunaj celic ali v endosomih, kjer sreča in prepozna patogene molekule. Ima podkvasto obliko in je sestavljena iz N-terminalnega

in C-terminalnega dela. Slednji sestoji iz α -helikaz, ki se povezujejo z disulfidnimi vezmi. N-terminalni del vsebuje z disulfidnimi vezmi povezane β -zanke. Ekstracelularna domena vsebuje tudi glikane, ki se izražajo na površini receptorja, razen na lateralni strani, ki je namenjena za prepoznavo in vezavo ligandov. Transmembranski heliks je sestavljen iz približno 20 nenabitih hidrofobnih ostankov. Znotrajcelična domena oz. Toll/interlevkin-1 receptor (TIR) domena je ključna pri prenosu signala. Ime je dobila zaradi homologije z intracelularno domeno IL-1 receptorja. TLR receptorji se izražajo na različnih imunskih celicah, tako na dendritičnih celicah, makrofagih, celicah B in T kot tudi na neimunskih fibroblastih in epitelijskih celicah. TLR 1, 2, 4, 5, 6 se nahajajo na celični membrani in prepoznajo predvsem PAMP bakterij, gliv in protozojev. Receptorji TLR 3, 7, 8, 9 so lokalizirani v endosomih in primarno prepoznajo nukleinske kisline različnih virusov in bakterij. [8, 15, 18, 19]



Slika 2: Struktura TLR.

PREPOZNAVANJE PAMP

Izmed družine TLR receptorjev so TLR1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 tisti, ki v glavnem prepoznavao bakterijske PAMP komponente. Po Gramu pozitivne (G+) bakterije imajo večplastno membrano prepletano s polimeri peptidoglikana, ki obkroža plazemsko membrano in jih prepoznavajo TLR2. Slednji ob tvorbi heterodimera s TLR1 oz. 6 prepoznajo tudi druge PAMP, npr. lipotehoično kislino, diacil in triacil lipopeptide bakterij, mikobakterij in mikoplazem. Lipopolisaharid je glavna komponenta zunanjšega sloja celične stene po

Gramu negativnih (G-) bakterij, ki ga primarno prepoznajo TLR4, skupaj s koreceptorjem MD-2. Tako G- kot G+ bakterije vsebujejo flagellin protein, produkt flagellin bakterij, ki ga prepoznajo TLR5. TLR7 prepoznajo bakterijsko RNA med njenim ciklom replikacije in stafilokoke B, ki prebivajo v fagosomih. Bakterijska DNA oz. CpG motivi genoma so PAMP za TLR9 receptorje, ki se nahajajo na membrani endosomov. [8, 14, 15, 19]

Mikobakterije so oportunistične bakterije, ki prebivajo v fagolizosomih in se počasi množijo v makrofagih ter se tako izognejo imunski obrambi. Njihova celična stena sestoji iz mešanice polisaharidov in lipidov z visoko vrednostjo mikolne kisline, ki jo prepoznavajo TLR2, 4, 8 in 9. [8, 15]

Mikoplazma je bakterija brez definirane celične stene. Obdana je s celično membrano, ki vsebuje lipoproteine imenovane LAMP, ki jih prepoznajo TLR. Viruse oziroma njihove nukleinske kisline prav tako prepoznajo določeni TLR-ji. TLR9 prepozna tako DNA virusa herpes simpleks in murin citomegalovirusa kot CpG motive, ki vsebujejo sintezne oligonukleotide. RNA iz RNA virusov in njihove sintezne produkte, npr. imiquimod in loksoribin, prepoznajo TLR7 in 8. Coat protein, ki je sestavni del virusov prepoznajo TLR2 in 4. [8, 9]

TLR prepoznajo tudi vrsto patogenih gliv, vendar za njihovo zaznavo potrebujejo dodatne molekule, npr. dektine, CD14, manozne receptorje. TLR2 skupaj z dektinom prepozna β -glukan, komponento celične stene večine gliv. Glukoronoksilomanozo, PAMP gliv, prepozna kompleks CD14 in TLR4. PAMP protozojev, kot so nenasičeni alkilacilglicerol, lipofosfoglikan, glikoinozitolfosfolipid, genski DNA, prepoznajo TLR2, 4 in 9 (Tabela 1). [15]

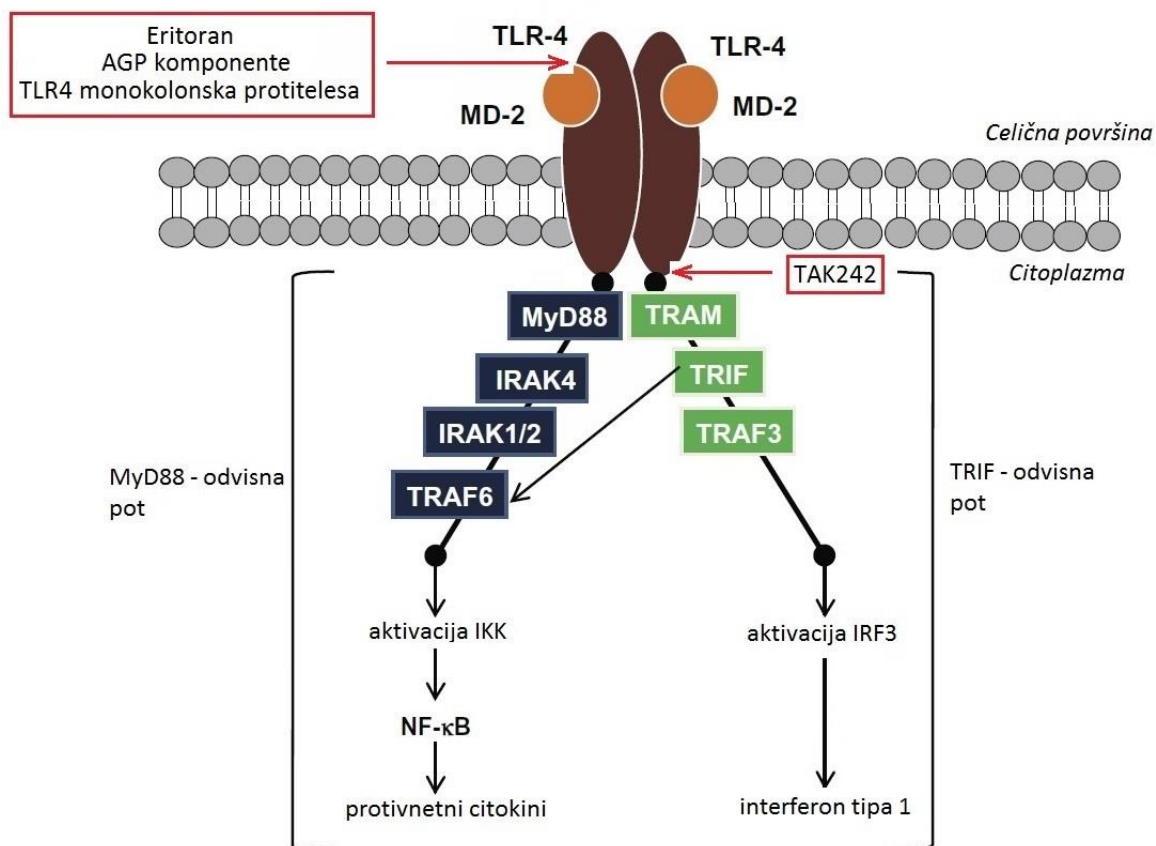
SIGNALNA POT

Po prepoznavi in vezavi PAMP na ektodomeno TLR pride do dimerizacije receptorja in prenosa signala v notranjost celice. Signalne poti receptorjev se med seboj razlikujejo, glede na to, katero adaptersko molekulo vežejo na znotrajcelično TIR domeno. Pomembni so štirje adapterski proteini: MyD88, TRIF, TIRAP in TRAM. Razen TLR3 vsi TLR vežejo MyD88 in sprožijo od MyD88-odvisno signalizacijo, ki aktivira NF- κ B in MAPK za indukcijo provnih citokinov in interferonov tipa I na dendritičnih celicah in makrofagih. TLR1, 2, 4 in 6 potrebujejo za aktivacijo te poti tudi TIRAP molekulo.

TLR	Lokacija v celici	Eksogeni ligandi	Endogeni ligandi
TLR1	ekstracelularno	triacil lipopeptidi, lipotehoična kislina	
TLR2	ekstracelularno	diacil in triacil lipopeptidi, glikoinozitolfosfolipidi, glikolipidi, lipotehoična kislina, lipoarabinomanan, peptidoglikan, porini	Hsp60, Hsp70, gp96, EDN, HMGB1, biglikan, hialuronan
TLR3	intracelularno – endosomi	dsRNA	mRNA
TLR4	ekstracelularno	glikoinozitolfosfolipidi, LPS, manan, ovojnični proteini virusov, taksol,	fibrinogen, fibronectin A, heparan sulfat, hialuronski fragmenti, protein temperaturnega šoka 60, 70
TLR5	ekstracelularno	flagellin	
TLR6	ekstracelularno	diacil lipopeptidi, lipotehoična kislina	
TLR7	intracelularno – endosomi	virusna ssRNA, imiquimod	RNA imunski kompleks
TLR8	intracelularno – endosomi	virusna ssRNA	
TLR9	intracelularno – endosomi	CpG-DNA, pigment hemozoin	DNA imunski kompleks, kromatin
TLR10	ekstracelularno		

Tabela 1: TLR receptorji, njihova lokacija in eksogeni oziroma endogeni ligandi. Povzeto po [6, 14].

Receptor TLR3 prenese signal izključno preko TRIF-odvisne poti, ki aktivira NF- κ B in IRF3 za indukcijo provnetnih citokinov in interferonov tipa I. TLR4 lahko izkorišča vse štiri adaptorje. Pri signalizaciji preko MyD88-odvisne poti potrebuje TIRAP molekulo in pri TRIF-odvisni signalni poti TRAM. [8, 9, 15]



Slika 3: Signalna pot TLR in načini inhibicije TLR4 receptorja. Povzeto po [11, 26].

1. 4. Receptor TLR 4

Toll-u podoben receptor 4 (TLR4) je receptor naravne imunosti, ki ima pomembno vlogo pri zaščiti gostitelja pred patogeni. Prepozna molekulske vzorce mikroorganizmov in endogene nevarnosti ter aktivira imunski odziv, ki sproži vnetje in sintezo citokinov.

TLR4 je transmembranski protein tipa I, ki se nahaja na plazemski membrani imunskih in neimunskih celic. Sestavljen je iz podkvasto oblikovane zunajcelične domene, transmembranskega heliksa in znotrajcelične signalne domene. Receptor prepozna LPS pri G-bakterijah, manan pri glivah, glikoinozitolfosfolipide pri parazitih in proteine na virusnih ovojnicah. TLR4 zazna tudi endogene ligande, kot sta protein temperaturnega šoka (Hsp-heat shock protein) in fibrinogen. Za prepoznavo in vezavo liganda receptor potrebuje koreceptor MD-2, serumski LPS vezavni protein oz. LBP in glikolipid CD14.

LBP in CD14 sta pomembna za prenos in vezavo liganda na MD-2. Slednji je preko vodikovih vezi zasidran v ektodomeno TLR4 na konkavni strani. Po nastanku ligand-MD-2/TLR4 kompleksa pride do dimerizacije receptorja. Signalni kompleks dobi obliko pri kateri se C-terminalna dela ektodomen zdužita na sredini, N-terminalna dela pa se nahajata na nasprotnih koncih. TLR 4 se razlikuje od ostalih TLR glede na vezavo liganda. Slednji vežejo ligand na sredino dimera v C-terminalni del, medtem ko TLR4 veže MD-2 in ligand na konkavno stran, kar pomeni, da dimer vsebuje dva liganda. Dimerizacija ektodomen zbliža znotrajcelični TIR domeni in omogoči prenosa signala preko MyD88-odvisne ali MyD88-neodvisne poti. [7, 9, 18, 19]

1. 4. 1. Vpletenost TLR4 v razvoj bolezni

TLR so receptorji, ki selektivno prepoznajo širok spekter molekulskih vzorcev mikroorganizmov in endogene, izločene iz poškodovanih tkiv gostitelja. Zaznava ligandov s TLR sproži signalno pot, ki aktivira naravno in posredno tudi pridobljeno imunost, nastanek vnetja in regeneracijo lezij. Spremembe, prekomeren ali nereguliran odziv TLR4 na različne ligande je lahko vpleten v patogenezo bolezni, kot so ateroskleroza, avtoimune in infekcijske bolezni, nevropatska bolečina, vnetne bolezni in rak. Prevalenco za bolezni in dovzetnost za virusne ali bakterijske okužbe povečajo tudi polimorfizmi (D299G, T399I) TLR4 receptorja. [17, 22, 23]

Pretirana aktivacija imunskega sistema proti patogenom in masivna produkcija citokinov posreduje nastanek sistemskega vnetja ali sepse. TLR4 je ključen pri prepoznavi G-bakterij, ki povzročijo večino primerov sepse. Dolgotrajna aktivacija TLR4 z LPS povzroči motnje mikrocirkulacije, oslabi kontraktilnost srca in spodbudi razgradnjo ekstracelularnega matriksa. Če sistemsko vnetje spremljata hipotenzija, ki traja več kot uro, in odpovedovanje organov (predvsem ledvic), govorimo o septičnem šoku. Pretirana produkcija citokinov in reaktivnih kisikovih spojin, ki jih posredujejo TLR4, vodi do poškodb jeter. Dodatno razširitev lezije povzročijo endogeni, ki se sproščajo iz poškodovanih hepatocitov in aktivirajo receptorje. LPS preko TLR signalizacije spodbudijo produkcijo TNF- α , IL-12 in MMP-9, ki so pomembni za razgradnjo fibrinskega čepa in destabilizacijo aterosklerotičnega plaka. Kemokini, ROS in RNS ter polimorfizmi

(D299G, T399I) na receptorju prav tako pospešijo razvoj ateroskleroze. Novejše raziskave predlagajo vpletenost TLR4 signalne poti (MAPK, NFκB) v patogenezo inzulinske rezistence. Aktivacija MAPK in NFκB signalne poti v skeletnih mišicah inducira ekspresijo provnetnih molekul (TNF-α, IL-6), ki sprožijo rezistenco na inzulin in oslabljen transport glukoze. Prekomerna prisotnost provnetnih citokinov (IL-6 in 13, TNF-α), kemokinov in imunosupresivnih mediatorjev v tumorskem mikrookolju omogoči rezistenco celic na apoptozo, stimulira rast in progresijo tumorjev ter angiogenezo. Endogeni ligand HMGB1, ki se sprošča iz poškodovanih celic preko TLR4, prispeva k progresiji raka. [22-27, 33]

Prepoznavanje endogenih ligandov preko TLR4 lahko privede do sterilnega vnetja in razvoja avtoimunih ter vnetnih bolezni. Ugotovili so, da je polimorfizem TLR4 (Asp299Gly in Thr399Ile), ki poveča aktivnost receptorja, povezan z razvojem vnetnih črevesnih obolenj, kot sta Chronova bolezen in ulcerozni kolitis. Nepravilno delovanje receptorja na spinalnih mikroglijah in perifernem živčevju stimulira poslabšanje nevropatske bolečine. Fibronektin je ekstracelularni protein, ki nastaja pri poškodbi tkiv in preko TLR4 inducira simptome nevropatske bolečine. [22, 28, 36]

Na nepravilnosti v imunskem odzivu poleg sprememb na receptorju vplivajo tudi mutacije na komponentah, ki sodelujejo v signalni poti. Polimorfizem MD-2 spremeni vezavo in aktivacijo LPS, poveča dovzetnost za sepsa (povzročeno zaradi travm) in disfunkcijo organov. Mutacija na CD14 je povezana z infekcijskimi boleznimi, astmo in alergijami. [22, 23, 31, 35]

Pretirana ekspresija in delovanje receptorjev, spremembe v genskem zapisu in signalnih proteinih korelirajo s tveganjem za nastanek bolezni. Čeprav natančna vloga TLR pri človeških boleznih še ni popolnoma razumljiva, veliko *in vitro* študij in raziskav na živalskih modelih potrjuje vpletenost TLR4 v razvoju bolezni. [32]

1. 4. 2. Inhibicija TLR4 signalizacije

Antagonisti, topni analogi ligandov in monoklonska protitelesa so spojine, ki terapevtsko inhibirajo signalno pot TLR receptorjev. Trenutno so raziskave osredotočene predvsem na

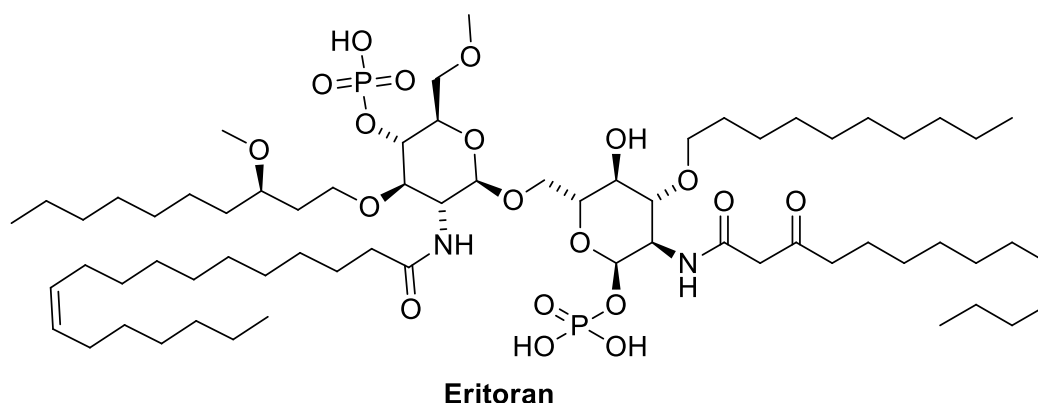
razvoj antagonistov TLR2, 4, 7 in 9 za zdravljenje sepse in vnetnih bolezni, kjer je imunski sistem pretirano dejaven. [24, 32, 35]

PROTITELESA

In vivo in *in vitro* študije so pokazale, da protitelesa proti TLR4 inhibirajo imunski odziv celic, ki so bile izpostavljene patogenom, vendar je njihov učinek odvisen od časa aplikacije odmerka glede na čas nastanka okužbe. Humanizirano protitelo NI-0101 specifično prepozna človeški kompleks MD-2/TLR4 in z vezavo na epitop receptorja preprečuje njegovo dimerizacijo. NI-0101 je trenutno v fazi I kliničnih študij. Raziskave so pokazale, da protitelo 1A6 na mišjih modelih upočasni razvoj kolitisa in oslabi vnetni odziv. Apliciranje protitelesa v času regeneracije kolitisa oslabi celjenje sluznice. Monoklonsko protitelo 15C1 nevtralizira z LPS inducirani signal v prisotnosti ali odsotnosti adaptorja MD-2. Blokiranje adaptorske molekule MyD88 s heptaproteinom ST2825 zavira dimerizacijo in prenos signala. Protitelesa, ki zavirajo TLR4 signalno pot, niso izboljšala izzida bolezni pri ljudeh s sepsom. Možni razlogi za neuspeh so heterogenost ljudi, čas začetka zdravljenja ali vpletenost različnih PRR v razvoj sepse. [24, 31, 35, 36]

ANALOGI LIGANDOV

Eritoran (Slika 4) je sintezni analog lipida A iz bakterije *Rhodobacter capsulatus*, ki selektivno inhibira vezavo LPS oziroma lipida A na MD-2/TLR4 kompleks in tako prepreči posredovanje signala. Kristalna struktura TLR4 z agonistom lipidom A oziroma antagonistom eritoran je razkrila dele molekul, ki so odgovorni za učinek. Lipid A je sestavljen iz fosforiliranih diglukoaminov in šestih acilnih verig, a eritoran sestoji iz fosforiliranega diglukoamina in štirih acilnih verig. Diglukoaminski del gleda izven proteina MD-2 in je izpostavljen topilu, medtem ko fosfatne skupine interagirajo s pozitivno nabitimi ostanki TLR4 receptorja. Iz kristalne strukture sklepajo, da je pet verig lipida A in štiri verige eritorana »potopljenih« v hidrofobni žep MD-2, preostala acilna veriga Lipida A, ki je eritoran nima, pa v hidrofobnem delu TLR4 interagira s fenilalaninom. Ta ojača interakcije med TLR4 in MD-2, kar je ključno za prenos signala in agonistično delovanje. [15, 29, 34, 35]



Slika 4: Molekulska struktura eritorana.

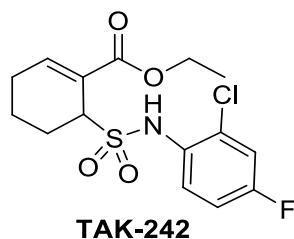
Ne glede na dokaze, da je LPS glavni faktor pri patofiziologiji septičnega šoka, zadnja testiranja eritorana kot antagonista TLR4 za zdravljenje sepse in septičnega šoka niso izboljšala izvida bolezni v fazi III klinične raziskave. Spojina prepreči negativni inotropni efekt LPS na izoliranih miokardnih celicah med endotoksemijo, vendar ne zniža signifikantno umrljivosti pri bolnikih s sepso v primerjavi s placebo terapijo. [23, 24, 29-33]

ANTAGONISTI

TAK-242 ali resatorvid (Slika 5) je majhna molekula, ki inhibira prenos signala preko TLR4. TAK-242 je cikloheksenski derivat, ki se selektivno veže na Cys747 v TIR domeni TLR4 in inhibira prenos signala preko MyD88- in TRIF-odvisne signalne poti. [23, 24, 26, 29, 35]

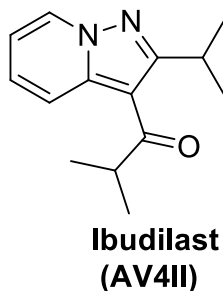
Novejše raziskave odkrivajo, da TAK-242 s selektivno inhibicijo TLR4 modulira inzulinsko dejavnost in presnovo glukoze v mišicah, ki jo stimulira LPS. Spojina inhibira tudi signal, ki ga inducirajo endogeni ligandi, kot je HMGB1. [35]

Čeprav obstajajo številni dokazi o pozitivnih učinkih TAK-242 za zdravljenje sepse, pa rezultati v fazi III klinične raziskave niso pokazali signifikantnega znižanja produkcije citokinov v primerjavi s placebom. Zaradi neizpolnitve meril, potrebnih za podporo nadaljnjih raziskav oziroma nezadostnega učinka spojine, so raziskavo prekinili. [24, 26, 31, 32]



Slika 5: Molekulska struktura TAK-242.

Naslednji antagonist TLR4 receptorja je AV411 ali Ibudilast (Slika 6), ki so ga sprva proučevali za zdravljenje opioidne odvisnosti oziroma kronične bolečine in odtegnitvenega sindroma. Ugotovili so, da spojina zavira delovanje proinflammatoryh citokinov (TNF- α in IL-6) in inducira protivnetne citokine, kot je IL-10. Mehanizem delovanja Ibudilasta še ni znan, vendar menijo, da zavira nevrovnetje. [31, 34]



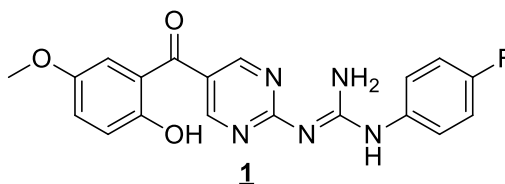
Slika 6: Molekulska struktura ibudilasta (AV411).

Cpn10 ali chaperonin je molekula z protivnetnim in imunomodulatornim delovanjem, ki inhibira signalno pot TLR4. V fazi II klinične raziskave so dokazali varnost in učinkovitost te spojine za zdravljenje revmatoidnega artritisa, psoriaze in multiple skleroze. Cpn10 inhibira z LPS posredovano NF- κ B pot in produkcijo TNF- α in IL-6 pri prostovoljcih.

Ostale potencialne učinkovine

- OPN-401 je virusni peptid, ki inhibira TLR4 signalizacijo. Molekula je trenutno v prekliničnih raziskavah in razvoju.
- CRX-526, analog lipida A in antagonist TLR4, ima krajše sekundarne acilne verige in zmanjšano agonistično delovanje.
- Aminoalkil glukozaminid 4 fosfat oz AGP je mimetik lipida A. Sladkorje na lipidu A so zamenjali z *N*-acetiliran aminoalkil aglikanom. Od lipida A se razlikuje tudi v dolžini sekundarne acetilne maščobne verige.
- Lipid IV inhibira TLR4 signalizacijo s kompeticijo LPS na MD-2. [18, 19, 32, 34]

Pomembna spojina z antagonističnim delovanjem je tudi 1-(4-fluorofenil)-2-(5-(2-hidroksi-4-metoksibenzoil)pirimidin-2-il) gvanidin oziroma spojina **1** (Slika 7). Slednjo so s pomočjo virtualnega rešetanja odkrili in sintetizirali na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Spojina se s pomočjo nekovalentnih interakcij specifično veže na protein TLR4 in tako prepreči tvorbo kompleksa MD-2/TLR4, ki je ključnega pomena pri boleznih, povezanih z imunskim neravnovesjem, kot je sepsa in druge vnetne bolezni. Odkrita spojina ima močno antagonistično delovanje, z IC_{50} vrednostjo 16,6 μ M, je necitotoksična in predstavlja pomembno izhodišče pri iskanju ter razvoju novih nizkomolekularnih antagonistov TLR4. [31]

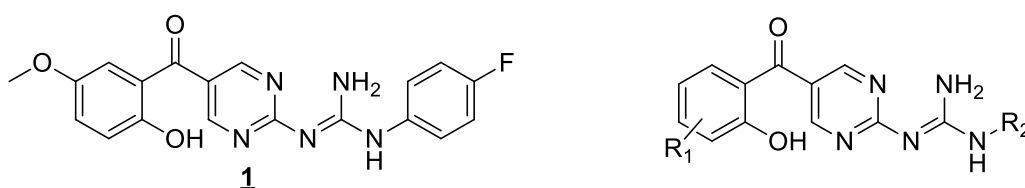


Slika 7: Molekulska struktura spojine **1**.

Molekule, ki modulirajo aktivnost TLR4 receptorja, dajejo nove možnosti za razvoj imunoterapevtikov ali zdravil za preprečitev sepse in zdravljenje infekcijskih ali neinfekcijskih vnetnih bolezni.

2. NAMEN DELA

Na podlagi strukture znanega antagonista 1-(4-fluorofenil)-2-(5-(2-hidroksi-4-metoksibenzoil) pirimidin-2-il) gvanidina (spojina **1**, Slika 8), ki se z nekovalentnimi interakcijami veže na receptor TLR4 in prepreči tvorbo kompleksa MD-2/TLR4 [31], bomo sintetizirali analoge omenjene spojine in ovrednotili njihovo potencialno antagonistično delovanje na TLR4 (Slika 8).



Slika 8: Molekulska struktura spojine **1** na levi in splošna struktura spojine z označenimi modifikacijami na desni.

Naši cilji so naslednji:

1. Iz različno substituiranih derivatov 2-hidroxiacetofenona bomo sintetizirali analoge spojine **1**. Pripravili bomo analoge z metoksi skupino na mestu 4 in 5 na benzoilnem delu molekule in različnimi amini na gvanidinskem delu.
2. Sinteze bomo izvedli po dveh različnih poteh. Uporabili bomo klasični postopek in postopek z mikrovalovnim reaktorjem.
3. Sintetiziranim končnim spojinam bomo preverili topnost v celičnem mediju in ovrednotili njihovo potencialno citotoksičnost na celični liniji HEK293.
4. Spojinam bomo določili tudi njihovo antagonistično delovanje. Predvidevamo, da bo substitucija na mestu 4 na benzoilnem delu molekule ohranila ali celo izboljšala antagonistično delovanje.

3. MATERIALI IN METODE

3. 1. Materiali

Pri delu smo uporabljali reagente in topila različnih proizvajalcev: Acros Organics, Carlo Erba reagents, Gram-mol, Invivogen, Maybridge, Merck, Panreac, Sigma-Aldrich (Aldrich, Fluka, Sigma) in TCI.

Uporabljeni reagenti so bili: 2,4-dihidroksiacetofenon (Aldrich, 99 %), 2-hidroksi-4-metoksiacetofenon (Aldrich, 99 %), 2-hidroksi-4,5-dimetoksiacetofenon (Aldrich, ≥ 98 %), 4-fluoroanilin (Acros, 98 %), 4-metoksianilin (Aldrich, ≥ 99 %), cianogvanidin (Acros, 99,5 %), trifosgen (TCI, ≥ 99 %), izopropanol (Merck, 99,5 %), kalijev hidroksid (Merck, ≥ 99 %), LPS (Aldrich, ≥ 99 %), morfolin (Aldrich, ≥ 99 %), očetna kislina (Merck, $\geq 99,8$ %), oksalil klorid (Acros, 98 %), piperazin (Aldrich, 99 %), TAK-242 (Invivogen, 99,2 %) , TMS-Cl (Acros, 98 %).

Topila, ki smo jih uporabljali pri sintezi in čiščenju: acetonitril, aceton, dietileter, diklorometan, dikloroetan, eter, etilacetat, heksan, metanol, *N,N*-dimetilformamid (DMF), petroleter, prečiščena voda in tetrahidrofuran (THF).

Ostala laboratorijska oprema

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

3. 2. Metode

Kromatografske metode

Tankoplastna kromatografija (TPK, angl. TLC): Uporabili smo plošče Silikagel 60 F254 proizvajalca Merck z 0,20 mm debelim nanosom silikatnega gela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem. Uporabljali smo različne mobilne faze, ki so

navedene pri vsaki spojini posebej. Za detekcijo spojin smo uporabili UV svetlobo valovne dolžine $\lambda = 254$ nm ali $\lambda = 366$ nm ter orositveni reagent ninhidrin (15 mg/mL ninhidrin, raztopljen v 96 % etanol/ocetni kislini = 5/1).

Kolonska kromatografija: Za čiščenje spojin smo kot separacijsko tehniko uporabili »flash« kolonsko kromatografijo. V vseh primerih je bila stacionarna faza silikagel z velikostjo delcev 0,04 – 0,063 mm (Silikagel 60, proizvajalca Merck). Mobilne faze smo uporabljali različne in so navedene pri vsaki spojini posebej.

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. HPLC): Reverznofazno visokotlačno tekočinsko kromatografijo, s katero smo določili čistost končnih spojin, smo izvedli na Agilent 1100 sistemu. Uporabili smo Agilent Eclipse Plus C18 kolono (4.6 x 50 mm, 5 μ m) s hitrostjo pretoka 1,0 mL/min in detekcijo pri valovni dolžini 220 nm in 254 nm. Elucijski sistem sta sestavljali spojina A (0,1 % TFA v H₂O) in spojina B (metanol). Gradient za metodo je bil prvih 20 minut 10 % B → 90 % B v A, med 20. in 25. minuto 90 % B v A ter med 25. in 30. minuto 90 % B → 10 % B v A. Analiza je potekala 30 minut pri temperaturi 25 °C. Določena relativna čistoča vseh testiranih spojin je bila ustrezna in je presegala zahtevanih 95,0 %.

Spektroskopske metode

Jedrski magnetna resonanca (angl. NMR): NMR spekter (¹H-NMR in ¹³C-NMR) posameznih spojin smo posneli z Bruker AVANCE 400 DPX spektrometrom na Fakulteti za farmacijo (400 MHz za ¹H, 100 MHz na ¹³C) pri temperaturi 298 K (25 °C). Kot interni standard smo uporabili TMS (δ 0,00 ppm) in devterirana topila DMSO-*d*₆ (δ 2,50 ppm), CDCl₃ (δ 7,25 ppm), aceton-*d*₆ (δ 2,05 ppm), metanol-*d*₄ (δ 3,35 ppm, 4,80 ppm). Kemijske premike smo podali v »parts per million« (ppm), in sklopitvene konstante (*J*) pa v hertzih (Hz). Za analizo NMR spektrov smo uporabili računalniški program MestReNova 8.1 proizvajalca Mestrelab Research S.L.

Masna spektroskopija: Masne spektre so posneli na masnem spektrometru VG-Analytical AutoSpec Q mass proizvajalca Micromass z ESI tehniko v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

Določanje tališča

Temperaturo tališč (T_{tal}) smo določili s Koflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico Leica in so nekorrigirana.

Mikrovalovni reaktor

Določene stopnje sinteze spojin smo izvedli v mikrovalovnem reaktorju CEM Discover z IR in z optičnim načinom merjenja temperature.

Nomenklatura in risanje spojin

Strukturne formule smo narisali v programu ChemDraw Ultra proizvajalca CambridgeSoft. Za risanje slik in shem smo uporabili računalniški program ChemBioDraw Ultra 13.0 proizvajalca CambridgeSoft. Pri iskanju spojin in sinteznih postopkov v podatkovnih bazah smo si pomagali s programom SciFinder-Scholar.

Biološka testiranja

Test topnosti in citotoksičnosti: Končne spojine smo raztopili v DMSO-ju koncentracije 250 μ M in jih dodali v medij celične kulture DMEM. Topnost oziroma prisotnost precipitantov v raztopinah smo preverili z mikroskopom Nikon Eclipse TE300.

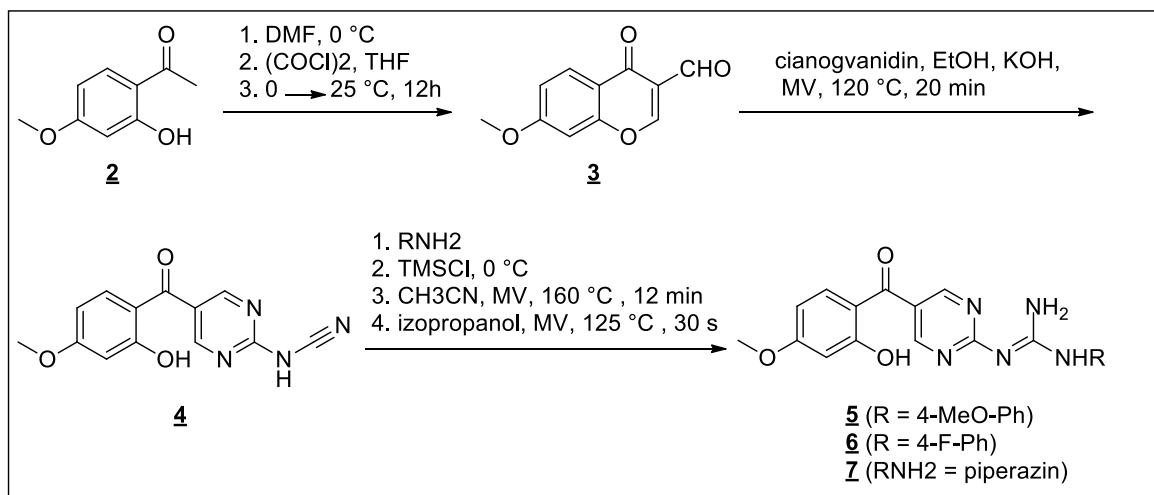
Test citotoksičnosti topnih spojin smo opravili na celični liniji HEK293 (Invivogen, USA). Celice smo nacepili na 96-vodnih plošč in jih kultivirali v prisotnosti in odsotnosti spojin s koncentracijo 10, 20, 50, 100 in 250 μ M. Za kontrolo smo uporabili čisti DMSO. Po 24 urah inkubiranja smo celice obdelali in obarvali z MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol) z namenom opazovanja preživelih celic. Žive celice imajo namreč sposobnost redukcije MTS-a v obarvan formazan, medtem ko mrtve te zmožnosti nimajo. Intenziteta obarvanega produkta je sorazmerna številu preživelih celic. Za analizo rezultatov smo določili absorbanco obarvanega produkta pri 492 nm na čitalcu Epoch (Biotek Instruments).

Določanje antagonistične aktivnosti: Za vrednotenje antagonistične aktivnosti izbranih spojin na TLR4 smo uporabili reportersko celično linijo HEK-BlueTM-hTLR4 (Invivogen). Te celice selektivno izražajo TLR4 receptor in aktivirajo sekrecijske

embrionske alkalne fosfataze (SEAP) oziroma reporter gen preko agonistov TLR4. Antagonistično delovanje spojin je bilo testirano po navodilih proizvajalca. Lipopolisaharid (Sigma-Aldrich, USA), ki je agonist TLR4, je predstavljal negativno kontrolo. Za pozitivno kontrolo smo uporabili komercialno dostopen antagonist TLR4, TAK-242 (Invivogen, USA). Za vrednotenje antagonističnega delovanja spojin smo celice najprej gojili po navodilih proizvajalca. Nato smo jih predinkubirali s spojinami z različnimi koncentracijami za 2 uri pri 37 °C. Kasneje smo celice izpostavili LPS-u (5 ng/ml) za 20 ur. Naslednji dan smo vzorčili supernatant in analizirali ekspresijo SEAP s kolorimetrično metodo. IC₅₀ vrednosti smo določili na podlagi inhibiranja ekspresije SEAP v mediju oziroma z merjenjem zmanjšanja absorbance.

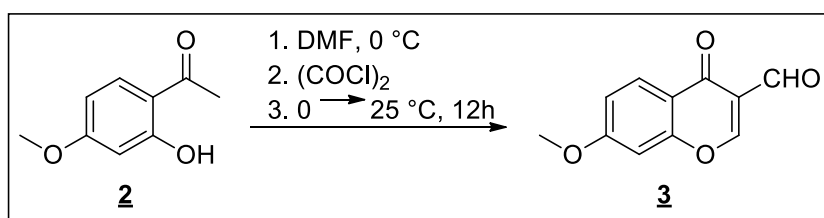
4. EKSPERIMENTALNI DEL

4. 1. REAKCIJSKA SHEMA SINTEZE SPOJIN 5, 6 in 7



Slika 9: Reakcijska shema sinteze končnih spojin **5**, **6** in **7**.

4. 1. 1. Sinteza 7-metoksi-4-okso-4H-kromen-3-karbaldehida (**3**)

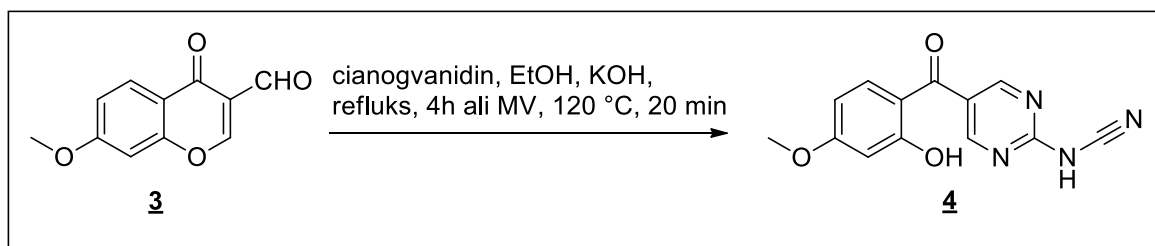


Slika 10: Reakcijska shema sinteze spojine **3**.

V suho bučko (prežarjeno z grelni pištolo in preprihano z argonom) smo natehtali 2-hidroksi-4-metoksiacetofenon **2** (1,2 g; 7,0 mmol) in ga raztopili v *N,N*-dimetilformamidu (15 mL). Reakcijsko zmes smo postavili na ledeno kopel in v argonovi atmosferi po kapljicah dodajali oksalil klorid (3,5 mL; 40 mmol). Nato smo mešali še 30 minut pri 0 °C in 12 ur pri sobni temperaturi. Reakcijsko zmes smo nato zlili na zdrobljen led (20 g) in spirali z diklorometanom (3 x 50 mL). Združene organske faze smo sprali še z nasičeno raztopino NaCl (50 mL), sušili z brezvodnim Na₂SO₄ in filtrirali. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom na rotavaporju in oljnat zaostanek čistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/heksan = 2/1). Prvo stopnjo sinteze spojine **3** smo izvedli dvakrat. Resintezni postopek je bil enak zgornjemu.

7-metoksi-4-okso-4H-kromen-3-karbaldehid (3)		M _r = 204,18
Izgled	Rumenobeli kristali	
Izkoristek	37 %	
Rf	0,44 (MF = EtOAc/heksan = 2/1)	
T _{tal}	188-189 °C (v literaturi [31]: 188 °C)	
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) 3,93 (s, 3H, OCH ₃); 6,91 (d, J = 2,0 Hz; 1H, Ar-H), 7,04 (dd, J ₁ = 8,8 Hz; J ₂ = 2,0 Hz; 1H, Ar-H); 8,19 (d, J = 8,8 Hz; 1H, Ar-H); 10,37 (s, 1H, CHO)	

4. 1. 2. Sinteza *N*-(5-(2-hidroksi-4-metoksibenzoil) pirimidin-2-il)cianamida (**4**)



Slika 11: Reakcijska shema sinteze spojine **4**.

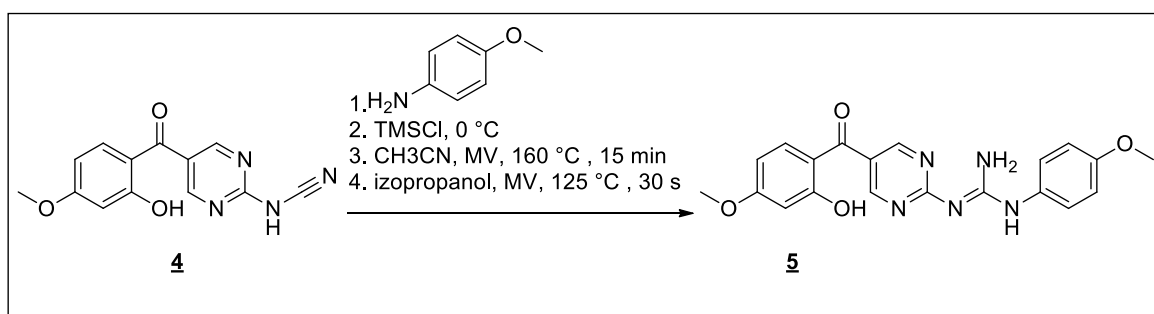
V suho bučko smo natehtali spojino **3** (0,43 g; 2,1 mmol) in *cianogvanidin* (0,27 g; 3,2 mmol; 1,5 ekvivalenta) ter ju raztopili v brezvodnem *etanolu* (10 mL). K reakcijski zmesi smo dodali *KOH* (0,34 g; 6,0 mmol) in segrevali 4 ure pod refluxom na oljni kopeli. Reakcijo smo izvajali v argonovi atmosferi.

Po končani reakciji smo reakcijsko zmes ohladili na sobno temperaturo in jo previdno prelili na zdrobljen led (cca. 20 g). Z dodajanjem očetne kisline po kapljicah smo nevtralizirali do pH = 4-5 in ekstrahirali z EtOAc (2 x 50 mL). Organsko fazo smo sušili z brezvodnim Na₂SO₄, sušilno sredstvo odfiltrirali in topilo odparili pod znižanim tlakom. Sledilo je čiščenje produkta s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/heksan = 2/1 → EtOAc → EtOAc/MeOH = 5/1) in prekristalizacija najčistejše frakcije s petroletrom.

Drugo stopnjo sinteze spojine **4** smo izvedli dvakrat. Resintezni postopek je bil enak zgornjemu in dobili smo primerljive izkoristke (29 % oziroma 26 %).

<i>N</i>-(5-(2-hidroksi-4-metoksibenzoil) pirimidin-2-il) cianamid (4)		M_r = 270,24
Izgled	peščeno-rumeni kristali	
Izkoristek	29 %	
R_f	0,10 (MF = EtOAc)	
T_{tal}	> 300 °C	
¹H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ (ppm) 3,81 (s, 3H, OCH ₃); 6,49-6,53 (m, 2H, Ar-H); 7,48 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz; 1H, Ar-H); 8,43 (s, 2H, Ar-H); 11,75 (s, 1H, NH)	
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ (ppm) 54,3; 103,5; 106,8; 119,3; 120,9; 122,4; 132,5; 159,4; 160,8; 163,6; 170,3; 191,5	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₃ H ₁₁ N ₄ O ₃ (m/z): 271,0831 [M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z): 271,0839 Izračunano za C ₁₃ H ₉ N ₄ O ₃ (m/z): 269,0675 [M-H] ⁻ Izmerjena vrednost (m/z): 269,0671	

4. 1. 3. Sinteza 1-(4-metoksifenil)-3-(5-(2-hidroksi-4-metoksibenzoil) pirimidin-2-il) gvanidina (**5**)



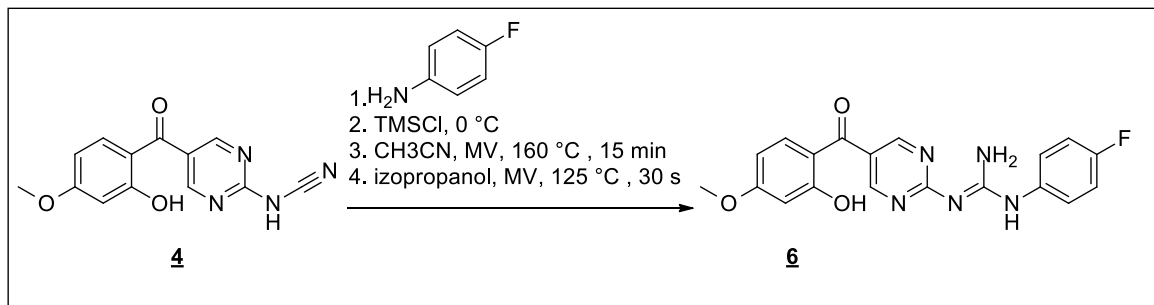
Slika 12: Reakcijska shema sinteze spojine **5**.

V suho epruveto za mikrovalovni reaktor smo natehtali spojino **4** (120 mg; 0,44 mmol), 4-metoksianilin (57 mg; 0,47 mmol) in dodali še acetonitril (3 ml) ter dobro premešali. Nato smo v argonovi atmosferi po kapljicah dodajali *TMS-Cl* (125 µL; 0,98 mmol; 2,2

ekvivalenta), zatesnili in segrevali 15 minut v mikrovalovnem reaktorju pri 160 °C. Ko je temperatura reakcijske zmesi padla pod 60 °C, smo v epruveto dodali *izopropanol* (102 µL; 1,33 mmol; 3 ekvivalente), stresali 10 sekund in nato ponovno segrevali 30 sekund v mikrovalovnem reaktorju pri 125 °C. Po končani reakciji smo počakali, da se je zmes ohladila na sobno temperaturo, vsebino epruvete prenesli v bučko in odparili topilo pod znižanim tlakom. Oljnat zaostanek smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/heksan = 2/1 → EtOAc → EtOAc/MeOH = 5/1). Izoliran surov produkt smo dodatno očistili še s prekristalizacijo, tako da smo ga raztopili v 10 mL DKM in dobljeno oranžno-rjavo raztopino kapljali v dietileter/petroleter = 2/1 (60 mL). Izpadli so rumeni kristali, ki smo jih ločili s filtracijo z odsesavajem.

1-(4-metoksifenil)-3-(5-(2-hidroksi-4-metoksibenzoil) pirimidin-2-il) gvanidin (5)		M_r = 393,40
Izgled	rumeni kristali	
Izkoristek	67 %	
Rf	0,60 (MF = EtOAc/MeOH = 5/1)	
T_{tal}	127-133 °C	
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ (ppm) 3,66 (s, 3H, OCH ₃); 3,74 (s, 3H, OCH ₃); 6,54-6,57 (m, 2H, Ar-H); 6,90-6,94 (m, 2H, Ar-H); 7,24 (t, 1H, <i>J</i> = 8,0 Hz; Ar-H); 7,33-7,36 (m, 2H, Ar-H); 7,93 (rs, 2H, NH ₂); 8,60 (s, 2H, 2 x pirimidin-H); 9,58 (rs, 2H, OH in NH)	
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ (ppm) 55,2; 55,5; 102,2; 108,6; 114,1; 115,0; 121,0; 124,2; 130,9; 131,1; 155,1; 155,9; 157,0; 157,2; 158,7; 167,0; 190,6	
HPLC Rt	14,581 min	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₂₀ H ₂₀ N ₅ O ₄ (m/z): 394,1515 [M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z): 394,1519	

4. 1. 4. Sinteza 1-(4-fluorofenil)-3-(5-(2-hidroksi-4-metoksibenzoil)pirimidin-2-il) gvanidina (**6**)

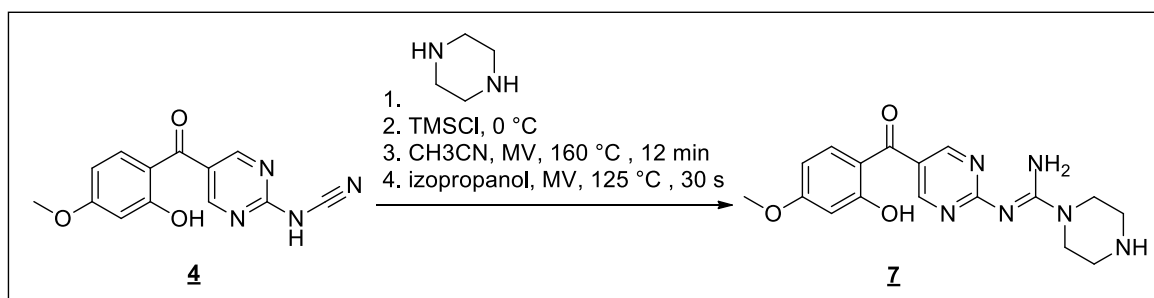


Slika 13: Reakcijska shema sinteze spojine **6**.

V suho epruveto za mikrovalovni reaktor smo natehtali spojino **4** (0,08 g; 0,30 mmol) in 4-fluoroanilin (0,32 mmol oziroma 1,05 ekvivalenta), ju raztopili v acetonitrilu (3 mL) in prepihali z argonom. Na ledeni kopeli smo nato po kapljicah dodali TMS-Cl (85 μL ; 0,67 mmol oziroma 2,2 ekvivalenta) in segrevali 12 minut v mikrovalovnem reaktorju pri 160 °C. Ko je temperatura reakcijske zmesi padla pod 60 °C, smo v epruveto dodali izopropanol (70 μL ; 0,91 mmol), močno stresali 10 sekund in nato ponovno segrevali 30 sekund v mikrovalnem reaktorju pri 125 °C. Po končani reakciji smo počakali, da se je zmes ohladila na sobno temperaturo ter vsebino epruvete prenesli v bučko in odparili topilo. Zaostanek smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/heksan = 2/1). Dobljenim frakcijam smo odparili topilo in spojino dodatno očistili s prekrystalizicijo z mešanico eter/ petroleter = 1/10.

1-(4-fluorofenil)-3-(5-(2-hidroksi-4-metoksibenzoil) pirimidin-2-il) gvanidin (6)	M_r = 381,36
Izgled	rumeni kristali
Izkoristek	18 %
R_f	0,50 (MF = EtOAc/MeOH=5/1)
T_{tal}	238-243 °C
¹H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ (ppm) 3,83 (s, 3H, OCH ₃); 6,54-6,58 (m, 2H, Ar-H); 7,14-7,19 (m, 2H, Ar-H); 7,53-7,57 (m, 3H, Ar-H); 7,99 (rs, 2H, NH ₂); 8,73 (s, 2H, 2 x pirimidin-H); 2H od OH in NH ₂ sta izmenjana
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ (ppm) 55,6; 101,2; 106,9; 115,3; (d, <i>J</i> _{C,F} = 22,8 Hz); 115,6; 122,0; 123,3 (d, <i>J</i> _{C,F} = 7,7 Hz); 133,5; 135,6; 156,0; 158,2; (d, <i>J</i> _{C,F} = 239,8 Hz); 158,5; 161,9; 164,8; 166,4; 193,0
HPLC Rt	16,085 min
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₉ H ₁₇ FN ₅ O ₃ (m/z): 382,1315 [M+H]⁺ Izmerjena vrednost (m/z): 382,1313

4. 1. 5. Sinteza 1-(5-(2-hidroksi-5-metoksibenzoil) pirimidin-2-il)-3-(piperazin) gvanidina (7)

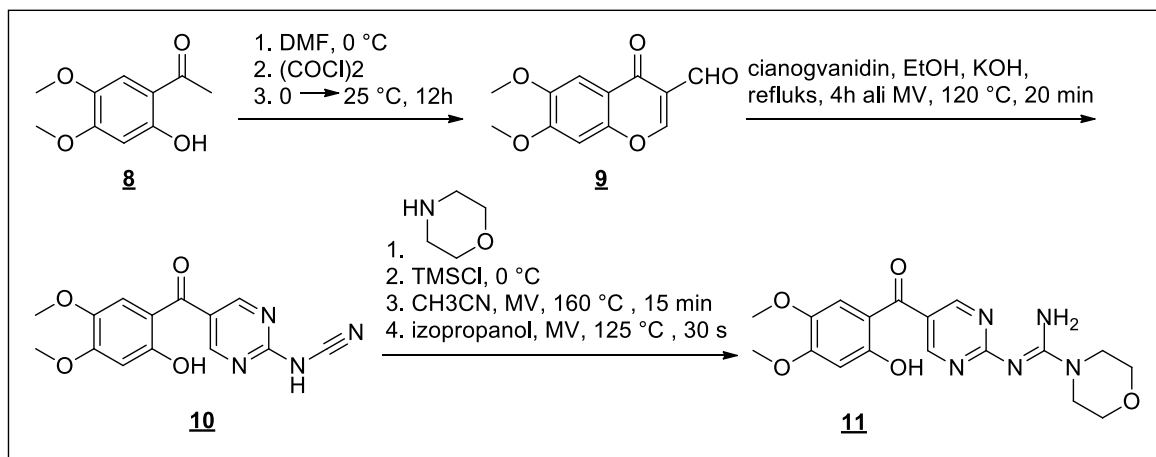


Slika 14: Reakcijska shema sinteze spojine 7.

V suho epruveto za mikrovalovni reaktor smo natehtali spojino **4** (130 mg; 0,48 mmol), *piperazin* (43 mg; 1,06 mmol) in dodali še *acetonitril* (3,5 ml) ter dobro premešali. Nato smo v argonovi atmosferi po kapljicah dodajali *TMS-Cl* (135 μ L; 0,98 mmol; 2,2 ekvivalenta), zatesnili in segrevali 15 minut v mikrovalovnem reaktorju pri 160 °C. Ko je temperatura reakcijske zmesi padla pod 60 °C, smo v epruveto dodali *izopropanol* (110 μ L; 1,44 mmol; 3 ekvivalente), stresali 10 sekund in nato ponovno segrevali 30 sekund v mikrovalovnem reaktorju pri 125 °C. Po končani reakciji smo počakali, da se je zmes ohladila na sobno temperaturo, vsebino epruvete prenesli v bučko in odparili topilo pod znižanim tlakom. Zaostanek smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/MeOH = 5/1 \rightarrow EtOAc/MeOH = 2/1). Dobljenim frakcijam, ki so vsebovale spojino, smo odparili topilo in ponovno očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/MeOH = 10/1).

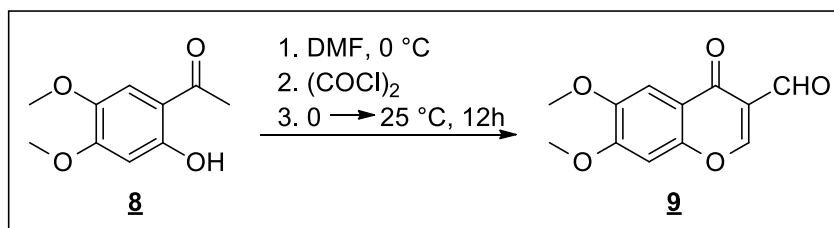
<u>1-(5-(2-hidroksi-4-metoksibenzoil) pirimidin-2-il)-3-(piperazin) gvanidina (7)</u>		M_r = 356,38
Izgled	temno oranžni kristali	
Izkoristek	23 %	
R_f	0,10 (MF = CH ₃ CN/MeOH/H ₂ O = 3/1/1); 0,20 (MF = EtOAc)	
T_{tal}	108-113 °C	
¹H-NMR (400 MHz, MeOD-<i>d</i>₄)	δ (ppm) 1,93 (s, 1H, piperazin-NH); 2,80-2,82 (m, 2H, 2 x piperazin-H); 2,85-2,88 (m, 2H, 2 x piperazin-H); 3,51-3,54 (m, 2H, 2 x piperazin-H); 3,55-3,58 (m, 2H, 2 x piperazin-H); 3,86 (s, 3H, OCH ₃); 6,50-6,54 (m, 2H, Ar-H); 7,58 (d, 1H, <i>J</i> = 8,8 Ar-H); 8,72 (s, 2H, 2 x pirimidin-H); 3H od OH in NH ₂ so izmenjani	
¹³C-NMR (100 MHz, MeOD-<i>d</i>₄)	δ (ppm) 44,9; 46,5; 56,3; 102,4; 108,5; 116,7; 124,1; 135,3; 155,6; 156,2; 159,5; 159,9; 166,4; 195,7	
HPLC Rt	11,417 min	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₇ H ₂₁ N ₆ O ₃ (m/z):	357,1675 [M+H]⁺
	Izmerjena vrednost (m/z):	357,1673

4. 2. REAKCIJSKA SHEMA SINTEZE 1-(5-(2-HIDROKSI-4,5-DIMETOKSIBENZOIL) PIRIMIDIN-2-IL)-3-(MORFOLIN) GVANIDINA (**11**)



Slika 15: Reakcijska shema sinteze končne spojine **11**.

4. 2. 1. Sinteza 6,7-dimetoksi-4-okso-4H-kromen-3-karbaldehida (**9**)

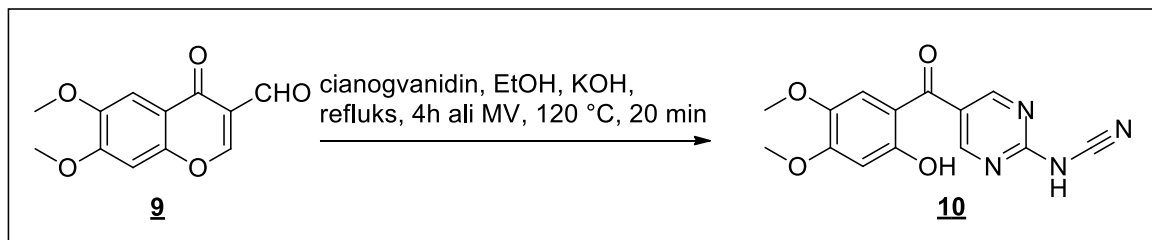


Slika 16: Reakcijska shema sinteze spojine **9**.

V suho bučko smo natehtali spojino **8** (1,4 g; 7,0 mmol), jo raztopili v brezvodnem *DMF* (15 mL; 35 mmol) in prepihali z argonom. Reakcijsko zmes smo postavili na ledeno kopel in po kapljicah dodali *oksalil klorid* (3,5 mL; 40 mmol). Nato smo mešali še 30 minut pri 0 °C in 12 ur pri sobni temperaturi. Reakcijsko zmes smo zlili na zdrobljen led (20 g) in spirali z diklorometanom (3 x 50 mL). Združene organske faze smo sprali še z nasičeno raztopino NaCl (50 mL), sušili z brezvodnim Na₂SO₄ in filtrirali. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom na rotavaporju in oljnat vijoličen zaostanek čistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/heksan = 1/2 → EtOAc/heksan = 1/1 → EtOAc/ heksan = 2/1).

6,7-dimetoksi-4-okso-4H-kromen-3-karbaldehid (9)		M_r = 234, 20
Izgled	oranžno rjavi kristali	
Izkoristek	12 %	
R_f	0,26 (MF = heksan/MeOH = 1/1); 0,32 (MF = EtOAc/ heksan = 2/1)	
T_{tal}	218-221 °C (v literaturi [50]: 226-226,5 °C)	
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) 4,03 (s, 6H, 2 x OCH ₃); 6,96 (s, 1H, Ar-H); 7,63 (s, 1H, Ar-H); 8,52 (s, 1H, Ar-H); 10,44 (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	

4. 2. 2. Sinteza *N*-(5-(2-hidroksi-4,5-dimetoksibenzoil) pirimidin-2-il) cianamida (**10**)



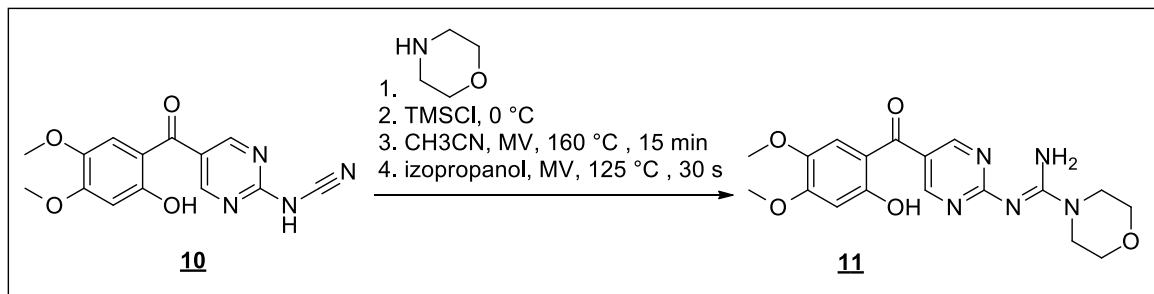
Slika 17: Reakcijska shema sinteze spojine **10**.

V suho epruveto za mikrovalovni reaktor smo natehtali spojino **9** (0,21 g; 0,90 mmol), *cianogvanidin* (0,11 g; 1,35 mmol; 1,5 ekvivalenta) in ju raztopili v brezvodnem *etanolu* (5 mL). K reakcijski zmesi smo dodali uprašen *KOH* (0,14 g; 2,56 mmol) in segrevali 40 minut v mikrovalovnem reaktorju pri 120 °C. Po končani reakciji smo reakcijsko mešanico ohladili na sobno temperaturo in jo previdno zlili na zdrobljen led (cca. 20 g). Z dodajanjem očetne kisline po kapljicah smo nevtralizirali do pH = 4 in nato ekstrahirali z EtOAc (2 x 50 mL). Organsko fazo smo sušili z Na₂SO₄, sušilno sredstvo odfiltrirali s presesavanjem in topilo odparili pod znižanim tlakom. Zaostanek smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/ heksan = 2/ 1 → EtOAc → EtOAc/ MeOH = 5/ 1). Nato smo zadovoljivo čiste frakcije združili in z dodajanjem petroletra so izpadli peščeno rumeni kristali, ki smo jih izolirali s filtracijo z odsesavanjem.

Drugo stopnjo sinteze spojine **10** smo izvedli dvakrat. V drugem poizkusu smo reakcijsko zmes segrevali 4 ure pod refluksom, nadaljni postopek je bil enak zgornjemu.

<i>N</i> -(5-(2-hidroksi-4,5-dimetoksibenzoil)pirimidin-2-il) cianamid (10)		Mr = 300, 27
Izgled	rumeni kristali	
Izkoristek	46 % MV, 75 % 4h refluks	
Rf	0,28 (MF = EtOAc/MeOH = 5/1)	
T_{tal}	248-251 °C	
¹H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ (ppm) 3,71 (s, 3H, OCH ₃); 3,83 (s, 3H, OCH ₃); 6,59 (s, 1H, Ar-H); 7,00 (s, 1H, Ar-H); 8,51 (s, 2H, 2 x pirimidin-H); 11,59 (s, 1H, NH); 1H od OH je izmenjan	

4. 2. 3. Sinteza 1-(5-(2-hidroksi-4,5-dimetoksibenzoil)pirimidin-2-il)-3-(morfolin)gvanidina (**11**)

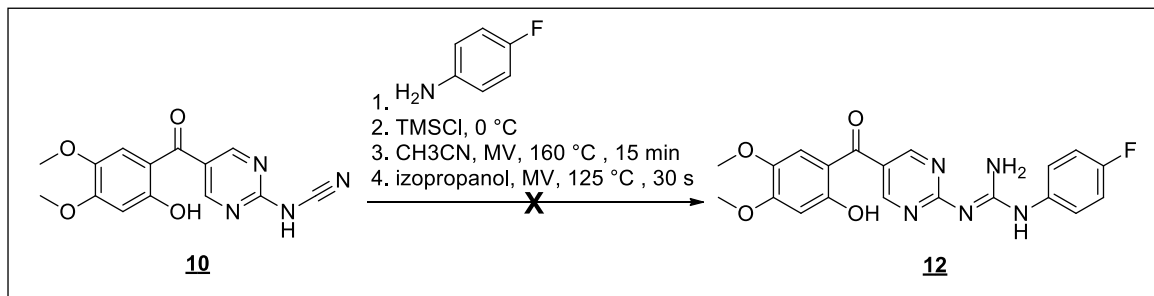


Slika 18: Reakcijska shema sinteze spojine **11**.

V epruveto za mikrovalovni reaktor smo natehtali spojino **10** (0,10 g; 0,32 mmol) in *morfolin* (30 μ L; 0,34 mmol oziroma 1,05 ekvivalenta), ju raztopili v brezvodnem *acetonitrilu* (4 mL) ter prepihali z argonom. Na ledeni kopeli smo nato po kapljicah dodali *TMS-Cl* (91 μ L; 0,71 mmol oziroma 2,2 ekvivalenta) in segrevali 12 minut v mikrovalovnem reaktorju pri 160 °C. Ko je temperatura reakcijske zmesi padla pod 60 °C, smo v epruveto dodali *izopropanol* (74 μ L; 0,97 mmol) in močno stresali 10 sekund. Pri segrevanju je tlak ves čas nihal morebiti zaradi neustrezno zaprtega ali poškodovanega pokrovčka, zaradi česar po dodatku izopropanola zmesi nismo ponovno segrevali. Po končani reakciji smo počakali, da se je zmes ohladila na sobno temperaturo, vsebino epruvete prenesli v bučko in odparili topilo. Zaostanek smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/heksan = 1/2 \rightarrow EtOAc).

1-(5-(2-hidroksi-4,5-dimetoksibenzoil) pirimidin-2-il)-3-(morfolin) gvanidin (11)	Mr = 387, 15
Izgled	oranžni kristali
Izkoristek	21 %
Rf	0,20 (MF = EtOAc/heksan = 1/2)
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ (ppm) 3,56-3,58 (m, 4H, 4 x morfolin-H); 3,63-3,65 (m, 4H, 4 x morfolin-H); 3,77 (s, 3H, OCH ₃); 3,79 (s, 3H, OCH ₃); 6,46 (s, 1H, Ar-H); 7,38 (s, 1H, Ar-H); 8,37-8,57 (m, 3H; 2 x pirimidin-H in OH); 2H od NH ₂ sta izmenjana
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ (ppm) 44,1; 55,5; 56,4; 65,8; 101,4; 107,5; 110,0; 126,9; 141,6; 153,5; 155,2; 156,5; 157,8; 164,9; 194,0
ESI-MS	388 [M+H]⁺
HPLC Rt	13,152 min

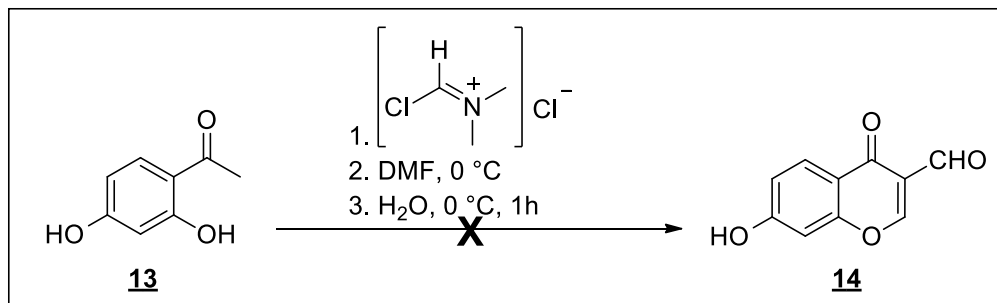
4. 2. 4. Poskus sinteze 1-(4-fluorofenil)-3-(5-(2-hidroksi-4,5-dimetoksibenzoil) pirimidin-2-il) gvanidina (12)



Slika 19: Reakcijska shema sinteze spojine 12.

V epruveto za mikrovalovni reaktor smo natehtali spojino **10** (0,06 g; 0,21 mmol), 4-fluoroanilin (21 μ L; 0,22 mmol oziroma 1,05 ekvivalenta), ju raztopili v brezvodnem acetonitrilu (4 mL) in prepihali z argonom. Na ledeni kopeli smo nato po kapljicah dodali TMS-Cl (58 μ L; 0,45 mmol oziroma 2,2 ekvivalenta) in segrevali 12 minut v mikrovalovnem reaktorju pri 160 °C. Ko je temperatura reakcijske zmesi padla pod 60 °C, smo v epruveto dodali izopropanol (47 μ L; 62 mmol), močno stresali 10 sekund in nato ponovno segrevali 30 sekund v mikrovalnem reaktorju pri 125 °C. Po končani reakciji smo počakali, da se je zmes ohladila na sobno temperaturo, vsebino epruvete prenesli v bučko in odparili topilo. Zaostanek smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF = DKM/heksan = 2/1 \rightarrow DKM \rightarrow DKM/MeOH = 5/1). Pri tem postopku nismo izolirali naše spojine, saj nam ne NMR ne masna spektroskopija nista potrdila prisotnosti želenega produkta.

4. 3. POSKUS SINTEZE SPOJINE 7-HIDROKSI-4-OKSO-4H-KROMEN-3-KARBALDEHIDA (14)



Slika 20: Reakcijska shema sinteze spojine 14.

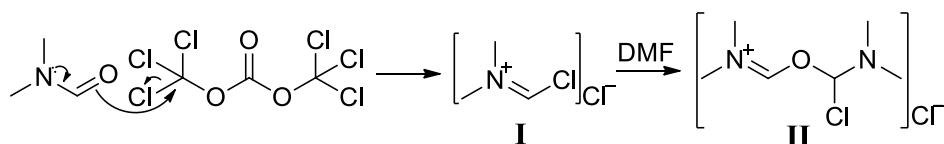
V suho, z argonom preprihana bučko smo natehtali *trifosgen* (3,6 g; 12 mmol) in ga raztopili v *dikloroetanu* (8 mL). Pripravljeno raztopino smo po kapljicah dodali v mešanico brezvodnega *DMF* (6,0 ml; 78 mmol) in *dikloroetana* (8,3 mL). Reakcijsko zmes smo postavili na ledeno kopel in pustili mešati 20 minut. Po pretečenem času smo kopel odstranili in pustili mešati na sobni temperaturi (20 °C) čez noč, da je nastal Vilismeierjev reagent.

Reagentu smo med mešanjem na ledeni kopeli po kapljicah dodali spojino **13** (0,78 g; 5,1 mmol), raztopljeno v *dikloroetanu* (10 ml). Nato smo zmes zlili na zdrobljen led (cca.20 g) in pustili mešati 1h. Sledila je ekstrakcija z diklorometanom (2x50 mL), spiranje organske faze z nasičeno raztopino NaCl (50 mL) in sušenje z brezvodnim Na_2SO_4 (3,0 mg). Sušilno sredstvo smo odfiltrirali z odsesavanjem, topilo odparili pod znižanim tlakom in produkt očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/heksan = 1/2 → EtOAc/heksan = 1/1 → EtOAc → EtOAc/MeOH = 10/1). Pri tem postopku nismo izolirali naše spojine, saj nam ne NMR ne masna spektroskopija nista potrdila prisotnosti želenega produkta.

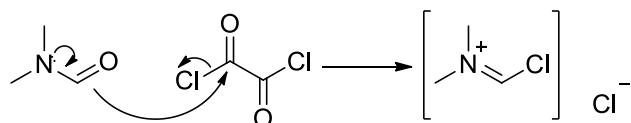
5. REZULTATI IN RAZPRAVA

Za sintezo analogov spojine **1** smo uporabili tristopenjski sintezni postopek. Izhajali smo iz različno substituiranih 2-hidroksiacetofenonov. V prvi stopnji smo s pomočjo Vilsmeier-Haackovega reagenta izvedli formiliranje aromatskega obroča in tvorili 3-formilkromon. Sledila je tvorba pirimidinskega obroča s pomočjo cianogvanidina. V tretji stopnji smo izvedli nukleofilno adicijo na ciano skupino produkta 2. stopnje in tvorili različne derivate gvanidina.

V prvi stopnji smo se najprej lotili priprave Vilsmeier-Haack-ovega reagenta. Sintezo smo izvedli po dveh različnih poteh. Na začetku smo za tvorbo Vilsmeier-Haackovega reagenta (spojina **I**, Slika 21) uporabili trifosgen in *N,N*-dimetilformamid (DMF). Zaradi nevarnosti pretvorbe trifosgena v fosgen ob prisotnosti vlage smo pri vseh naslednjih sintezah le-tega zamenjali z oksalil kloridom (Slika 22), ki je nekoliko varnejši, vendar povzroči burnejšo reakcijo. [31, 36-38, 40, 41]

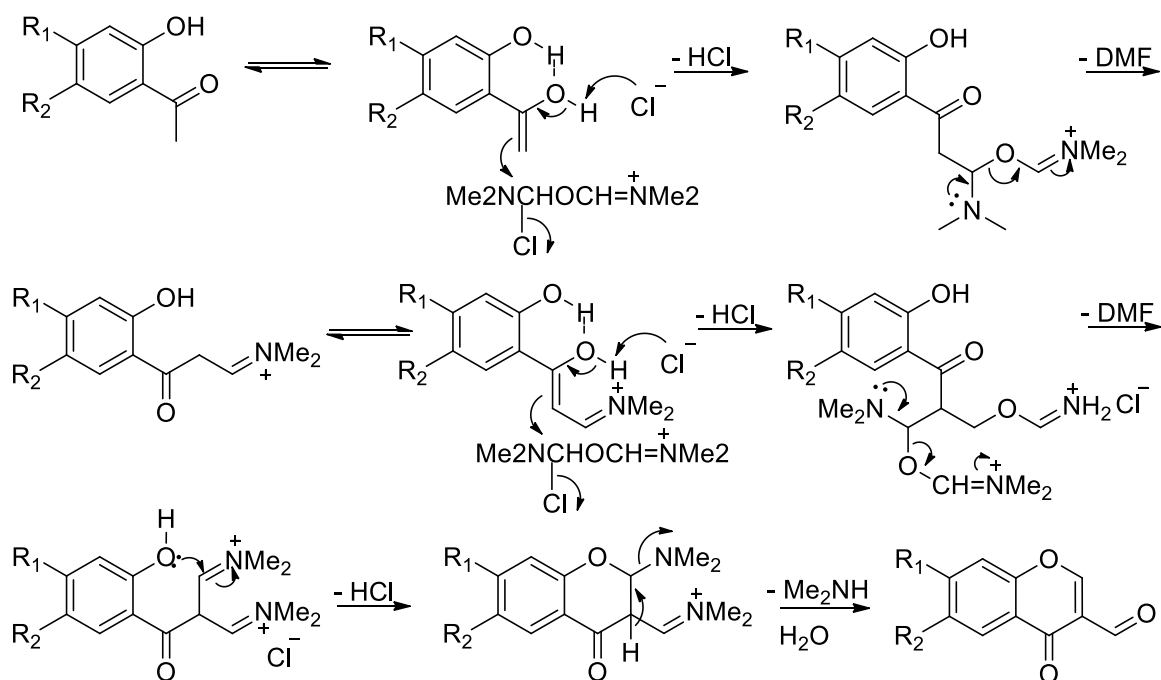


Slika 21: Mehanizem tvorbe Vilsmeier-Haackovega reagenta s trifosgenom. Povzeto po [40].



Slika 22: Mehanizem tvorbe Vilsmeier-Haackovega reagenta z oksalil kloridom. Povzeto po viru [37].

Sledila je nukleofilna adicija acetilne skupine na Vilsmeierjev modificiran reagent **II** (spojina **II**, Slika 21), ko posledično pride do nastanka diiminskega intermediata, kjer se po hidrolizi in eliminaciji dimetilamina tvori 3-formilkromonski obroč (Slika 23).

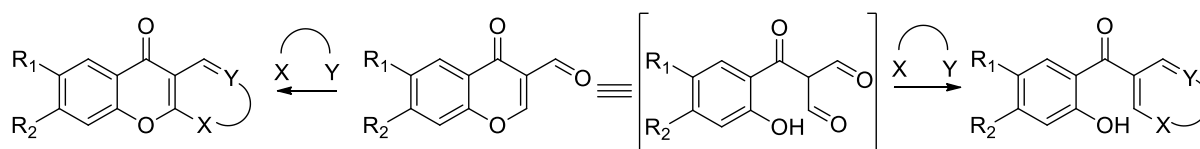


Slika 23: Mehanizem tvorbe kromonskega obroča. Povzeto po viru [40].

Kot izhodne spojine smo uporabljali hidroksi oziroma metoksi substituirane 2-hidroxiacetofenone. Ne glede na pripravo reagenta so bili izkoristki dokaj primerljivi. Čiščenje spojine **9**, ki vsebuje dve metoksi skupini, je bilo zaradi prisotnih nečistot še posebej zahtevno. Težave smo imeli tudi pri spojini **14**, ki je bila oljnate konsistence in katere obstoja nismo dokazali. Najbolj verjeten vzrok za neuspešno sintezo in nastanek nečistoč predstavljata dve hidroksi skupini na acetofenonu, ki zaradi elektrondonorskega efekta zmanjšata kislost acetilne skupine in favorizirata polikondenzacijo intermediatov ter formilacijo aromatskega obroča. Dodaten razlog lahko predstavlja tudi presežek DMF-a, ki pri tvorbi Vilsmeierjevega reagenta favorizira intermediat oblike **II**, ki je manj reaktiven (Slika 21). [37-38, 40]

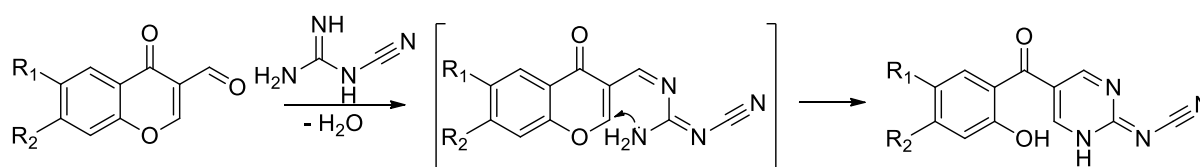
V drugi stopnji smo izvedli ciklokondenzacijo. Na aldehydno skupino 3-formilkromona smo uvedli cianogvanidinsko skupino. Prišlo je do eliminacije vode, cepitve kromonskega obroča ter nastanka pirimidinskega obroča (Slika 24). Točen mehanizem poteka reakcije še ni popolnoma znan, možen potek pa je predstavljen na sliki 25. Reakcijo smo sprva izvajali 4 ure pri refluxu in pri sintezi spojine **10** oziroma dimetoksi derivatu dobili dober izkoristek (75%), vendar pa je surov produkt vseboval številne nečistoče, kar je otežilo

čiščenje produkta. Pri sintezi ostalih spojin smo dobili nižje izkoristke (29-43%), največ težav pa je bilo pri nevtralizaciji alkalne reakcijske zmesi, kjer kristali niso izpadli, zato smo dobili več nečistih produktov. Nastanek nečistoč, velike količine etanola in vode, ki topita večji del spojin, so možni razlogi, zakaj pri nevtralizaciji kristali niso izpadli. Morebiten vzrok za tvorbo številnih stranskih produktov je lahko struktura produkta 1. stopnje, ki vsebuje tri elektrofilne centre: atom C-2, C-4 in aldehydno skupino na mestu 3, ki jih lahko nukleofilni reagent napade. [42-44]



Slika 24: Različne strukture 3-formilkromona in možni stranski produkti. Povzeto po viru [43].

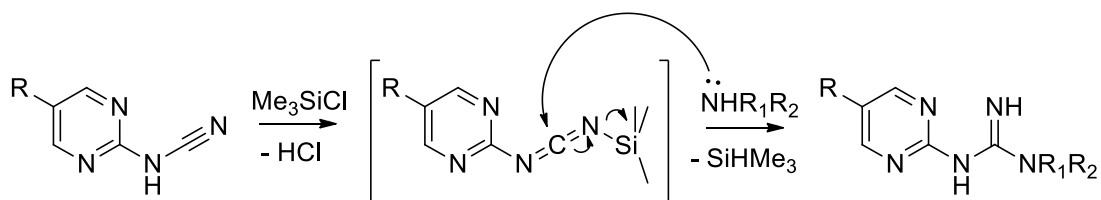
Z namenom, da bi omejili nastanek stranskih produktov, zmanjšali količino topila pri reakciji in skrajšali reakcijski čas, smo drugo stopnjo sinteze skušali optimizirati z uporabo mikrovalovnega reaktorja. Iz 4 ur reakcije pri klasičnem segrevanju smo reakcijski čas skrajšali na 20 minut, vendar pa smo pri sintezi spojine **10** dobili slabši izkoristek v primerjavi s klasičnim postopkom (46% v primerjavi z 75%).



Slika 25: Možen mehanizem reakcije 2. Stopnje. Povzeto po viru [44].

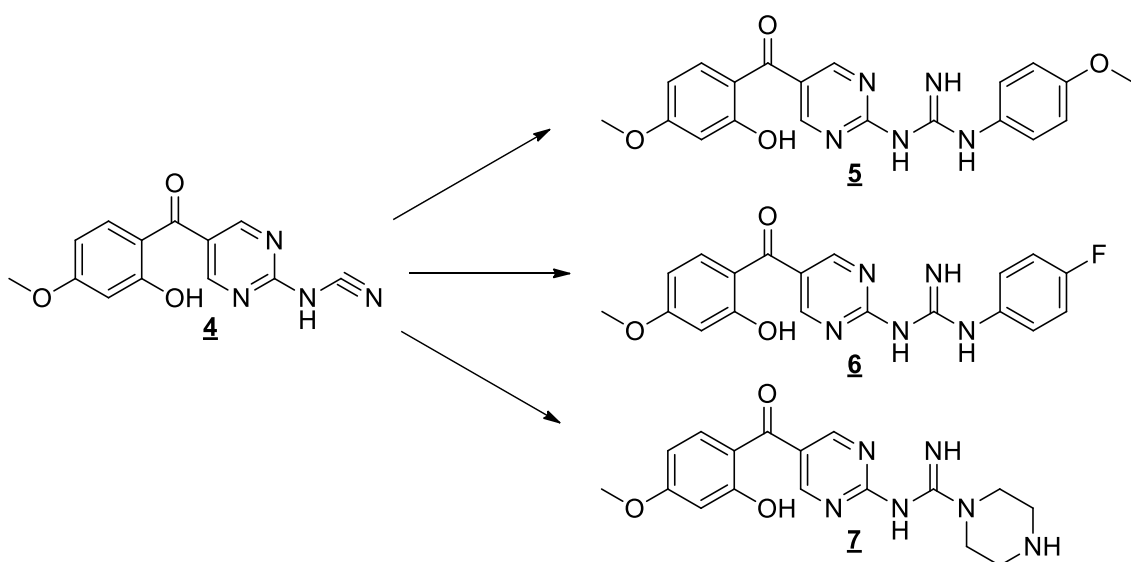
V naslednji stopnji smo izvedli nukleofilno adicijo amina na produkt 2. stopnje po dveh različnih postopkih. Pri klasičnem postopku smo k reakcijski zmesi derivatov pirimidina, sekundarnega amina in izopropanola dodali koncentrirano HCl, ki je služila za pravičen potek reakcije. V nadaljevanju je potekel nukleofilni napad substituiranega amina na elektrofilni C-atom ciano skupine produkta 2. stopnje, kar je vodilo do nastanka substituirane gvanidinske skupine. Reakcijo smo izvedli pod refluxom in po končani reakciji dodali NaOH za nevtralizacijo reakcijske zmesi. Nastalo oborino smo odfiltrirali in čistili s kolonsko kromatografijo.

Ker po klasičnem postopku nismo dobili končnih produktov, smo se odločili za uporabo postopka v mikrovalovnem reaktorju. Pri tem postopku smo najprej aktivirali ciano skupino z uporabo trimetilsilil klorida (TMS-Cl) (Slika 26). Slednji se veže na N-atom in olajša nukleofilni napad sekundarnega amina na elektrofilni C-atom, prav tako pa omogoča nastanek brezvodne HCl. Reakcija je potekala v mikrovalovnem reaktorju 15 minut. Za zaustavitev reakcije smo uporabili izopropanol. Po tvorbi substituirane gvanidinske skupine je sledilo zahtevno čiščenje produktov s kolonsko kromatografijo, kar se kaže tudi v nizkih končnih izkoristkih reakcije (spojina **11**; 21%, spojina **7**; 23%). Pri sintezi spojin **5** (67%) in **6** (18%) (Slika 27) smo ustrezne frakcije s produktom, glede na TPK, dodatno prekrizalizirali z dietiletrom/petroletram in tako dobili čiste kristale. [44]



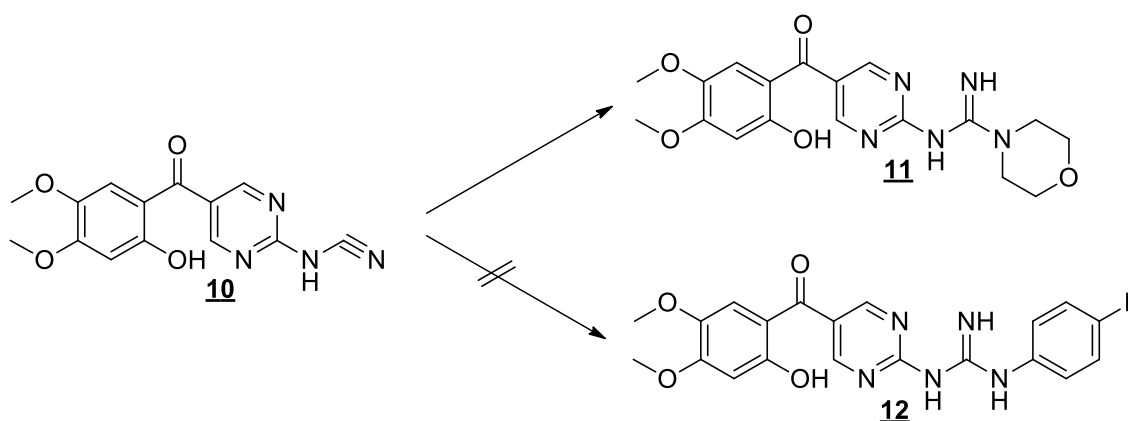
Slika 26: Mehanizem reakcije 3. stopnje, drugi postopek. Povzeto po viru [46, 47].

S tem postopkom smo dosegli krajši reakcijski čas, vendar so bili izkoristki izjemno nizki (okoli 20%) in dobili smo nečiste surove produkte s številnimi stranskimi produkti.



Slika 27: Strukture končnih spojin **5**, **6** in **7**.

Najuspešneje je potekla sinteza spojine **5**, kjer smo dobili produkte z dobrim izkoristkom (3. stopnja 67%). Sintezo spojine **6** in **7** smo prav tako uspešno izvedli, vendar z nekoliko nižjimi izkoristki (1.stopnja 37%, 2.stopnja 29%, 3.stopnja spojine **6**; 18%, spojine **7**; 23%). Končne spojine **5-7** imajo enako izhodno spojino in sicer 4-metoksi-2-hidroksi-3-acetofenon (spojina **4**, Slika 27). Med seboj se razlikujejo le v uporabi amina na gvanidinskem delu. Pri spojini **7** smo na gvanidinsko skupino pripeli sekundarni amin (piperazin), ki je močnejši nukleofil kot aromatski amin (anilinski derivat) in dobili boljše izkoristke (spojina **7**; 23%). Pri adiciji 4-metoksianilina smo prav tako dobili višje izkoristke kot pri adiciji 4-fluoroanilina. Metoksi skupina na para mestu s pozitivnim induktivnim efektom prispeva k večji nukleofilnosti amina in reaktivnosti kot elektronegativni fluor. Slednji ima elektronakceptorski efekt, ki zmanjša elektronsko gostoto na dušikovem atomu in posledično njegovo reaktivnost.

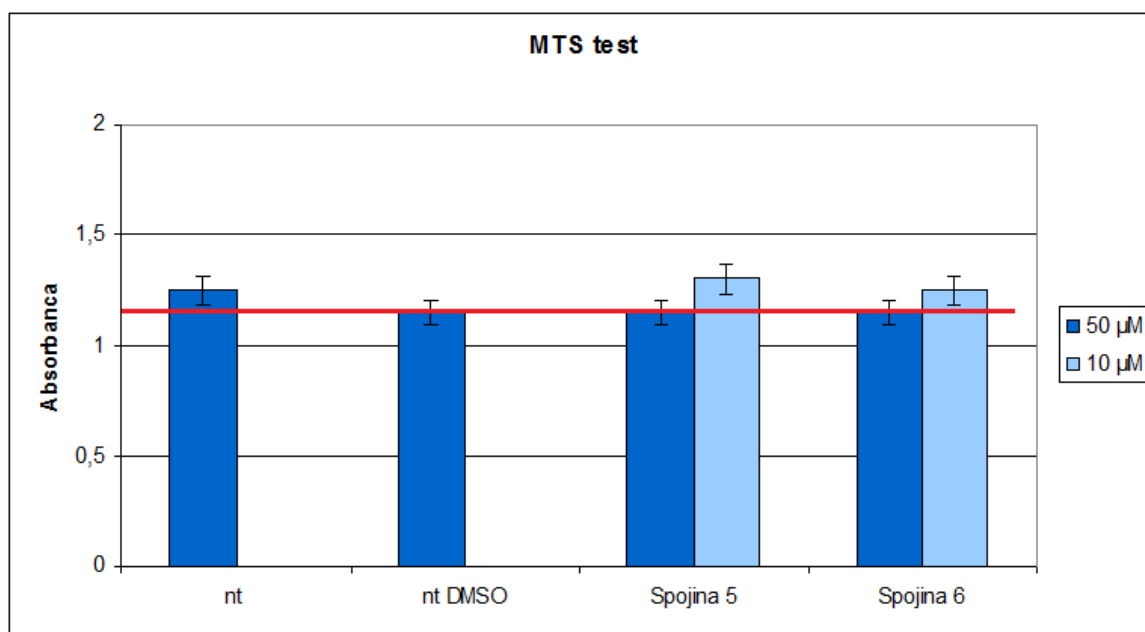


Slika 28: Strukture končnih spojin **11** in **12**.

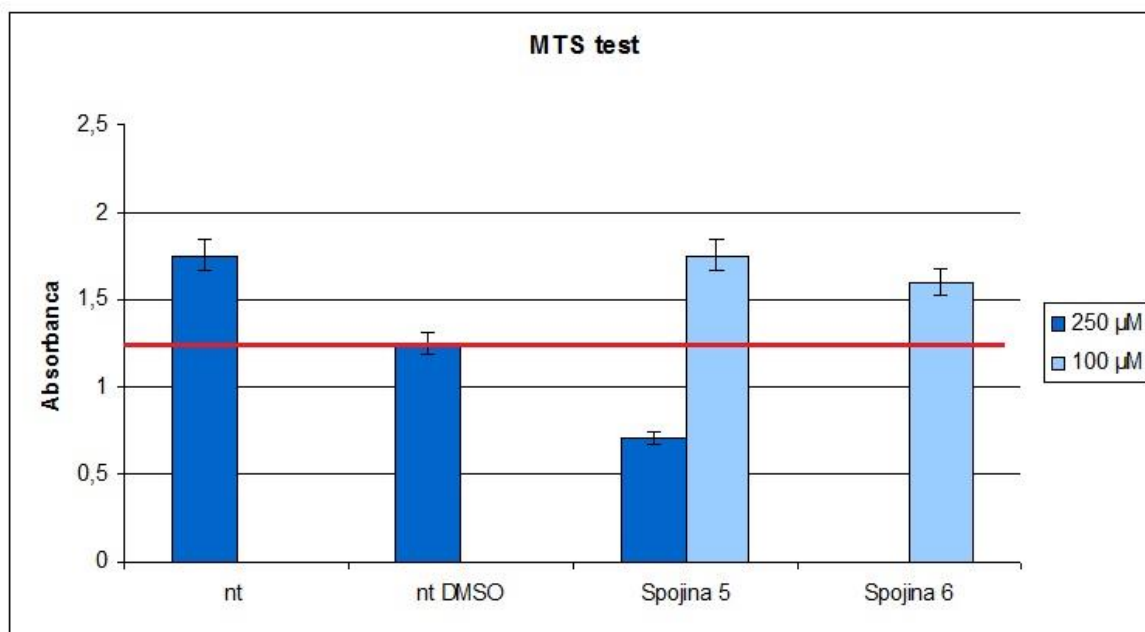
Pri sintezi spojin **11** in **12** (Slika 30) je vpliv izbire reagenta še bolj očiten. Pri uvedbi alifatskega amina morfolina na produkt 2. stopnje je reakcija potekala, medtem ko pri uporabi 4-fluoroanilina produkta nismo dobili. 4-fluoroanilin je namreč zaradi negativnega induktivnega efekta aromatskega obroča in fluora precej slabši nukleofil. Iz rezultatov končnih spojin **5**, **6**, **7** in **11** lahko zaključimo, da je nukleofilnost aminov pomembna pri adiciji na ciano skupino produkta 2. stopnje.

Rezultati bioloških testiranj

Pred izvedbo bioloških testov smo najprej preverili topnost končnih spojin v celičnem mediju pri koncentraciji 250 μM . Spojine smo raztopili v DMSO, jih dodali v medij DMEM, ki smo ga uporabili za gojenje celične linije HEK293, in nato pod mikroskopom gledali prisotnost precipitativ v mediju. Oceno smo podali subjektivno. Pri spojini **6** so bili pri koncentraciji 250 μM prisotni oborjeni kristali, kar pomeni, da je spojina slabše topna v celičnem mediju. Ker pri nižjih koncentracijah oborjenih kristalov nismo več opazili, smo vse nadaljne teste opravili pri koncentracijah do 100 μM . Netopnost spojine namreč pomeni posledično nižjo koncentracijo, kar lahko privede do lažno negativnih ali lažno pozitivnih rezultatov pri nadaljnjih testih. Pri ostalih spojinah oborjenih kristalov nismo opazili in so bile zadovoljivo topne v celičnem mediju. V nadaljevanju smo izvedli MTS test za preverjanje citotoksičnosti. Topilo DMSO je predstavljalo mejo citotoksičnosti. Pri spojini **5** smo MTS test izvedli pri štirih različnih koncentracijah (10, 50, 100 in 250 μM) (Slika 29 in 30). Slednja je pri koncentraciji 250 μM izkazovala citotoksične lastnosti, medtem ko je bila spojina **6** pri vseh koncentracijah (10, 50 in 100 μM) nad mejo kontrole in ni izkazovala citotoksičnosti.

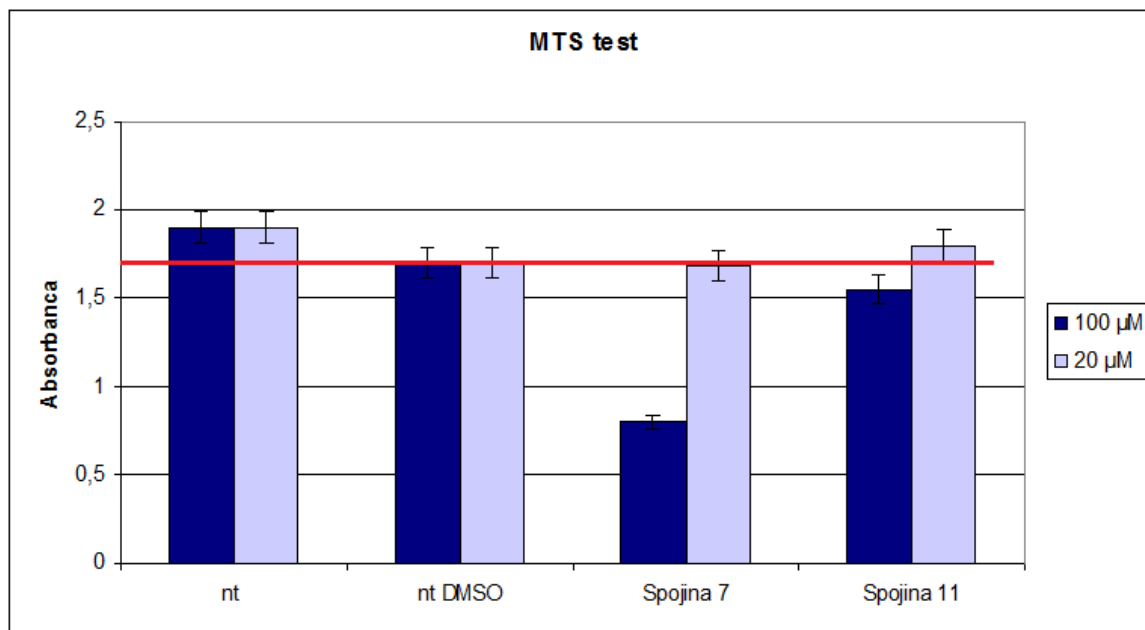


Slika 29: Prikaz citotoksičnosti spojin **5** in **6** pri koncentracijah 10 in 50 μM .



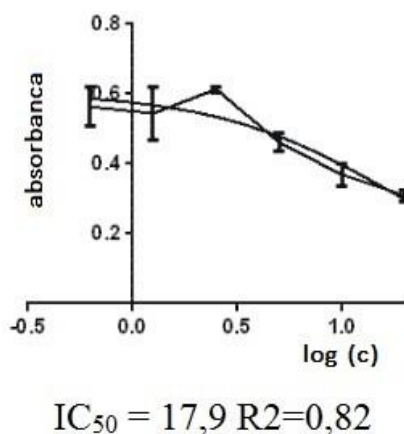
Slika 30: Prikaz citotoksičnosti spojin 5 in 6 pri koncentracijah 100 in 250 µM.

Spojini 7 in 11 smo citotoksičnost preverili pri koncentracijah 20 µM in 100 µM (Slika 31). Spojina 11 je pri nižji koncentraciji izkazovala necitotoksične lastnosti, medtem ko je bila pri višjih koncentracijah pod mejnim območjem, kar pomeni citotoksičnost spojine. Spojina 7 je bila citotoksična pri obeh koncentracijah. Morebiten razlog za citotoksičnost predstavlja sama struktura molekule, ki se lahko zaradi polarnega gvanidinskega dela in nepolarne preostale strukture vsidra v membrano in ruši strukturo membrane. Težavo lahko predstavlja tudi dokaj reaktivna keto skupina. Keto skupina je dober elektrofili, ki lahko reagira z nukleofili, predvsem amini oziroma aminokislinami; je pa precej sterično ovirana, kar zmanjša možnost omenjene reakcije. [49]



Slika 31: Prikaz citotoksičnosti spojin 7 in 11 pri koncentracijah 20 in 100 µM.

Test za preverjanje antagonističnega delovanja smo izvedli na celični liniji HEK-Blue™-hTLR4, ki selektivno izraža TLR4 in SEAP. Za negativno kontrolo smo uporabili agonist LPS in antagonist TAK-242 za pozitivno kontrolo. Učinkovit antagonist naj bi dosegel inhibicijo ekspresije SEAP v mediju, kar s kolorimetrično metodo izmerimo kot znižanje absorbance. Vrednost IC_{50} smo določili na podlagi izmerjene absorbance. Nižje vrednosti IC_{50} predstavljajo močnejšo antagonistično aktivnost. Za spojino 6 smo določili IC_{50} vrednost 17,9 µM (Slika 32), kar je primerljivo s spojino 1 ($IC_{50} = 16,6$ µM).



Slika 32: Prikaz odvisnosti absorbance od logaritma koncentracije za spojino 6.

Spojini se razlikujeta le v poziciji metoksi skupine na aromatskem obroču. Ker je razlika v IC_{50} vrednostih zelo majhna in v okviru eksperimentalne napake, lahko sklepamo, da je za antagonistično delovanje ustrezna metoksi skupina tako na mestu 4 kot tudi 5. Spojinam **7** in **11** smo antagonistično delovanje preverili pri koncentraciji 20 μ M in dobili negativne rezultate. Znižanje absorbance pri spojini **7** je bila posledica inhibicije celične rasti, kar se je dobro videlo pod mikroskopom, in ne antagonističnega delovanja. [46]

6. SKLEP

Na osnovi strukture znanega antagonista, spojine **1**, ki se z nekovalentnimi interakcijami specifično veže na protein TLR4 in prepreči tvorbo kompleksa TLR4-MD-2, smo v magistrski nalogi pripravili nekaj analogov te spojine. Izhajali smo iz različno substituiranih 2-hidroksiacetofenonov in jim v zadnji stopnji na ciano skupino vezali različne derivate aminov. Glede na zastavljene cilje smo dobili naslednje rezultate:

1. Uspeli smo sintetizirati štiri končne spojine: 4-metoksi derivate z 4-metoksianilinom (spojina **5**), 4-fluoroanilinom (spojina **6**) in piperazinom (spojina **7**) ter 4,5-dimetoksi derivat z morfolinom (spojina **11**).

2. Uspešno smo razvili sintezni postopek za pripravo derivatov spojine **1** tako po klasičnem postopku kot tudi z uporabo mikrovalovnega reaktorja. Sinteza 1. in 2. stopnje je potekla uspešno, z manjšimi modifikacijami obeh stopenj pa smo dobili boljše izkoristke in čistejše produkte. V zadnji stopnji pa je reakcija potekla boljše pri spojinah, na katere smo vezali alifatska amina piperazin in morfolin (spojini **7** in **11**). Najslabše je potekla sinteza pri izhodni spojini z dvema hidroksi skupinama, 2,4-dihidroksiacetofenonu, pri kateri nismo dobili niti produkta 2. stopnje.

3. Rezultati bioloških testiranj so pokazali, da so spojine zadovoljivo topne v celičnem mediju in pri nizkih koncentracijah, pod 50 μM , necitotoksične.

4. Spojina **6** je izkazovala antagonistično delovanje z IC_{50} vrednostjo 17,9 μM , kar je podobno kot pri spojini **1** ($\text{IC}_{50} = 16,6 \mu\text{M}$). Za antagonistično delovanje je torej ustrezna substitucija metoksi skupine tako na mestu 4 kot tudi mestu 5 na aromatskem obroču. Ostale spojine pa antagonističnega delovanja niso izkazovale.

Na koncu lahko zaključimo, da naš sintetizirani derivat 1-(4-fluorofenil)-3-(5-(2-hidroksi-4-metoksibenzoil) pirimidin-2-il) gvanidin (spojina **6**) predstavlja pomembno izhodišče pri iskanju in razvoju novih nizkomolekularnih antagonistov TLR4.

7. LITERATURA

1. Male D., Brostoff J., Roth D., Roitt I.: *Immunology*, 7. izd, Mosby, **2006**: 3-18.
2. Flaherty D.: *Immunology for pharmacy*, 1. izd, Mosby, **2011**: 15- 22.
3. http://novebiologije.wikia.com/wiki/Uvod_v_imunologijo (10. 1. 2014, 11:15).
4. Vozelj M.: *Temelji imunologije*, 1. izd., DZS, Ljubljana, **2000**: 1-9.
5. Kraigher A., Ihan A., Avčin T.: *Cepljenje in cepiva-dobre prakse varnega cepljenja*, Sekcija za preventivno medicino SZD, Sekcija za klinično mikrobiologijo in bolnišnične okužbe, SZD, Inštitut za varovanje zdravja, **2011**: 130-158.
6. Actor J.K.: *Immunology and microbiology*, 2 izd., Elsevier Saunders, **2011**: poglavje 1-4, 6, 7, 10.
7. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O.: *Pathogen recognition and innate immunity*, Cell, **2006**; 124: 783-801.
8. Kumar S., Ingle H., Prasad DV., Kumar H.: *Recognition of bacterial infection by innate immune sensors*, Critical Reviews in Microbiology, **2013**; 39(3): 229-246.
9. Takeuchi O., Akira S.: *Pattern recognition receptors and inflammation*, Cell, **2010**; 140: 805-820.
10. Janeway C. A., Travers P., Walport M., Shlomchik M.J.: *Immunobiology: The immune system in health and disease*, 6 izd., Garland Science, **2005**: poglavje 1, 4, 5.
11. Kumagai Y., Akira S.: *Identification and functions of pattern-recognition receptors*, Journal of Allergy and Clinical Immunology, **2010**; 125: 985-992.
12. Kvarnhammar A.M., Cardell L.O.: *Pattern-recognition receptors in human eosinophils*, Immunology, **2012**; 136: 11-20.
13. Bishop S.C., Axford R.E.F., Nicholas F.W., Owen J.B.: *Breeding for Disease Resistance in Farm Animals*, CABI, **2010**: 15-18.
14. Rosa P., Gomariz R.P., Gutierrez-Canas I., Arranz A., Carrion M., Juarranz Y., Leceta J., Martínez C.: *Peptides Targeting Toll-Like Receptor Signalling Pathways for Novel Immune Therapeutics*, Current Pharmaceutical Design, **2010**; 16: 1063-1080.
15. Mak T.W., Saunders M.E.: *Primer to The Immune Response*, Academic Cell, **2008**: poglavje 1, 3, 13.
16. Akira S., Kawai T., Kumar H.: *Pathogen Recognition by the Innate Immune System*, International Reviews of Immunology, **2011**; 30: 16-34.

17. Beutler B., Blasius A.L.: *Intracellular Toll-like Receptors*, Immunity, **2010**; 32: 305-315.
18. Martin J., Orozco G., Sanchez E.: *Toll-like receptors and human pathology*, Immunologia, **2004**; 23: 328-338.
19. Botos I., Davies D.R., Segal D.M.: *The Structural Biology of Toll-like Receptors*, Structure, **2011**; 19: 447-459.
20. Leon G.C., Tory R., Jia J., Sivak O., Wasan K.M.: *Discovery and Development of Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Antagonists: A New Paradigm for Treating Sepsis and Other Diseases*, Pharmaceutical Research, **2008**; 25: 1751-1761.
21. Ramachandran G.: *Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis*, Virulence, **2014**; 5/1: 213-218.
22. Ho Min K, Beom SP, Jung-In K, Sung EK, Judong L, Se Cheol O, Purevjav E, Norio M, Hayyoung L, Ook JY, Jie-Oh L: *Crystal Structure of the TLR4-MD-2 Complex with Bound Endotoxin Antagonist Eritoran*. Cell, **2007**; 130: 906–917.
23. Andres Martin A., Montero Vega MT: *The significance of toll-like receptors in human diseases*. Allergol Immunopathol (Madr.) **2009**; 37: 252-263.
24. Bryant C.E., Doyle S.L., O'Neill L.A.J.: *Therapeutic Targeting of Toll-Like Receptors for Infectious and Inflammatory Diseases and Cancer*, Pharmacological reviews, **2009**; 61/2: 177-197.
25. Boura P., Champipis A., Gkoukourelias I., Pazidis A.: *CD14/TLR4 in sepsis pathogenesis and therapy*, Aristotel University Medical Journal, **2012**; 39: 19-28.
26. Beaulieu L.M., Freedman J.E., Lin E.: *Innate Immunity and Toll-like Receptor Antagonists: A Potential Role in the Treatment of Cardiovascular Diseases*, Cardiovascular Therapeutics, **2009**; 27: 117-123.
27. Costford S.R., Defronzo R.A., Ely B., Hussey S.E., Klip A., Liang H., Musi N., Sanchez-Avila A.: *TAK-242, a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor 4 signalling, unveils similarities and differences in lipopolysaccharide- and lipid-induced inflammation and insulin resistance in muscle cells*, Biosciences, **2013**; 33: 37-48.
28. Mai C.W., Kang Y.B., Richika M.R.: *Should a Toll-like receptor 4 (TLR-4) agonist or antagonist be designed to treat cancer? TLR-4: its expression and effects in the ten most common cancers*, Onco Targets and Therapy, 2013; 6: 1573-1587.

29. <http://www.mdbsciences.com/blog/bid/83102/Toll-like-receptor-family-member-4-TLR4-in-neuropathic-pain> (19. 4. 2014, 9:55).
30. Atkinson T.J.: *Toll-Like Receptors, Transduction-Effector Pathways, and Disease Diversity: Evidence of an Immunobiological Paradigm Explaining All Human Illness?*, International Reviews of Immunology, **2008**; 27: 255-281.
31. Švajger U., Brus B., Turk S., Sova M., Hodnik V., Anderluh G., Gobec S.: *Novel Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Antagonists Identified by Structure- and Ligand-Based Virtual Screening*, European Journal of Medicinal Chemistry, **2013**; 70: 393-399.
32. Hennessy E.J., O'Neill L.A., Parker A.E.: *Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics?*, Nature reviews: Drug discovery, **2010**; 9: 293-308.
33. Ehrentraut S., Frede S., Stapel H., Mengden T., Grohe C., Fandrey J., Meyer R., Baumgarten G.: *Antagonism of Lipopolysaccharide-Induced Blood Pressure Attenuation and Vascular Contractility*, Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, **2007**; 27: 2170-2176.
34. Opal S.M., Laterre P.F., Francois B., LaRosa S.P., Angus D.C., Mira J.P., Wittebole X., Dugernier T., Perrotin D., Tidswell M., Jauregui L., Krell K., Pacht J., Takahashi T., Peckelsen C., Cordasco E., Chang C.S., Oeyen S., Aikawa N., Maruyama T., Schein R., Kalil A.C., Van Nuffelen M., Lynn M., Rossignol D.P., Gogate J., Roberts MB., Wheeler J.L., Vincent J.L.: *Effect of Eritoran, an Antagonist of MD2-TLR4, on Mortality in Patients With Severe Sepsis: the ACCESS randomized trial*, JAMA, **2013**; 309: 1154-1162.
35. Basith S., Manavalan B., Lee G., Sang G.K., Choi S.: *Toll-like receptor modulators: a patent review (2006-2010)*, Expert Opin. Ther. Patents, **2011**; 21: 927-944.
36. Savva A., Roger T.: *Targeting Toll-like receptors: promising therapeutic strategies for the management of sepsis-associated pathology and infectious diseases*, Frontiers in immunology, **2013**; 4: 1-16.
37. Ungaro R., Fukata m., Hsu D., Hernandez J., Breglio K., Chen A., Xu R., Sotolongo J., Espana C., Zaias J., Elson G., Mayer L., Kosco-Vilbois M., Abreu M.T.: *A novel Toll-like receptor 4 antagonist antibody ameliorates inflammation but impairs mucosal healing in murine colitis*. American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology, **2009**; 296: 1167-1179.

38. http://helix.chem.bg.ac.rs/~rsaicic/Organske-sinteze/Aromaticne_supstytucije_CC.pdf, (31. 7. 2014, 12:00).
39. <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/vilsmeier-reaction.shtm>, (31. 7. 2014, 13:00).
40. Su W. K., Li Z. H., Zhao L. Y.: *One-pot synthesis of 3-formylchromones from bis-(trichloromethyl) carbonate/DMF*. Organic Preparations and Procedures International, The New Journal for Organic Synthesis, **2009**; 39: 495-502.
41. Lacova M., Loos D., Furdik M., Matulova M., Shaaer E.: *Synthesis and Reactions of New 4-Oxo-4H-benzopyran-3-carboxaldehydes Containing Hydroxy Groups or 2-Oxopyran Cycles*, Molecules, **1998**; 3: 149-158.
42. Raju B. C., Nageswara Rao R., Suman P., Yogeewari P., Sriram D., Shaik T. B., Vardhan Kalivendi S. V.: *Synthesis, structure-activity relationship of novel substituted 4H-chromen-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylates as potential anti-mycobacterial and anticancer agents*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, **2011**; 21: 2855-2859.
43. Gangadasu B., Narender P., Kumar B.S., Ravinder M., Ananda R.B., Ramesh Ch., China R.B., Jayathirtha R.V.: *Facile and selective synthesis of chloronicotinaldehydes by the Vilsmeier reaction*, Tetrahedron, **2006**; 62: 8398-8403.
44. Karale B.K., Kale S.B., Jagdhani S.G., Randhavane P.V.: *Conversion of 3-formylchromone into biologically important pyrimidines and pyrazoles*, Indian Journal of Heterocyclic Chemistry, **2007**; 17: 153-156.
45. Plaskon A. S., Grygorenko O. O., Ryabukhin S. V.: *Recyclizations of 3-formylchromones with binucleophiles*, Tetrahedron, **2012**; 68: 2743-2757.
46. Sachdeva N., Dolzhenko A. V., Keung Chui W.: *Regioselective synthesis of pyrimido[1,2-a][1,3,5]triazin-6-ones via reaction of 1-(6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-yl)guanidines with triethylorthoacetate: observation of an unexpected rearrangement*, Organic & Biomolecular Chemistry, **2012**; 10: 4586-4596.
47. Kryl'skii D.V., Shikhaliev S.Kh., Shestakov A.S., Liberman M.M.: *Arylbiguanides in Heterocyclization Reactions*, Russian Journal of General Chemistry, **2005**; 75: 303-310.
48. <http://worldwide.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/cell-viability/> (7. 8. 2014, 8:00).

49. Zhou Z., Zheng A., Zhong J.: Fröhlich E.: *Interactions of biocidal guanidine hydrochloride polymer analogs with model membranes: a comparative biophysical study*, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **2011**; 43: 729-737.
50. Nohara, A.; Umetani, T.; Sanno, Y. *Studies on antianaphylactic agents—I: A facile synthesis of 4-oxo-4H-1-benzopyran-3 carboxaldehydes by Vilsmeier reagents*. *Tetrahedron*, **1974**; 30: 3553-3561.