

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA ČUJEŽ

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA ČUJEŽ

**SINTEZA ANALOGOV KROMENO[3,4-*d*]IMIDAZOL-4-ONA S  
POTENCIJALNIM AGONISTIČNIM DELOVANJEM NA TOLL-U PODOBNI  
RECEPTOR 7**

**SYNTHESIS OF CROMENO[3,4-*d*]IMIDAZOL-4-ONE ANALOGUES WITH  
POTENTIAL AGONISTIC ACTIVITY ON TOLL LIKE RECEPTOR 7**

Ljubljana, 2015

Magistrsko naložno sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za Farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sove, mag. farm.

Sinteze spojin, kromatografske metode in določanje tališča sem opravila na Fakulteti za farmacijo UL. Spektroskopske meritve so opravili zaposleni na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za Farmacijo UL in zaposleni v Centru za masno spektrometrijo, Inštituta Jožef Štefan. Teste na celičnih linijah je opravila Mana Gartner na Zavodu za transfuzijsko medicino v Ljubljani.

### **Izjava**

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

Ljubljana, 2015

Tina Čujež

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

Članica komisije: doc. dr. Nataša Karas Kuželički, mag. farm.

# VSEBINA

KAZALO SLIK.....	I
POVZETEK .....	II
ABSTRACT .....	III
SEZNAM OKRAJŠAV.....	IV
1. UVOD.....	1
1.1 Imunski sistem .....	1
1.2 Toll-u podobni receptorji .....	2
1.3 TLR7 in bolezni, povezane z motnjami v njihovem delovanju.....	4
1.3.1 Bolezni, povezane z nepravilnim delovanjem TLR7 .....	4
1.4 Zdravljenje z modulatorji TLR7 .....	6
1.4.1 TLR agonisti kot adjuvanti.....	7
1.4.2 Imikvimod .....	7
1.4.3 Resikvimod.....	8
1.4.4 Gardikvimod.....	9
1.4.5 3,5-bis(4-metoksibenzil)-2-fenil-3H-imidazo[4,5-c]kinolin-5-ijev klorid.....	10
1.4.6 Loksoribin .....	10
1.4.7 Isatoribin.....	11
1.4.8 Vodotopni imidazokinolini .....	11
1.4.9 Spojina A.....	12
2. NAMEN DELA .....	13
3. MATERIALI IN METODE .....	14
3.1 Materiali.....	14
3.2 Metode .....	15
3.2.1 Kromatografske metode .....	15
3.2.2 Spektroskopske metode.....	16
3.2.3 Risanje reakcijskih shem in poimenovanje struktur spojin.....	17
3.2.4 Aparatura za potek reakcij – mikrovalovni reaktor.....	17
3.2.5 Določanje temperature tališča .....	17
3.2.6 Biološko testiranje.....	17
4. EKSPERIMENTALNI DEL .....	18
4.1 Sinteza spojine 3 .....	18

4.2 Sinteza spojine <b>5</b> .....	20
4.3 Sinteza spojine <b>7</b> .....	22
4.4 Sinteza spojine <b>9</b> .....	24
4.5 Sinteza spojine <b>11</b> .....	26
4.6 Sinteza spojine <b>13</b> .....	28
4.7 Sinteza spojine <b>15</b> .....	30
4.8 Sinteza spojine <b>16</b> .....	33
4.9 Sinteza spojine <b>18</b> .....	33
5. REZULTATI IN RAZPRAVA .....	36
5.1 Razlaga sinteznih postopkov .....	36
5.1.1 Reakcija 1. stopnje .....	36
5.1.2 Reakcija 2. stopnje .....	38
5.2 Rezultati biološkega testiranja in SAR .....	40
5.2.1 Biološko testiranje.....	40
5.2.2 Povezava med strukturo in delovanjem .....	43
6. SKLEP .....	44
7. VIRI IN LITERATURA.....	45

## KAZALO SLIK

Slika 1: Imikvimod, agonist TLR7, povzeto po (18).....	8
Slika 2: Resikvimod, agonist TLR7, povzeto po (18) .....	8
Slika 3: Gardikvimod, agonist TLR7, povzeto po (27) .....	9
Slika 4: 3H-regioizomer gardikvima, povzeto po (27).....	9
Slika 5: 4-desamino-3H-regioizomer, povzeto po (27) .....	10
Slika 6: 3,5-bis(4-metoksibenzil)-2-fenil-3H-imidazo[4,5-c]kinolin-5-ijev klorid, povzeto po (28) .....	10
Slika 7: Loksoribin, agonist TLR7, povzeto po (29).....	11
Slika 8: Isatoribin, agonist TLR7, povzeto po (31) .....	11
Slika 9: Spojina A ter spojina B, oba agonista TLR7, povzeto po (5) .....	12
Slika 10: Novi derivati z različnimi substituenti R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> in R <sub>3</sub> .....	13
Slika 11: Reakcijska shema sinteze spojine 2 .....	18
Slika 12: Reakcijska shema sinteze spojine 3 .....	19
Slika 13: Reakcijska shema sinteze spojine 4 in 5 .....	21
Slika 14: Reakcijska shema sinteze spojine 6 .....	22
Slika 15: Reakcijska shema sinteze spojine 7 .....	23
Slika 16: Reakcijska shema sinteze spojine 8 .....	24
Slika 17: Reakcijska shema sinteze spojine 9 .....	25
Slika 18: Reakcijska shema sinteze spojine 10 .....	26
Slika 19: Reakcijska shema sinteze spojine 11 .....	27
Slika 20: Reakcijska shema sinteze spojine 12 .....	28
Slika 21: Reakcijska shema sinteze spojine 13 .....	30
Slika 22: Reakcijska shema sinteze spojine 14 .....	31
Slika 23: Reakcijska shema sinteze spojine 15 .....	32
Slika 24: Reakcijska shema sinteze spojine 16 .....	33
Slika 25: Reakcijska shema sinteze spojine 17 .....	34
Slika 26: Reakcijska shema sinteze spojine 18 .....	35
Slika 27: Reakcijska shema sinteze 1. stopnje, povzeto po (33) .....	37
Slika 28: Reakcijska shema sinteze 2. stopnje, povzeto po (35) .....	39
Slika 29: Razpredelnica spojin, ki so bile biološko testirane .....	41
Slika 30: Rezultati testiranja agonistične in antagonistične aktivnosti spojin pri koncentraciji 250 µM.....	42
Slika 31: Graf odvisnosti absorbance od logaritma koncentracije spojine 3.....	42

## **POVZETEK**

V vsakdanjem življenju smo neprestano izpostavljeni mikroorganizmom, tako koristnim kot nekoristnim. Problem nastopi, ko se ravnotežje škodljivih vplivov mikroorganizmov in obrambnih mehanizmov poruši. Takrat ima imunski sistem glavno vlogo ponovne vzpostavitev homeostaze. Poznamo prirojeni in pridobljeni imunski odziv. Najpomembnejši receptorji pri prepoznavi patogenov oz. njihovih molekulskeih vzorcev so Toll-u podobni receptorji (TLR). Pri sesalcih je znanih 10 homologov TLR. TLR7 se nahaja znotraj celice, predvsem v kislih predelkih endosomov in lizosomov ter v endoplazemskem retikulumu. Motnje v delovanju TLR7 vodijo do različnih patoloških stanj, zato se agonisti TLR7 uporabni kot učinkovine za zdravljenje okužb z virusom hepatitisa C in človeškim papiloma virusom ter rakavih obolenj, medtem ko so antagonisti TLR7 potencialne učinkovine pri zdravljenju avtoimunskih bolezni.

V okviru magistrske naloge smo se osredotočili na sintezo analogov kromeno[3,4-*d*]imidazol-4-ona. Osnova za raziskovalno delo nam je predstavljala spojina zadetek iz knjižnice spojin ZINC, najdena z virtualnim rešetanjem na Fakulteti za farmacijo UL, ki se je v biološkem testiranju izkazala kot antagonist TLR7. Sintetizirali smo sedem končnih spojin z različnimi substituenti na mestih 1 in/ali 8 kromeno[3,4-*d*]imidazol-4-ona, ki pa so pokazale šibko agonistično delovanje na TLR7. S tem smo prišli do še enega dokaza, da na agonistično oz. antagonistično aktivnost ligandov TLR7 vpliva že zelo mala struktorna sprememba. Za sintezo analogov smo uporabili dvostopenjsko sintezno pot. Prva stopnja je multikomponentna reakcija, ki poteka v eni bučki, druga pa transesterifikacija do končnega produkta. Uspeli smo optimizirati drugo stopnjo sinteze z uporabo mikrovalovnega reaktorja, pri čemer smo uporabili manj topil, skrajšali čas in povečali izkoristek reakcije. Znatne povezave med strukturo in delovanjem ligandov TLR7 nismo ugotovili. Spojina z butilno verigo na mestu 1 se je izkazala kot najmočnejši agonist med testiranimi spojinami z EC<sub>50</sub> vrednostjo 107 µM, vendar je bila pri koncentracijah nad 100 µM šibko citotoksična. Rezultati biološkega testiranja kažejo, da kisikov atom in nenasičena vez v stranski verigi ne povečata agonističnega delovanja. Razlike v razvejanosti in dolžini alifatske verige na mestu 1 skoraj ne vplivajo na delovanje spojine. Fluor na mestu 8 ne vpliva na aktivnost, temveč povzroča manjšo rast celic.

**Ključne besede:** *Toll-u podobni receptorji; ligandi TLR7; agonisti; derivati kromeno[3,4-*d*]imidazol-4-ona*

## **ABSTRACT**

In everyday life we are constantly exposed to essential and harmful microorganisms. The problem occurs when the balance of harmful effects of microorganisms and defense mechanisms collapses. At that time the immune system is responsible for reestablishing homeostasis. There are innate and adaptive immune response. The most important receptors for pathogen recognition and recognition of their molecular patterns are Toll-like receptors. Ten mammalian homologues of TLR are known. TLR7 is located inside the cell, particularly in the acid compartments of endosomes and lysosomes and in endoplasmic reticulum. TLR7 signaling malfunctions lead to various pathological conditions, therefore agonists are used for treating infection with hepatitis C virus or human papiloma virus and cancer, whereas TLR7 antagonists could be used for treating autoimmune diseases.

Within the master's thesis we focused on the synthesis of chromeno[3,4-*d*]imidazole-4-one analogues. Our research was based on a structure of the compound found by virtual screening in ZINC drug database at Faculty of Pharmacy UL, which showed antagonistic activity on TLR7. We have synthesized seven final compounds with different substituents on positions 1 and/or 8 of chromeno[3,4-*d*]imidazole-4-one, which turned out as weak TLR7 agonists. This is a proof that little structural changes define whether agonistic or antagonistic activity. The synthesis consists of two-step synthetic procedure. The first step is a one-pot multicomponent reaction which is followed by transesterification as the second step to obtain the final product. We were able to optimize second step by using a microwave reactor, which decreases the amount of organic solvent, reduces the reaction time and increases the yield of the reaction. We did not find significant relationship between the structure and activity of TLR7 ligands. Nevertheless, the compound with butyl substituent at position 1 showed the highest agonistic activity with EC<sub>50</sub> value of 107 µM. However, it should be considered that this compound, showed weak cytotoxic activity above 100 µM concentration. The results of biological tests show that the introduction of oxygen atom or unsaturated bond in the side chain at position 1 do not increase the activity of the compound and furthermore, same pattern was observed for branched substituents or different length of aliphatic chain. Fluor at position 8 does not affect the activity, but reduces cell growth.

**Key words:** *Toll-like receptors; TLR7 ligands; agonists; chromeno[3,4-*d*]imidazole-4-one derivatives*

## SEZNAM OKRAJŠAV

ALR	AIM2-podobni receptorji ( <i>angl.</i> AIM2-like receptors)
CD8+	diferenciacijski faktor 8+ ( <i>angl.</i> cluster of differentiation 8+)
CLR	receptorji lektina tipa C ( <i>angl.</i> C-type lectin receptors)
CpG-ODN	( <i>angl.</i> C – cytosine triohosphate deoxynucleotide, G – guanine triphosphate deoxynucleotide, p-phosphodiester; oligodeoxynucleotides)
DAMP	molekulski vzorci povezani z nevarnostjo ( <i>angl.</i> Danger associated molecular patterns)
DMAP	4-dimetilaminopiridin
ESI-HRMS	ionizacija z razprševanjem ( <i>angl.</i> electrospray ionization) - masna spektrometrija visoke ločljivosti ( <i>angl.</i> high-resolution mass spectrometry)
HCQ	hidroksiklorokin ( <i>angl.</i> hydroxychloroquine)
HCV	virus hepatitisa C ( <i>angl.</i> hepatitis C virus)
HEK 293	celična linija človeških zarodnih jetrnih celic ( <i>angl.</i> Human embryonic kidney cells 293)
HMGB1	skupina visokomobilnih beljakovin ( <i>angl.</i> High-mobility group protein B1)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HPV	virus humanega papiloma ( <i>angl.</i> human papillomavirus)
HSP	proteini temperaturnega šoka ( <i>angl.</i> heat-shock proteins)
IC <sub>50</sub>	koncentracija učinkovine, ki povzroča polovično inhibicijo
IFN	interferon
IL	interlevkin (omenjeni so interlevkin 1 (IL-1), 1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ ), 8 (IL-8), 12 (IL-12), in 18 (IL-18))
IL-1R	receptor za interlevkin 1
IRAK	IL-1 receptor aktivirana kinaza ( <i>angl.</i> Interleukin-1 receptor-associated kinase; omenjeni so IRAK-1, IRAK-2, IRAK-4 in IRAK-M)
IRF	interferon-regulatorni faktor (omenjeni so IRF3 in IRF7)
J	sklopotvena konstanta
JNK	c-jun N-terminalna kinaza ( <i>angl.</i> c-Jun N-terminal kinase)
LRR	ekstracelularna domena bogata z levcinom ( <i>angl.</i> Leucine rich repeat)
MAP	kinaze aktivirane z mitogenom ( <i>angl.</i> mitogen-activated protein kinases)
MyD88	mieloidni diferenciacijski protein 88 ( <i>angl.</i> myeloid differentiation primary response gene 88)

NF-κB	jedrni faktor kapa B ( <i>angl.</i> nuclear factor kappa B)
NLR	NODu podobni receptorji ( <i>angl.</i> NOD-like receptors)
NMR	jedrna magnetna resonanca ( <i>angl.</i> nuclear magnetic resonance)
PAMP	molekulski vzorci povezani s patogenom ( <i>angl.</i> Pathogen associated molecular patterns)
PRR	receptorji, ki prepoznavajo molekulske vzorce ( <i>angl.</i> Pattern recognition receptors)
R <sub>f</sub>	retencijski faktor
RLR	RIG-I podobni receptorji ( <i>angl.</i> RIGI-like receptors)
SAR	odnos med strukturo in delovanjem spojine ( <i>angl.</i> structure-activity relationship)
TFA	trifluorocetna kislina ( <i>angl.</i> trifluoroacetic acid)
TIR	Toll/IL-1 receptor ( <i>angl.</i> Toll/interleukin-1 receptor)
TIRAP	adaptorski protein podoben MyD88 ( <i>angl.</i> TIR-domain-containing adaptor protein)
TLR	Toll-u podobni receptor ( <i>angl.</i> Toll-like receptor)
TNF $\alpha$	faktor tumorske nekroze alfa
TRAM	adaptorski protein soroden TRIF ( <i>angl.</i> TRIF-related adaptor molecule)
TRIF	adaptorski protein, ki vsebuje domeno TIR ( <i>angl.</i> TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- $\beta$ )
T <sub>tal</sub>	temperatura tališča
SLE	sistemski lupus eritematozus ( <i>angl.</i> systemic lupus erythematosus)

# 1. UVOD

## 1.1 Imunski sistem

Pri sesalcih je vzpostavljen ravnotežje med škodljivimi vplivi mikrobov in obrambnimi mehanizmi gostitelja, vendar se lahko to ravnotežje podre, ker se gostitelj ne more upreti parazitu ali pa je parazit preveč agresiven. Mehanizem obrambe proti potencialnim patogenim mikrobom (virusi, bakterije in paraziti), ki skrbi za ponovno vzpostavitev homeostaze, imenujemo imunski sistem. Poznamo naravno in specifično imunost. (1,2)

**Naravna oz. prirojena imunost** je prva linija obrambe proti patogenim mikrobom. Povzroča hiter, vendar nespecifičen odziv. Vključuje genetske dejavnike, anatomske in mehanične ovire, nespecifične baktericidne snovi telesnih tekočin, fagocitozo ter različne efektorske mehanizme kot sta npr. komplementni sistem in interferoni. Odzove se proti vsem vrstam mikrobov, ne glede na to, če jih je bil že prej izpostavljen. Celice prirojenega imunskega sistema, na primer makrofagi in dendritične celice, imajo ključno vlogo pri sproščanju provnetnih citokinov in dušikovega oksida. Ta odziv pa velikokrat ni zadosti učinkovit, zato so vretenčarji v evoluciji razvili še eno skupino obrambnih mehanizmov. Te mehanizme razvije posameznik v odgovor na vdor infekcijskega agensa. Temelji na »izkušnjah« posameznika, zato se imenuje **pridobljena ali specifična imunost**. Zanjo je značilno, da prepozna tuje snovi oz. mikrobe, proizvede protitelesa iz limfocitov B in T, efektorske celice ter dosmrten imunski spomin. Traja lahko več tednov ali celo več mesecov, da ta imunost zagotovi zadosten imunski odgovor. Kljub znatnim razlikam, si prirojena in specifična imunost delita mnogo celičnih in molekulskih komponent ter tvorita enoten, visoko integriran niz obramb proti patogenom. (1-7)

Imunski sistem normalno odgovori samo na tuje antigene, kar pomeni, da je njegova bistvena naloga ločiti lastno od tujega in s tem preprečiti neustrezen imunološki odgovor na lastne molekule, ki bi lahko povzročile usodno avtoimunsko bolezen. Prirojeni imunski sistem prepozna patogene preko snovi, ki jih le-ti sami proizvajajo. Imenujejo se PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns), ter so bistveni za njihovo homeostazo. Mednje spadajo lipopolisaharidi Gram negativnih bakterij, lipoteiholska kislina Gram pozitivnih bakterij, peptidoglikani, bakterijska RNK in DNK, beta-glukani, itd. Zaznajo jih receptorji imenovani PPR (Pattern Recognition Receptors), med katere spadajo Toll-u podobni receptorji (TLRs), transmembranski receptorji lektina C (CLR), citosolni NODu podobni

receptorji (NLR), RIG-I podobni receptorji (RLR) in AIM2-podobni receptorji (ALR). Po navadi se po prepoznavi liganda na PRR sproži intracelularna signalna transdukcijska kaskada, katere rezultat je proizvajanje vnetnih citokinov, kemokinov in protivirusnih molekul. PRR zaznajo tudi vzorce imenovane DAMPs (damage-associated molecular patterns), ki so posledica poškodb celic. To so endogene komponente in sicer HMGB-1 (high mobility group box-1 protein), heat-shock proteins (HSP), IL-1 $\alpha$ , IL-18, sečna kislina, ATP, protein S100 in heparin sulfat. Prirojen imunski sistem preko PRRs prepoznavata PAMPs, pridobljen pa prepoznavata vse, razen kar je intrinzično za gostitelja. Jakost odziva na zaznan patogen je odvisna od količine prisotnih PAMPs in DAMPs. Dušenje odziva po odstranitvi iniciatorja je mogoče pripisati očistku PAMPs, DAMPs in vnetnih mediatorjev, izčrpavanju efektorskih mehanizmov ter zmanjšanju občutljivosti imunskeih celic. (1, 5, 8-12)

Nedavne študije kažejo, da ima prirojen imunski sistem večjo specifičnost, kot je bilo najprej mišljeno in ima zmožnost razlikovati med lastnimi in tujimi antigeni. To razlikovanje pogosto temelji na družini evolucijsko ohranjenih receptorjev, imenovanih TLR, ki imajo ključno vlogo pri zgodnjem odzivu gostitelja na invazivne patogene. Še več, podatki tudi kažejo, da je aktivacija prirojenega imunskega sistema predpogoj indukcije pridobljene imunosti, zlasti pri indukciji odziva celic T1 pomagalk (T<sub>H</sub>1). (4, 7, 13)

## 1.2 Toll-u podobni receptorji

TLR spadajo med PRR ter so ključni regulatorji prirojenega in pridobljenega imunskega sistema, saj s svojim odzivom na patogene zaščitijo gostitelja pred virusnimi in bakterijskimi okužbami. Genetske študije so pokazale, da nepravilno delovanje TLR signaliziranja prispeva k razvoju in napredovanju različnih bolezni kot so na primer sepsa, avtoimunske bolezni in nevropatska bolečina. TLR prepoznavajo struktorno podobne in široko distribuirane molekule, medtem ko so receptorji T- in B-celic visoko molekularno selektivni. Zaradi zmožnosti prepoznavane katerih koli mikrobov, so ligandi TLR pomembne tarče razvoja učinkovin. (2, 8, 13-15)

TLR receptorji so transmembranski proteini tipa I. Sestavljeni so iz treh glavnih domen: zunajcelične N-terminalne antigen prepoznavne domene, za katero so značilna levcin-bogata zaporedja (LRRs) in ena ali dve cistein-bogati regiji, transmembranske domene in

citosolne C-terminalne domena, ki je strukturno podobna receptorju IL-1, zato se ta del imenuje Toll/IL-1R (TIR) domena. Zaradi te regije spadajo v superdružino IL-1R/TLR. TLR so izraženi na številnih imunskih in ne-imunskih celicah, vključno z monociti, makrofagi, dendritičnimi celicami, nevtrofilci, B in T celicami, fibroblasti, endotelijskimi in epitelnimi celicami, torej po vsem telesu. (2-4, 6, 8, 10, 13, 14)

Po odkritju Toll proteina, receptorja za imunost pri muhi *Drosophila melanogaster*, po katerem so TLR zaradi strukturne in funkcijске podobnosti dobili ime, je bilo pri sesalcih z bioinformacijskimi pristopi kasneje odkritih 13 homologov. Deset pri ljudeh (TLR1 – TLR10) in dvanajst pri miših (TLR1-TLR9 ter TLR11-TLR13; TLR10 pri miših ni funkcionalen). Razdelimo jih v dve skupini in sicer glede na njihovo subcelično lokacijo. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 in TLR10 se nahajajo na celični površini in gredo po aktivaciji v fagosome, medtem ko se TLR3, TLR7, TLR8 in TLR9 nahajajo v citosolu predvsem v kislih endosomskih ali lizosomskih predelkih in endoplazemskem retikulumu. Ta lokalizacijska raznolikost ščiti gostitelja pred vplivi ekstracelularnega kot tudi intracelularnega okolja. (3, 4, 14-16)

TLR ligandi zajemajo lipide in lipopeptide (TLR1, TLR2, TLR4, TLR6), proteine (TLR5) in nukleinske kisline (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9). TLR2 deluje v obliki heterodimera z TLR1 ali TLR6 in tako kot TLR2/TLR6 zaznava diacilirane lipopeptide, kot TLR1/TLR2 dimer pa zaznava triacilirane lipopeptide. Ostali TLR težijo k tvorbi homodimerov. TLR4 veže lipopolisaharide (LPS) iz Gram negativnih bakterij. Zazna lahko tudi protein F iz respiratornega sincicijskega virusa in glicerofosfatidilinositolne fragmente iz parazitov, medtem ko TLR5 veže bakterijski flagelin. TLR3 zaznava dvojnovidno RNK, TLR7 in TLR8 pa enovidačno RNK (ssRNA) in TLR9 CpG-bogato hipometilirano DNK. Vse TLR ektodomene imajo zelo podobno terciarno strukturo, vendar različna aminokislinska sestava omogoča prepoznavanje raznolikega seta PAMP in DAMP. Podatki kažejo, da je lahko veliko TLR aktiviranih z endogenimi ligandi, zato je zelo pomembno, da so TLR zmožni razlikovati lastne molekule od tujih. Prepoznavanje patogenov preko TLR ali ostalih PRR služi torej trem ločenim, čeprav prepletenim funkcijam: zaznavanje prisotnosti in vrste patogena, spodbujanje takojšnjega odziva na patogen ter spodbujanje razvoja dolgoletnega prilagoditvenega odziva z efektorskimi funkcijami, ki ustreza tipu patogena. (3, 5, 10, 13)

Molekulski mehanizmi, s katerimi TLR sprožijo aktivacijo prirojenega imunskega sistema, so bili pojasnjeni skozi analizo signalnih poti. Po prepoznavi liganda na TLR, njegova TIR domena dimerizira v homodimer ali heterodimer, nato pa reagira s številnimi adaptorskimi proteini, ki tudi vsebujejo TIR domeno, npr. MyD88 (myeloid differentiation factor 88), TIRAP, TRIF in TRAM. Sproži se nadaljnja pot signaliziranja. V primeru reakcije TLR z MyD88 in/ali TIRAP pride preko fosforilacije serin-treonin kinaze, imenovane IRAK (IL-1 receptor-associated kinase) do indukcije transkripcije **vnetnih citokinskih genov**. Pri sesalcih poznamo štiri IRAK adaptorske proteine: IRAK-1, IRAK-2, IRAK-4 in IRAK-M. IRAK-1 in IRAK-4 sta aktivni kinazi, ki sta povsod izraženi, medtem ko je IRAK-M prednostno izražen v makrofagih in monocitih. Po drugi strani pa TLR3 in TLR4 preko adaptorskih proteinov TRIF in TRAM aktivirata IRF3, kar se kaže v produkciji **tipa I IFN**. V plazmocitnih dendritičnih celicah pride preko MyD88-posredovane poti do aktivacije indukcije IRF7, kar vodi do produkcije **IFN $\alpha$** . (2-4)

### 1.3 TLR7 in bolezni, povezane z motnjami v njihovem delovanju

TLR7 se nahajajo na intracelularnih membranah v dendritičnih celicah, makrofagih in monocitih in tako ščitijo celice pred znotrajceličnimi vplivi. Prepoznavajo enoverižno RNK (ssRNA) in sintetične ligande z nizko molekulsko maso, kot so na primer imidazokinolinski derivati (imikvimod, resikvimod, gardikvimod) ter gvaninski analogi (loksoribine). Dovzetni so tudi za dvojno-vijačno siRNK (small-interfering RNA). (5, 13, 17)

#### 1.3.1 Bolezni, povezane z nepravilnim delovanjem TLR7

Okužba s **herpes C virusom** (HCV) vodi do bolezni imenovane hepatitis C, ki bi se lahko zdravila s TLR7 agonisti. Kronična okužba s HCV prizadene 3% svetovne populacije. Trenutno zdravljenje vsebuje kombinacijo pegiliranih IFN- $\alpha$  in nukelozidnega analoga ribavirina, ampak se nanj odzove manj kot 50% bolnikov. (19)

Veliko TLR ligandov kaže obetajoče rezultate pri zdravljenju **rakavih obolenj**. TLR7 agonist, imikvimod, se trenutno že uporablja pri zdravljenju karcinoma bazalnih celic. Kljub temu da bi lahko bila monoterapija z TLR ligandi uspešna pri nekaterih rakavih celicah, je interes osredotočen na izpopolnjevanje obstoječe terapije z obsevanjem, monoklonskimi protitelesi ali citotoksičnimi učinkovinami. Stimulacija preko TLR bi

lahko preko krepitve naravne imunosti, krepitve imunosti T-celic, krepitve citotoksične funkcije protiteles in indukcije apoptoze v TLR-pozitivnih tumorjih povzročila povečano protitumorno delovanje. (3, 5, 19)

Okužbe s **humanim papilloma virusom** (HPV) so najpogosteje spolno prenosljive okužbe. Eden izmed znakov so genitalne in perianalne bradavice, za katere že poznamo zdravljenje in sicer z nizkomolekularnimi TLR7 agonisti, npr. z imikvimodom. (3, 5, 19)

**Sistemski lupus eritematozus** (SLE) je kronična vnetna avtoimunska bolezen, ki se pojavi pri mladih ljudeh, pogosteje pri ženskah. Prizadene številne organe: kožo, skelepe, ledvice in centralni živčni sistem. Etiologija bolezni je neznana, vendar naj bi imela velik vpliv genska zasnova. Značilne so nenormalnosti B- in T-celic, kar se kaže v aktivaciji in ekspanziji limfocitov, produkciji citokinov in obilni produkciji širokega nabora potencialno patogenih avtoprotiteles. Ta protiteesa so usmerjena proti znotrajceličnim nukleinskim kislinam, proteinom in nukleinskim kompleksom. Ključni znak bolezni so povišane serumske koncentracije IFN- $\alpha$ , ki korelirajo z resnostjo bolezni. Izvor povišanih vrednosti IFN- $\alpha$  naj bi bile plazmocitne dendritične celice, glavni tip celic v krvi, ki proizvajajo IFN- $\alpha$ . Te celice bi naj bile pri pacientih s SLE kronično aktivirane, njihovo število pa naj bi bilo, zaradi migracije v periferna limfoidna tkiva in kemotakse, kar 100-krat manjše. Povišane vrednosti IFN- $\alpha$  lahko imajo neposredno vlogo v patologiji lupusa, saj lahko pacienti z neavtoimunskimi boleznimi, kateri so zdravljeni z IFN- $\alpha$ , proizvajajo protijedrna protiteesa, anti-dsDNA protiteesa in občasno pa pride tudi do razvoja SLE. Aktivacija plazmocitnih dendritičnih celic je lahko posledica signalov, prepoznanih preko TLR, saj so najbolj znani induktorji IFN- $\alpha$  iz plazmocitnih dendritičnih celic ravno ligandi za TLR7 in TLR9 ter DNA in RNA virusi, ki večinoma delujejo preko teh dveh TLR. Drug možen vzrok za indukcijo IFN- $\alpha$  pri pacientih s SLE je sprožen z imunskimi kompleksi protiteles, ki vsebujejo lastno DNA ali RNA, saj je očistek apoptotičnih celic z makrofagi zmanjšan in le-to spodbudi nastanek teh kompleksov. Dokazano je bilo, da sta DNA in RNA sesalcev v obliki imunskega kompleksa potencialna lastna antigena za TLR9 in TLR7 ter tako inducirata produkcijo IFN- $\alpha$  v plazmocitnih dendritičnih celicah. Znani aktivatorji nastanka SLE so torej virusne infekcije, UV poškodbe tkiv in ostali dogodki, ki vodijo v indukcijo IFN- $\alpha$ . Trenutna terapija pri SLE vključuje uporabo antimalarika hidroksiklorokina (HCQ), z aktivnostjo proti TLR7, TLR8 in TLR9. Pfizer je razvil naslednjo generacijo derivatov, CPG 52364, ki je pokazala učinkovitost v modelih s SLE

in sinergistično delovanje v kombinaciji z HCQ *in vivo*. CPG 52364 je trenutno v fazi 1 kliničnega razvoja. (3, 10, 16, 19-23)

**Revmatoidni artritis** je ena najpogostejših avtoimunskih bolezni in prizadene ~0,5 - 1 % starejše populacije, od tega ženske kar trikrat pogosteje. Zanjo je značilna proliferacija sinovialnega tkiva in destrukcija sklepnega hrustanca. Pri pacientih z revmatoidnim artritisom je bila v sinovialnem tkivu opažena ekspresija TLR2, 3, 4, 7 in 9, vendar so za potrditev potrebne še nadaljnje preiskave. (10, 22-24)

**Sjögrenov sindrom** (SS) je revmatična avtoimunska bolezen, ki jo v primarni obliki zaznamuje vnetje eksokrinih žlez, pri sekundarnem SS pa se simptomi pokažejo v kombinaciji z ostalimi povezanimi revmatičnimi avtoimunskimi boleznimi. Posledica so suhe oči in suha usta. Pogosteje prizadene ženske po 40. letu. Do sedaj še ni bilo opravljenih veliko raziskav, vendar naj bi bili antagonisti TLR7 potencialne učinkovine pri zdravljenju te bolezni. (14, 22, 25-26)

#### 1.4 Zdravljenje z modulatorji TLR7

Kristalna struktura receptorja TLR7 je, kljub velikem potencialu v terapiji, do danes še neznana, zato je iskanje njegovih modulatorjev oteženo. Kljub temu so v kliničnem razvoju že majhne molekule, ki naj bi imele terapevtski pomen pri zdravljenju infekcijskih bolezni in sicer agonisti pri hepatitisu C, rakavih obolenjih, okužbi s humanim papilloma virusom ipd. ter antagonisti pri avtoimunskih boleznih kot so na primer lupus, revmatoidni artritis in Sjögrenov sindrom. (5, 14)

Izmed vseh TLR imajo TLR2, TLR4, TLR7 in TLR9 največjo vlogo pri avtoimunskih in kroničnih vnetnih boleznih. (10, 14)

Podjetje Dynavax je predstavilo IRS954 (DV1179), imunoregulatorno sekvenco, ki inhibira signaliziranje TLR7 in TLR9. IRS954 je pokazal pozitivne učinke v živalskih modelih z glomerulonefritisom, pljučno fibrozo in SLE, kar je vodilo do zmanjšanja serumskih vrednosti anti-dsDNA protiteles. DV1179 je že v poznejših fazah predkliničnega testiranja, kar kaže na njegov potencial za nadaljnji klinični razvoj. (10, 14, 16)

Podjetje Telormedix ima v kliničnih raziskavah TMX-101, ki je majhna molekula za zdravljenje raka na mehurju, ter v predkliničnih TMX-202, ki je agonist TLR7 za zdravljenje kožnega raka in raka na mehurju. TMX-202 ima močno afiniteto do TLR7, zato tudi manj stranskih učinkov in lahko doseže primerljiv ali boljši učinek tudi v nižjih dozah v primerjavi s topikalnimi zdravili. (13)

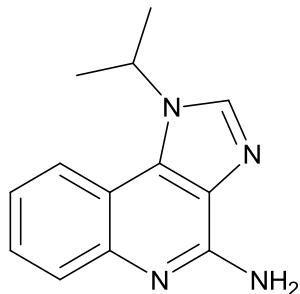
#### ***1.4.1 TLR agonisti kot adjuvanti***

TLR agonisti se do sedaj največ uporabljajo kot adjuvanti pri cepivih. Njihova naloga je povečati ali spremeniti farmakološko delovanje učinkovin. Z racionalnim načrtovanjem specifičnih TLR agonistov, ki imajo v primerjavi s tistimi izpred desetletja manjšo toksičnost in večjo učinkovitost, lahko zagotovimo visoko varnost uporabe profilaktičnih zdravil. Cepivo proti pappiloma virusu vsebuje monofosforil lipid (MPL) kot adjuvant. Predklinične študije kažejo, da imajo agonisti TLR3, TLR4, TLR7 in TLR7/8 potencial okrepitve terapevtskega cepljenja proti raku in kroničnim virusnim okužbam, tudi HIV in HBV. Okrepimo ga lahko tudi z optimiziranjem skupne dostave virusnega oz. tumorskega antiga z agonistom TLR. Na primer, v mišjem modelu kovalentna povezava CpG-ODN z ovalbuminom vodi do močnejšega CD8+ T-celičnega odziva kot CpG-ODN in mešanica antigenov. Konjugacija HIV Gag proteina z agonistom TLR7/8 podobno kot zgoraj bistveno poveča CD8+ T-celični odziv. Kombinacija agonista TLR in antiga lahko poveča sprejem antiga na dendritične celice, kar vodi v zmanjšanje doze antiga. Poleg tega je lahko aktivnost adjuvanta večine agonistov TLR okrepljena s formulacijo v maščobnih emulzijah, mikrodelcih ali virusno podobnih delcih, ki vsebujejo antigene. (3, 13, 18-19)

#### ***1.4.2 Imikvimod***

Imikvimod je imidazokinolinski derivat, agonist TLR7 in je bil odobren leta 1997 kot topikalno sredstvo za zdravljenje virusno-induciranih kožnih lezij (na primer genitalne in perianalne bradavice, ki so posledica okužbe z papillomavirusom), predrake aktinične keratoze, karcinoma bazalnih celic in lezije, ki je posledica metastatskega melanoma. Njegova protivirusna aktivnost je bila prvič prikazana pri morskih prašičkih, ki so bili okuženi s herpes simplex virusom. Imikvimod je bil klinično odobren istega leta kot je bil odkrit prvi TLR, vendar je šele leta 2002 postalo znano, da ima agonistično delovanje na TLR7. Dobro se je izkazal tudi pri zdravljenju okužbe s herpes simplex virusom, kar omogoča alternativno terapijo pri ljudeh, ki so odporni na konvencionalno zdravljenje.

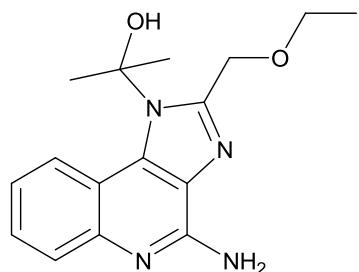
Kljub temu da natančen mehanizem delovanja ni znan in lahko vključuje tudi druge receptorje, se celični odziv na imikvimod kaže v indukciji citokinov (IFN- $\alpha$ , IL-12 in TNF $\alpha$ ) ter kemokinov (IL-8, monocitna vnetna proteina 1 $\alpha$  in 1 $\beta$ , monocitni kemotaktični protein 1). (5, 10, 18-19, 21)



**Slika 1: Imikvimod, agonist TLR7, povzeto po (18)**

#### **1.4.3 Resikvimod**

Raziskave kažejo, da resikvimod, protivirusni imidazokinolin, preko TLR7 in TLR8 inducira aktivacijo NF- $\kappa$ B. Ima večji potencial kot njegov derivat imikvimod in pričakovano je, da se bo uporabljal v kliniki. (15, 18)

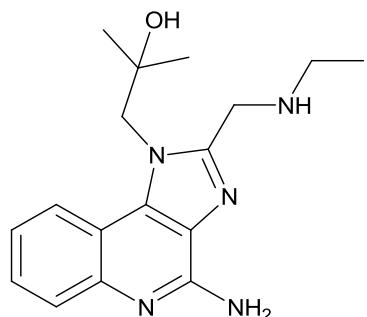


**Slika 2: Resikvimod, agonist TLR7, povzeto po (18)**

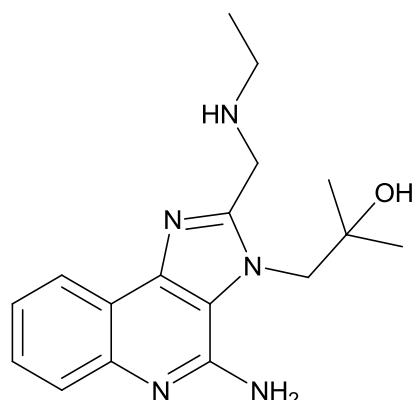
Študije kažejo, da so imunoaktivacijske lastnosti imikvima in resikvima izzvane preko prepozname na TLR7 in nato preko aktivacije MyD88-odvisne poti. TLR7-pomanjkljive miši se na imidazokinoline ne odzivajo in tako ne pride do imunskega odziva. Prav tako MyD88-oslabljene miši kot odziv na imidazokinoline ne proizvajajo vnetnih citokinov in ne aktivirajo signalnih molekul kot so NF- $\kappa$ B in Jnk. (18)

#### 1.4.4 Gardikvimod

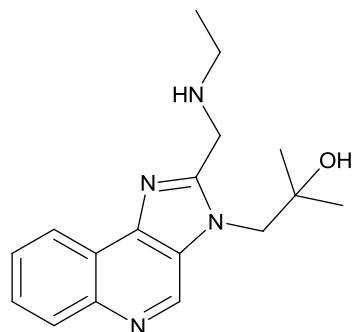
Gardikvimod je agonist TLR7. V študiji sta bila raziskana **3H-regioizomer** in **4-desamino-3H-regioizomer**, ki pa nista imela agonističnih lastnosti, ampak sta kazala antagonistično delovanje na TLR7 in sicer z  $IC_{50}$  vrednostima  $25 \mu M$  oz.  $7,5 \mu M$ . 4-desamino-3H-regioizomer je po naključju v MeOH tudi kristaliziral, zato je potencialna učinkovina za nadaljnje raziskave oz. spojina vodnica v iskanju bolj potencialnih majhnih molekul kot antagonistov TLR7. (5, 27-28)



Slika 3: Gardikvimod, agonist TLR7, povzeto po (27)



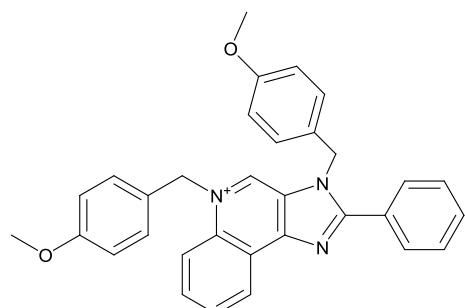
Slika 4: 3H-regioizomer gardikvimoda, povzeto po (27)



**Slika 5: 4-desamino-3H-regioizomer, povzeto po (27)**

#### **1.4.5 3,5-bis(4-metoksibenzil)-2-fenil-3H-imidazo[4,5-c]kinolin-5-ijev klorid**

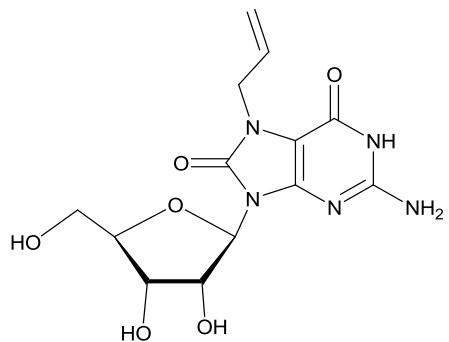
V eni izmed študij so sintetizirali in testirali 3,5-bis(4-metoksibenzil)-2-fenil-3H-imidazo[4,5-c]kinolin-5-ium. Zanimivo je, da ta spojina pri majhni IC<sub>50</sub> vrednosti (2,79±0,12 µM oz. 4,55±0,13) kaže antagonistične lastnosti na TLR7 in TLR8, kljub njeni strukturi, ki nakazuje, da naj ne bi prehajala membrane (kot že omenjeno, se TLR7 in TLR8 nahajata v endosomih). (28)



**Slika 6: 3,5-bis(4-metoksibenzil)-2-fenil-3H-imidazo[4,5-c]kinolin-5-ijev klorid, povzeto po (28)**

#### **1.4.6 Loksoribin**

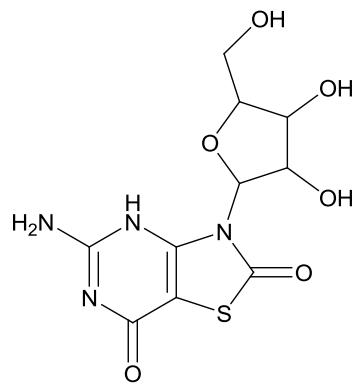
Nizko molekularni substituirani nukleozidi, kot so loksoribin (**7-alil-7,8-dihidro-8-okso-gvanozin**), 8-bromo-gvanozin in 8-merkapto-gvanozin, aktivirajo imunske celice, kar se kaže v izločanju citokinov. Loksoribin je najbolj potencialen gvanozinski analog in je selektiven agonist TLR7. V študiji, kjer so mišim brez TLR7 aplicirali loksoribin, se le-te nanj niso odzvale s proliferacijo ali produkcijo citokinov, kar kaže na to, da so TLR7 bistveni za prepoznavo adjuvanta loksoribina.(29-30)



**Slika 7: Loksoribin, agonist TLR7, povzeto po (29)**

#### 1.4.7 Isatoribin

V študijah na ljudeh je isatoribin, ki je agonist TLR7, zmanjšal virusno breme pri kronično okuženih bolnikih. Razvito je bilo tudi njegovo predzdravilo ANA975, peroralno apliciran analog za zdravljenje kronične okužbe s HCV. Prvi rezultati so bili obetavni, vendar so bili nadaljnji poskusi prekinjeni zaradi toksičnosti, ki se je pokazala pri dolgotrajajočih študijah na živalih. (19)



**Slika 8: Isatoribin, agonist TLR7, povzeto po (31)**

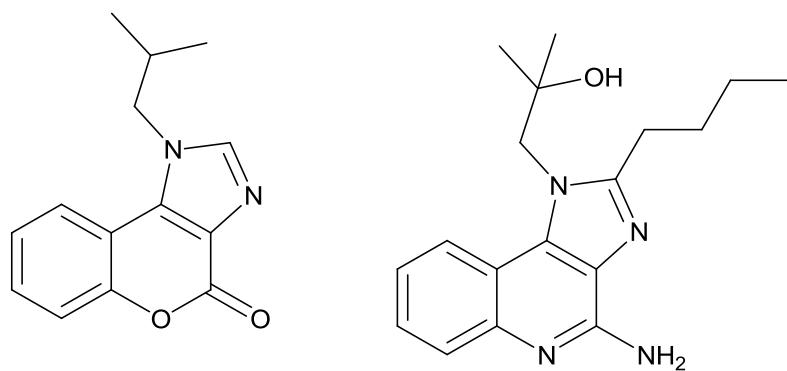
#### 1.4.8 Vodotopni imidazokinolini

Vodotopni imidazokinolin, ki bi ga lahko aplicirali sistemsko, predstavlja potencialno možnost zdravljenja številnih bolezni kot npr. kronično limfocitno levkemijo in rakava obolenja s trdimi tumorji. Nedavne študije so se osredotočile na izboljšavo stabilnosti agonistov TLR7/TLR8 z osnovo enoverižne RNK in na izboljšavo dostavnega sistema za sistemsko uporabo. (19)

#### 1.4.9 Spojina A

Na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani so s pomočjo virtualnega rešetanja na osnovi podobnosti s strukturo imikvimoda in nedavno odkrite spojine **B**, ki je najbolj potencialen imidazokinolinski agonist na TLR7, prišli do več potencialnih spojin zadetkov. Samo nekaj od njih je imelo agonistično delovanje, med njimi tudi spojina **A**, vendar zelo nizko v primerjavi z imikvimapom, zato je bilo testirano tudi njihovo antagonistično delovanje. Kot najbolj obetajoči antagonisti TLR7 so se izkazale tri spojine, med katerimi sta prvi dve, analoga imikvimoda (derivata **kromeno[3,4-d]imidazol-4-ona**), tretja pa je analog spojine **B** (derivat **1H-imidazo[4,5-d]piridazin-4,7-diona**). Kljub šibkejši TLR7 antagonistični aktivnosti, lahko zaradi njihove enostavne strukture in nizke molekulske mase, k potencialnim zadetkom štejemo tudi nekatere spojine z **6-amino-9H-purinsko** osnovo. Vse te spojine zadetki imajo zelo podobno 3D strukturo kot imikvimapom in spojina **B**. S to raziskavo so se pojavile tri nove kemijske strukture s potencialno TLR7 antagonistično aktivnostjo, vendar pa bo potrebnih še veliko nadaljnjih raziskav. Do danes je bilo objavljenih samo nekaj enoverižnih fosforotioatnih oligonukleotidov in izmed majhnih molekul nekaj  $3H$  imidazokinolinov. Zanimivo je, da sta bila izhodni spojini pri virtualnem rešetjanju agonista TLR7, rezultati zadetkov biološko ovrednotenih najvišje rangiranih spojin pa so kazali TLR7 antagonistično aktivnost. Iz tega sklepamo, da so verjetno strukturne lastnosti za agonistično in antagonistično delovanje zelo podobne. (5)

Ker je bil najbolj obetajoči zadetek spojina **A** ( $IC_{50}$  vrednost je  $23 \mu M$ ), je le-ta postala naš model strukturnega optimiziranja v iskanju novih potencialnih agonistov oz. antagonistov TLR7. (5)

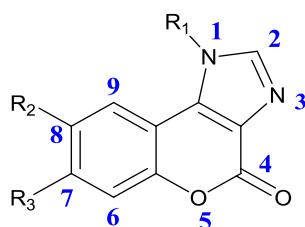


Slika 9: Spojina **A** ter spojina **B**, oba agonista TLR7, povzeto po (5)

## 2. NAMEN DELA

Glavna naloga magistrske naloge je sinteza novih, potencialnih ligandov TLR7, ki oponašajo strukturo spojine **A** (Slika 9), najdene s pomočjo virtualnega rešetanja na Fakulteti za farmacijo, ki je pokazala antagonistično delovanje na TLR7 (5). Naši cilji so sledeči:

- Sinteza analogov spojine **A** oziroma osnovnega skeleta kromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1H)-ona. Kot reagente bomo uporabili različne amine in derivate salicilaldehida. S tem bomo sintetizirali končne spojine z različnimi substituenti na mestih 1, 7 in 8 (Slika 10).



**Slika 10:** Novi derivati z različnimi substituenti  $R_1$ ,  $R_2$  in  $R_3$

- Optimizacija 2. stopnje reakcije. Z uporabo mikrovalovnega reaktorja bomo skušali skrajšati reakcijski čas, hkrati pa želimo zvišati tudi izkoristek.
- Spojinam bo določena topnost v celičnem mediju, citotoksičnost, agonistično ter antagonistično delovanje na celicah HEK-Blue<sup>TM</sup> hTLR7 in za najbolj aktivne še EC<sub>50</sub> vrednost. Na podlagi dobljenih rezultatov pa bo naša naloga opredeliti odnos med strukturo in delovanjem sintetiziranih spojin.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1 Materiali

- Pri laboratorijskem delu smo uporabljali **reagente, topila, sušilna in nevtralizacijska sredstva ter orositvene reagente** različnih proizvajalcev, in sicer Acros Organics, Carlo Erba reagents, Gram-mol, Maybridge, Merck, Panreac in Sigma-Aldrich (Aldrich, Fluka, Sigma).

<b>Reagenti</b>	butilamin, <i>N,N</i> -dimetiletilendiamin, alilamin, etilamin, propilamin, izopropilamin, 2-metoksietilamin, 2,4,6-trihidroksibenzaldehid, 3-metoksipropilamin, etil 2-izocianoacetat, salicilaldehid, 5-F-salicilaldehid, piridin, bakrov (I) jodid, 96 % vodna raztopina žveplove (VI) kisline
<b>Topila</b>	MeOH, DKM, aceton, etilacetat, dietileter, petroleter, prečiščena voda
<b>Sušilna sredstva</b>	natrijev sulfat, nasičena vodna raztopina natrijevega klorida
<b>Nevtralizacijska sredstva</b>	natrijev hidrogenkarbonat, natrijev hidroksid, klorovodikova kislina
<b>Orositveni reagenti</b>	2,4-dinitrofenilhidrazin, ninhidrin (15 mg/mL ninhidrina, raztopljenega v 96% etanol/ocetna kislina), železov (III) klorid v etanolu ( $\text{FeCl}_3/\text{EtOH}$ )

- **Laboratorijska oprema:** Laboratorijska tehnica Mettler toledo PB403-S  
Magnetno mešalo IKA RTC basic  
Rotavapor Buchi waterbath B-480  
UV-svetilka Lamag cabinet II  
Grelna pištola Skil 8000  
Mikrovalovni reaktor CEM Discover z IR in optičnim načinom merjenja temperature

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Kromatografske metode

#### ➤ Tankoplastna kromatografija (TPK oz. TLC)

Za spremljanje poteka reakcije, prisotnosti in čistosti izoliranih spojin iz reakcije zmesi ter primerjalno kvalitativno določevanje vsebine reakcijske zmesi smo uporabili TPK. Ta metoda je hitra in enostavna za uporabo. Uporabljeni so bile plošče Kisegel 60 GF<sub>254</sub> proizvajalca Merck DC Fertigplatten. To so aluminijaste plošče z 0,20 mm nanosom silikagela, ki mu je bil predhodno dodan fluorescenčni indikator. Ta plošča predstavlja stacionarno fazo TPKja. Uporabljeni mobilni faze so opisane pri posameznih sintezah. Za razločevanje lis na kromatografski ploščici smo uporabili UV svetlobo valovne dolžine 254 nm ali 366 nm. Včasih smo za identifikacijo spojin uporabili tudi orositvene reagente.

#### ➤ Kolonska kromatografija

Kolonsko kromatografijo smo uporabili za čiščenje reakcijske zmesi in izolacijo želene spojine. Za stacionarno fazo smo uporabili Silikagel 60 (velikost delcev 0,063 – 0,400 nm) proizvajalca Merck. Mobilne faze so opisane pri posameznih sintezah.

#### ➤ Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Reverzno-fazno HPLC analizo smo uporabili za določitev čistosti spojin. Izvedli smo jo na Agilent 1100 sistemu (Agilent Technologies), s kvarterno črpalko in detektorjem večih valovnih dolžin.

Parametri metode:

Kolona	Agilent Eclipse Plus C18 (4,6 x 50 mm, delci velikosti 5 µm)	
Pretok mobilne faze	1 mL/min	
Detekcija	220 nm, 254 nm in 280 nm	
Volumen injiciranja	5 µL	
Elucijski sistem	Temperatura sistema	sobna temperatura
	Čas posamezne analize	22 min

	Zmes elucijskih topil	CH <sub>3</sub> CN/0,1% TFA
	Elucijski gradient	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 0-15 min: (20% CH<sub>3</sub>CN/0,1% TFA → 80% CH<sub>3</sub>CN/0,1% TFA)</li> <li>➤ 15 – 17,5 min: 80% CH<sub>3</sub>CN/0,1% TFA</li> <li>➤ Do 18 min: (80% → 20%) CH<sub>3</sub>CN/0,1% TFA</li> <li>➤ Post time 4 min</li> </ul>

Čistost je podana pri posamezni spojini.

### 3.2.2 Spektroskopske metode

#### ➤ Masna spektroskopija

Masno spektroskopijo smo uporabili za natančno določitev mase molekul. Masni spektri so bili posneti v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani, in sicer na masnem spektrometru VG-Analytical Autospec Q mass proizvajalca Micromass z ESI in HRMS tehniko.

#### ➤ Jedrska magnetna resonanca

Za potrditev struktur spojin smo posneli <sup>1</sup>H-NMR in <sup>13</sup>C-NMR spektre (slednje samo za končne spojine). Analize so bile izvršene na Bruker Avance 400 DPX 400 MHz spektrometru na Fakulteti za farmacijo. Uporabili smo različni devterirani topili CDCl<sub>3</sub> in DMSO-d<sub>6</sub>. Za interni standard smo uporabili tetrametilsilan (TMS, δ = 0,00 ppm). Kemijske premike smo podali v ppm (»parts per million«), sklopitvene konstante (J) v hertzih (Hz), oblike vrhov pa s standardnimi oznakami za singlet (s), široki singlet (br s), dublet (d), dublet dubleta (dd), triplet dubleta (td), triplet (t), kvartet (q), kvintet (quin), sextet (sex) in multiplet (m). Analizo spektrov smo izvedli na računalniškem programu MestReNova 8.1.2 – 11880 proizvajalca Mestrelab Research S.L.

#### ➤ Infrardeča spektroskopija

IR spektri so bili posneti na Thermo Nicolet FT-IR Nexus spektrometru. Uporabljena je bila ATR tehnika.

### **3.2.3 Risanje reakcijskih shem in poimenovanje struktur spojin**

Za risanje reakcijskih shem in IUPAC poimenovanje spojin smo uporabili računalniški program ChemDraw Ultra 12.0.2.1076 proizvajalca CambridgeSoft

### **3.2.4 Aparatura za potek reakcij – mikrovalovni reaktor**

Reakcije 2. stopnje so potekale v mikrovalovnem reaktorju CEM Discover z IR in optičnim načinom merjenja temperature.

### **3.2.5 Določanje temperature tališča**

Temperature tališč produktov vmesnih stopenj in končnih produktov smo določali na mikroskopu Leica z ogrevalno mizico (Koflerjev talilni mikroskop). Vrednosti so nekorigirane.

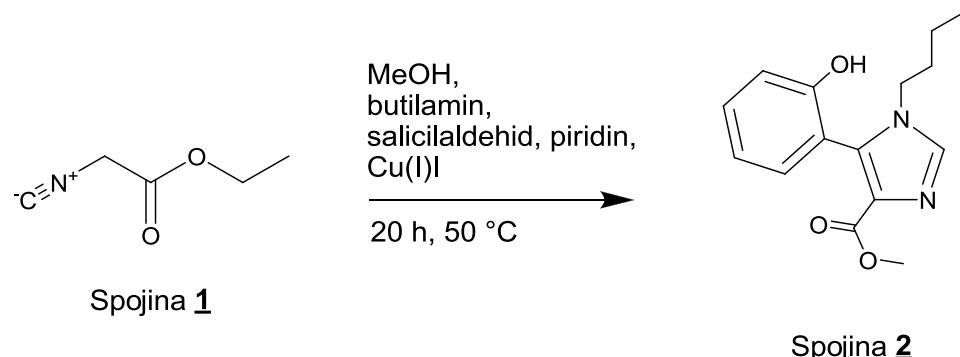
### **3.2.6 Biološko testiranje**

V okviru paralelne magistrske naloge Mane Gartner (32) je bilo na Zavodu za transfuzijsko medicino Republike Slovenije pod mentorstvom doc. dr. Urbana Švajger izvedeno biološko testiranje aktivnosti spojin, in sicer na celicah komercialno dostopne celične linije HEK-Blue<sup>TM</sup> hTLR7 proizvajalca InvivoGen, ki je namenjen raziskovanju stimulacije humanega receptorja TLR7. Delo je zajemalo testiranje topnosti in citotoksičnosti, določanje agonistične in antagonistične aktivnosti ter določanje vrednosti EC<sub>50</sub>.

## 4. EKSPERIMENTALNI DEL

### 4.1 Sinteza spojine **3**

#### 1. stopnja: sinteza spojine **2**



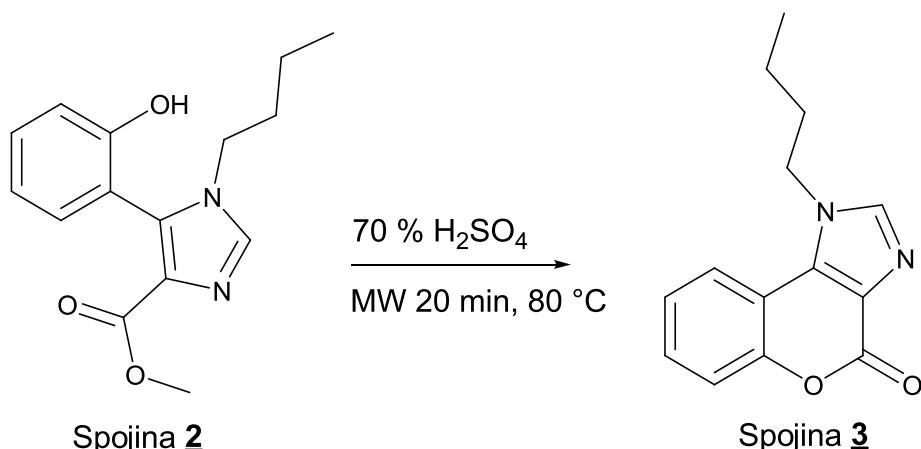
**Slika 11:** Reakcijska shema sinteze spojine **2**

V suho 250 mL bučko smo z merilnim valjem odmerili MeOH (27 mL), dodali butilamin (0,70 mL, 7 mmol), salicilaldehid (0,74 mL, 7 mmol), piridin (0,56 mL, 7 mmol) ter bakrov (I) jodid (0,133g, 0,07 mmol) in etil 2-izocianoacetat (Spojina **1**) (0,77 mL, 7 mmol). Nato smo z magnetnim mešalom pod refluksom mešali 20h pri 50°C. Po končani reakciji smo reakcijski zmesi odparili topilo pod znižanim tlakom in produkt očistili s kolonsko kromatografijo. Izvedli smo gradientno kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili diklorometan (DKM), ki smo mu postopoma (v razmerjih 50:1, 20:1 in na koncu 9:1) dodajali MeOH. Zbranim frakcijam produkta smo pod znižanim tlakom odparili topilo. Sledila je prekristalizacija iz acetona. Dobili smo bele kristale.

Spojina <b>2</b>	
IUPAC ime	metil 1-butil-5-(2-hidroksifenil)-1H-imidazol-4-karboksilat
Molekulska formula	$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$
Molekulska masa	274,32
Izgled	beli kristali
Izkoristek reakcije	16 %
$R_f$ (mobilna faza)	0,47 (DKM:MeOH=9:1)
$T_{\text{tal}}$	118-122 °C
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	$\delta$ (ppm) 0,77 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 1,15 (sex, 2H, $J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 1,52 (quin, 2H, $J = 7,2$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ); 3,76 (s, 3H, $\text{OCH}_3$ ); 3,82 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ); 7,00 (dt, $J_1 = 0,8$

	Hz, $J_2 = 7,6$ Hz, Ar-H); 7,12 (dd, 2H, $J_1 = 1,2$ Hz, $J_2 = 7,6$ Hz, Ar-H); 7,34-7,38 (m, 1H, Ar-H); 7,57 (br, s, 1H, Ar-H); 1H od Ar-OH je izmenjan
$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	$\delta$ (ppm) 13,33; 19,49; 32,35; 45,54; 51,99; 116,46; 118,63; 120,61; 130,62; 131,27; 131,32; 134,73; 137,81; 155,03; 164,36
IR	3111, 2956, 2866, 1690, 1617, 1576, 1506, 1479, 1440, 1396, 1367, 1339, 1295, 1220, 1188, 1151, 1115, 1061, 1035, 1014, 947, 867, 815, 793, 757, 707, 668, 655 $\text{cm}^{-1}$
ESI-HRMS	Izračunana vrednost [M+H $^+$ ] (m/z): 275,1396 Izmerjena vrednost (m/z): 275,1398

## 2. stopnja: sinteza spojine **3**



**Slika 12: Reakcijska shema sinteze spojine **3****

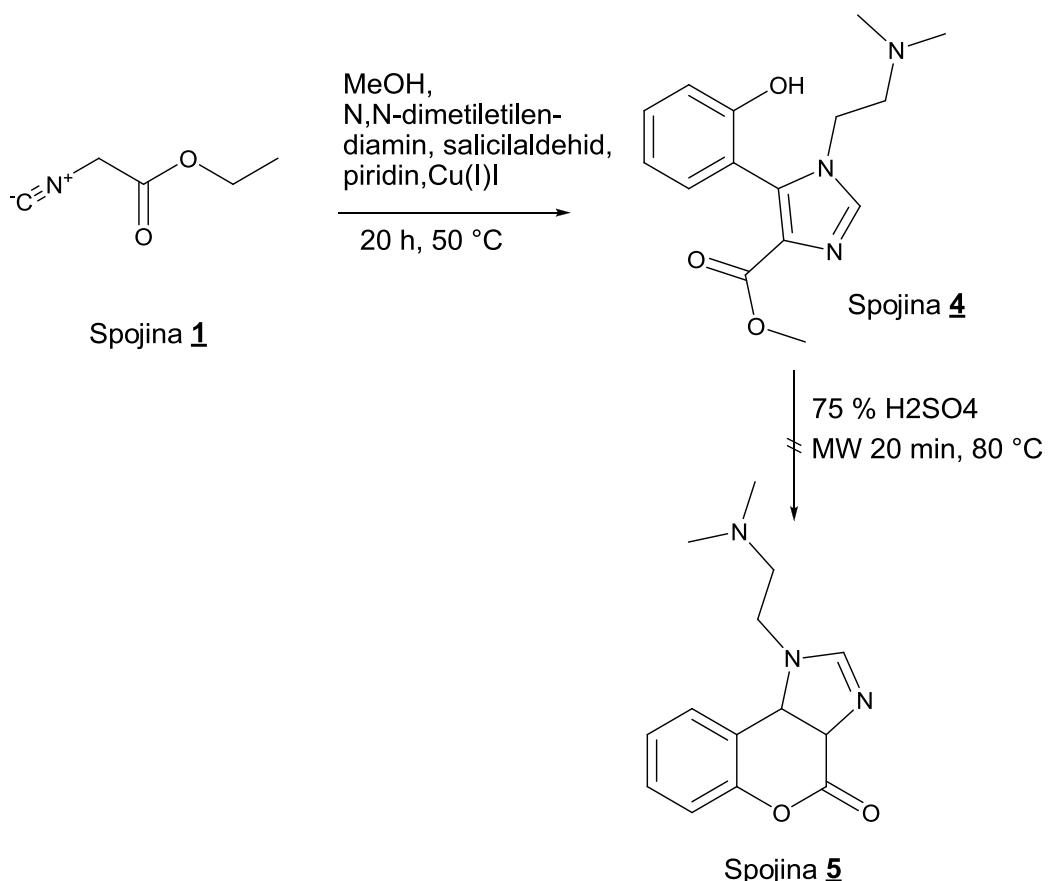
V suho vialo za mikrovalovni reaktor smo natehtali kristale spojine **2**, dodali 70% žveplovo (VI) kislino (3 ml) in segrevali 20 minut v mikrovalovnem reaktorju pri 80°C. Sledila je uravnava pH z 1M NaOH do pH vrednosti med 2 in 3 ter ekstrakcija z 3 x 20 mL etilacetata. Združene organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl ter sušili z brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po filtraciji smo matičnici z uporabo rotavaporja uparili topilo ter produkt očistili s kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze DKM:MeOH = 50:1. Frakcijam, ki so po TPK analizi kazale prisotnost spojine **3**, smo odparili topilo pod znižanim tlakom in stehtali nastale bele kristale.

Spojina <b>3</b>	
IUPAC ime	1-butylkromeno[3,4-d]imidazol-4(1H)-on
Molekulska formula	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

Molekulska masa	242,27
Izgled	beli kristali
Izkoristek reakcije	28%
R <sub>f</sub> (mobilna faza)	0,62 (DKM:MeOH=9:1)
T <sub>tal</sub>	117-121 °C
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ (ppm) 0,99 (t, J= 7,6 Hz, 3H, CH <sub>3</sub> ); 1,45 (sex, J= 7,6 Hz, 2H, CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> ); 1,92-1,95 (m, 2H, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 4,43 (t, J= 7,2 Hz, 2H, NCH <sub>2</sub> ); 7,34 (ddd, J <sub>1</sub> = 1,6 Hz, J <sub>2</sub> = 7,2 Hz, J <sub>3</sub> = 8,0 Hz, 1H, Ar-H); 7,41 (ddd, J <sub>1</sub> = 0,4 Hz, J <sub>2</sub> = 1,6 Hz, J <sub>3</sub> = 8,0 Hz, 1H, Ar-H); 7,47 (ddd, J <sub>1</sub> = 1,4 Hz, J <sub>2</sub> = 7,2 Hz, J <sub>3</sub> = 8,0 Hz, 1H, Ar-H); 7,75 (dd, J <sub>1</sub> = 1,4 Hz, J <sub>2</sub> = 8,0 Hz, 1H, Ar-H); 7,77 (s, 1H, imidazol-H)
<sup>13</sup> C-NMR (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ (ppm) 13,55; 19,73; 32,08; 47,44; 113,15; 118,24; 120,92; 124,48; 127,54; 129,65; 134,83; 143,04; 152,08; 156,89
HPLC	t <sub>r</sub> = 10,519 min (čistost 98,0 %)
IR	3094, 2964, 2361, 1718, 1522, 1468, 1400, 1380, 1292, 1257, 1231, 1206, 1123, 1084, 1040, 10028, 975, 910, 887, 835, 815, 791, 760, 673, 652, 634 cm <sup>-1</sup>
ESI-HRMS	Izračunana vrednost [M+H <sup>+</sup> ] (m/z): 243,1134 Izmerjena vrednost (m/z): 243,1132

## 4.2 Sinteza spojine **5**

1. stopnja: sinteze spojine **4**

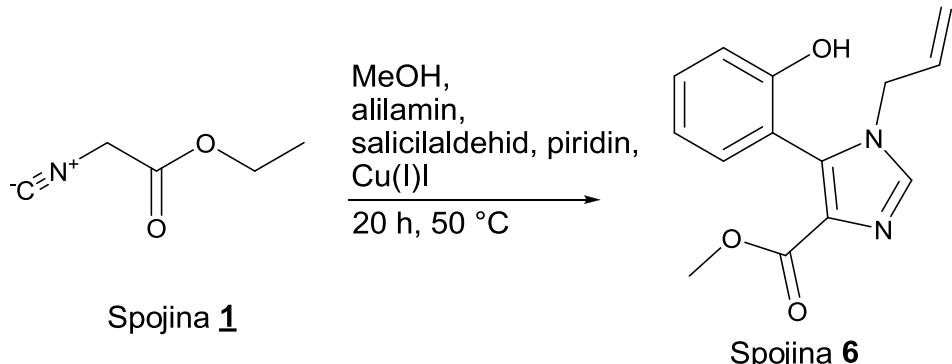


**Slika 13: Reakcijska shema sinteze spojine 4 in 5**

V suho 250 mL bučko smo z merilnim valjem odmerili MeOH (27mL, 7 mmol), dodali *N,N*-dimetiletilendiamin (0,77 mL, 7 mmol), salicilaldehid (0,74 mL, 7 mmol), piridin (0,56 mL, 7 mmol) ter bakrov (I) jodid (0,133g, 0,07 mmol) in spojino **1** (0,77 mL, 7 mmol). Nato smo z magnetnim mešalom pod refluksom mešali 20h pri 50°C. Po končani reakciji smo reakcijski zmesi odparili topilo pod znižanim tlakom in produkt očistili s kolonsko kromatografijo. Izvedli smo gradientno kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili DKM, ki smo mu postopoma (v razmerjih 25:1, 20:1 in na koncu 9:1) dodajali MeOH. Zbranim frakcijam produkta smo odparili topilo. Sledila je prekristalizacija iz acetona. Dobili smo bele kristale. Ker je bil izkoristek zelo slab (0,35 %), smo dobili premalo spojine za analize in nadaljnjo sintezo spojine **5**.

## 4.3 Sinteza spojine **7**

### 1. stopnja: sinteze spojine **6**



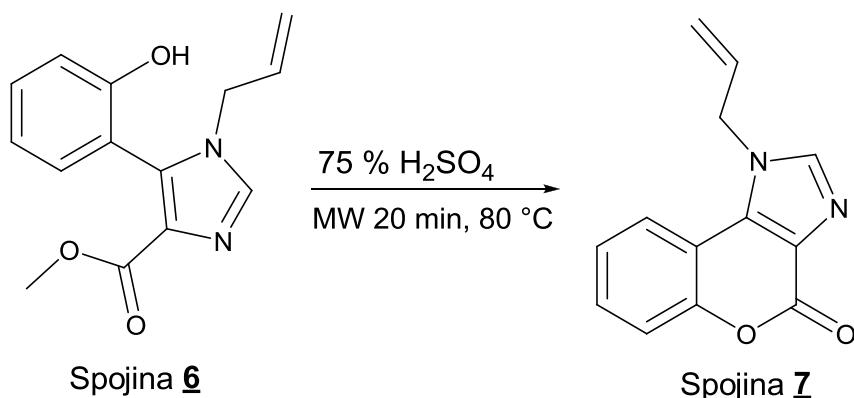
**Slika 14: Reakcijska shema sinteze spojine **6****

V suho 250 mL bučko smo z merilnim valjem odmerili MeOH (27 mL), dodali alilamin (0,52 mL, 7 mmol), salicilaldehid (0,74 mL, 7 mmol), piridin (0,56 mL, 7 mmol) ter bakrov(I) jodid (0,133g, 0,07 mmol) in spojino **1** (0,77 mL, 7 mmol). Nato smo z magnetnim mešalom pod refluksom mešali 20h pri 50°C. Po končani reakciji smo reakcijski zmesi odparili topilo pod znižanim tlakom in produkt očistili s kolonsko kromatografijo. Izvedli smo gradientno kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili DKM, ki smo mu postopoma (v razmerju 50:1, 25:1 in 20:1) dodajali MeOH. Zbranim frakcijam produkta smo pod znižanim tlakom odparili topilo. Sledila je prekristalizacija iz acetona. Dobili smo bele kristale, ki smo jih nato še stehtali.

Spojina <b>6</b>	
IUPAC ime	metil 1-alil-5-(2-hidroksifenil)-1H-imidazol-4-karboksilat
Molekulska formula	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Molekulska masa	258,27
Izgled	beli kristali
Izkoristek reakcije	39 %
R <sub>f</sub> (mobilna faza)	0,44 (DKM:MeOH = 20:1)
T <sub>tal</sub>	128-131 °C
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ (ppm) 3,82 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ); 4,37-4,50 (m, 2H, NCH <sub>2</sub> ); 5,07 (d, J= 16,8 Hz, 1H, CH=CH <sub>a</sub> ); 5,24 (d, J= 10,0 Hz, 1H, CH=CH <sub>b</sub> ); 5,79-5,89 (m, 1H, CH); 7,02 (t, J= 7,4 Hz, 1H, Ar-H); 7,12-7,175 (m, 2H, Ar-H); 7,38 (t, J= 7,4 Hz, 1H, Ar-H ); 7,63 (bs, 1H, imidazol-H); 1H od ArOH je izmenjan
<sup>13</sup> C-NMR (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ (ppm) 48,31; 51,96; 116,25; 118,44; 119,26; 120,34; 131,39;

	131,52; 131,79; 134,41; 138,22; 149,81; 155,15; 164,20
IR	3108, 2538, 1692, 1619, 1577, 1507, 1479, 1439, 1390, 1352, 1293, 1224, 1189, 1035, 1015, 996, 948, 912, 872, 818, 792, 751, 672, 656, 616 cm <sup>-1</sup>
ESI-HRMS	Izračunana vrednost [M+H <sup>+</sup> ] (m/z): 259,1086 Izmerjena vrednost (m/z): 259,1083

2.stopnja: sinteza spojine 7



Slika 15: Reakcijska shema sinteze spojine 7

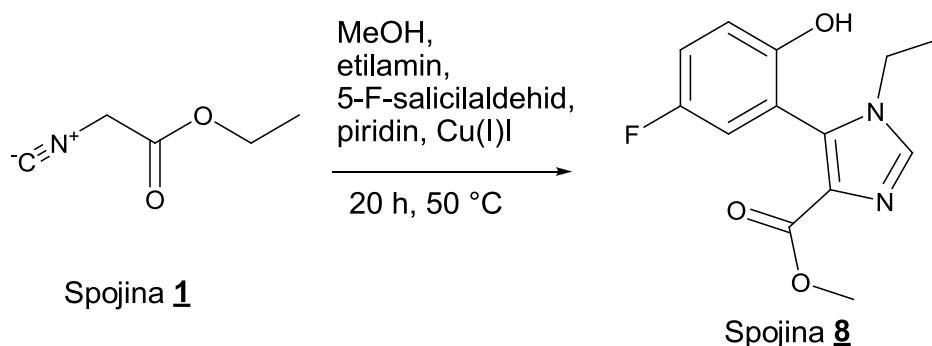
V suho vialo za mikrovalovni reaktor smo natehtali kristale spojine 6, dodali 70% žveplovo (VI) kislino (6 ml) in segrevali 20 minut v mikrovalovnem reaktorju pri 80°C. Sledilo je naalkaljenje z 1M NaOH do pH vrednosti med 2 in 3 ter ekstrakcija z 3 x 20 mL etilacetata. Združene organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl ter sušili z brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po filtraciji smo matičnici uparili topilo ter produkt očistili s kolonsko kromatografijo z uporabo DKM kot mobilne faze, ki smo jo nato zamenjali za DKM:MeOH = 50:1. Frakcijam, ki so po TPK analizi kazale prisotnost spojine 7, smo odparili topilo pod znižanim tlakom in stehtali nastale bele kristale.

Spojina <u>7</u>	
IUPAC ime	1-alilkromeno[3,4-d]imidazol-4(1H)-on
Molekulska formula	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Molekulska masa	226,23
Izgled	beli kristali
Izkoristek reakcije	23%
R <sub>f</sub> (mobilna faza)	0,60 (DKM:MeOH=9:1)
T <sub>tal</sub>	156-160 °C
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ (ppm) 4,94 (td, J <sub>1</sub> = 1,6 Hz, J <sub>2</sub> = 17,2 Hz, 1H, CH=CH <sub>a</sub> ); 5,05-

	5,07 (m, 2H, NCH <sub>2</sub> ); 5,26 (td, $J_1= 1,6$ Hz, $J_2= 10,4$ Hz, 1H, CH=CH <sub>b</sub> ); 6,08 (tdd, $J_1= 4,6$ Hz, $J_2= 10,4$ Hz, $J_3= 17,2$ Hz, 1H, NCH <sub>2</sub> CH); 7,18-7,25 (m, 2H, 2 x Ar-H); 7,34 (ddd, $J_1= 1,2$ Hz, $J_2= 7,2$ Hz, $J_3= 8,6$ Hz, 1H, Ar-H); 7,63 (dd, $J_1= 1,2$ Hz, $J_2= 8,0$ Hz, 1H, Ar-H); 7,80 (s, 1H, imidazol-H)
<sup>13</sup> C-NMR (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	$\delta$ (ppm) 49,32; 112,6; 117,70; 118,74; 121,59; 124,37; 127,16; 129,66; 131,04; 135,34; 143,32; 151,86; 156,90
HPLC	t <sub>r</sub> = 8,215 min (čistost 98,4 %)
IR	1730, 1617, 1584, 1519, 1433, 1408, 1376, 1310, 1270, 1210, 1131, 1082, 1041, 976, 912, 887, 848, 749, 991, 638 cm <sup>-1</sup>
ESI-HRMS	Izračunana vrednost [M+H <sup>+</sup> ] (m/z): <b>227,0827</b> Izmerjena vrednost (m/z): <b>227,0821</b>

#### 4.4 Sinteza spojine **9**

##### 1. stopnja: sinteze spojine **8**

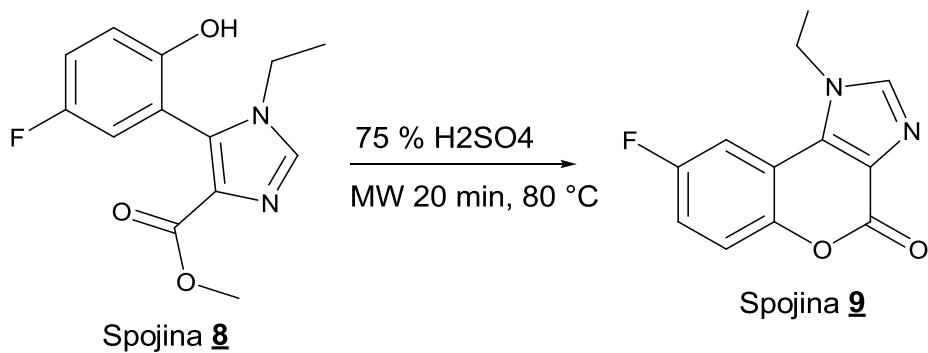


**Slika 16: Reakcijska shema sinteze spojine **8****

V suho 250 mL bučko smo z merilnim valjem odmerili MeOH (27 mL), dodali etilamin (0,39 mL, 7 mmol) mL, 5-F-salicilaldehid (980 mg, 7 mmol), piridin (0,56 mL, 7 mmol) ter bakrov(I) jodid (0,133g, 0,07 mmol) in spojino **1** (0,77 mL, 7 mmol). Nato smo z magnetnim mešalom pod refluksom mešali 20h pri 50°C. Po končani reakciji smo reakcijski zmesi odparili topilo pod znižanim tlakom in produkt očistili s kolonsko kromatografijo. Izvedli smo gradientno kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili DKM, ki smo mu postopoma (v razmerjih 50:1, 20:1 in na koncu 9:1) dodajali MeOH. Zbranim frakcijam produkta smo pod znižanim tlakom odparili topilo. Sledila je prekristalizacija iz acetona. Dobili smo bele kristale, ki smo jih nato še stehtali.

Spojina <b>8</b>	
IUPAC ime	metil 1-etil-5-(5-fluoro-2-hidroksifenil)-1H-imidazol-4-karboksilat
Molekulska formula	C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Molekulska masa	264,25
Izgled	beli kristali
Izkoristek reakcije	17%
R <sub>f</sub> (mobilna faza)	0,42 (DKM:MeOH=9:1)
T <sub>tal</sub>	177-183 °C
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ (ppm) 1,16 (t, J= 7,4 Hz, 3H, CH <sub>3</sub> ); 3,43 (q, J= 7,4 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,58 (s, 3H, O-CH <sub>3</sub> ); 6,93 (dd, J <sub>1</sub> = 4,8 Hz, J <sub>2</sub> = 8,8 Hz, 1H, Ar-H); 7,04 (dd, J <sub>1</sub> = 3,2 Hz, J <sub>2</sub> = 9,2 Hz, 1H, Ar-H); 7,14 (dt, J <sub>1</sub> = 3,2 Hz, J <sub>2</sub> = 8,8 Hz, 1H, Ar-H); 7,89 (s, 1H, imidazol-H); 9,80 (s, 1H, OH)
<sup>13</sup> C-NMR (100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ (ppm) 15,68; 50,69; 116,36 (d, <sup>3</sup> J <sub>C,F</sub> = 8,2 Hz); 116,90 (d, <sup>2</sup> J <sub>C,F</sub> = 22,7 Hz); 117,10 (d, <sup>3</sup> J <sub>C,F</sub> = 9,1 Hz); 118,35 (d, <sup>2</sup> J <sub>C,F</sub> = 23,3 Hz); 129,36; 134,04; 137,48; 151,71; 153,64; 154,83 (d, <sup>1</sup> J <sub>C,F</sub> = 234,2 Hz); 162,82
IR	3005, 1692, 1574, 1511, 1487, 1450, 1341, 1275, 1222, 1196, 1165, 1026, 952, 889, 871, 809, 775, 657 cm <sup>-1</sup>
ESI-HRMS	Izračunana vrednost [M+H <sup>+</sup> ] (m/z): <b>265,0981</b> Izmerjena vrednost (m/z): <b>265,0988</b>

## 2. stopnja: sinteza spojine **9**



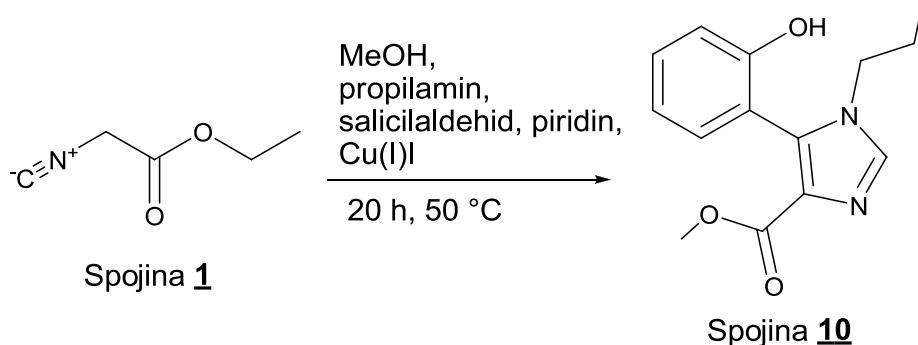
**Slika 17: Reakcijska shema sinteze spojine **9****

V suho vialo za mikrovalovni reaktor smo natehtali kristale spojine **8**, dodali 70% žveplovo (VI) kislino (3 ml) in segrevali 20 minut v mikrovalovnem reaktorju pri 80°C. Sledilo je naalkaljenje z 1M natrijevim hidroksidom do pH vrednosti med 2 in 3. Med ekstrakcijo z etilacetatom (3 x 20 mL) so izpadli beli kristali spojine **9**, katere smo nato stehtali.

Spojina <b>9</b>	
IUPAC ime	1-etil-8-fluorokromeno[3,4-d]-imidazol-4(1H)-on
Molekulska formula	C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Molekulska masa	232,21
Izgled	beli kristali
Izkoristek reakcije	6%
R <sub>f</sub> (mobilna faza)	0,57 (DKM:MeOH=9:1)
T <sub>tal</sub>	224-230 °C
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ (ppm) 1,47 (t, J= 7,2 Hz, 3H, CH <sub>3</sub> ); 4,58 (q, J= 7,2 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> ); 7,45 (dt, J <sub>1</sub> = 2,8 Hz, J <sub>2</sub> = 8,8 Hz, 1H, Ar-H); 7,58 (dd, J <sub>1</sub> = 4,8 Hz, J <sub>2</sub> = 9,2 Hz, 1H, Ar-H); 7,82 (dt, J <sub>1</sub> = 2,8 Hz, J <sub>2</sub> = 9,2 Hz, 1H, Ar-H); 8,30 (s, 1H, imidazol-H)
<sup>13</sup> C-NMR (100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ (ppm) 15,47; 41,69; 107,96 (d, <sup>2</sup> J <sub>C,F</sub> = 26,3 Hz); 113,57 (d, <sup>3</sup> J <sub>C,F</sub> = 9,7 Hz); 116,70 (d, <sup>2</sup> J <sub>C,F</sub> = 24,3 Hz); 119,23 (d, <sup>3</sup> J <sub>C,F</sub> = 9,1 Hz); 126,75; 133,95; 144,06; 147,70; 155,76; 158,19 (d, <sup>1</sup> J <sub>C,F</sub> = 240,7 Hz)
HPLC	t <sub>r</sub> = 8,067 min (čistost 96,2 %)
IR	3096, 1715, 1527, 1448, 1363, 1257, 1182, 1121, 1099, 1010, 963, 890, 860, 835, 815, 775, 648, 613 cm <sup>-1</sup>
ESI-HRMS	Izračunana vrednost [M+H <sup>+</sup> ] (m/z): <b>233,0720</b> Izmerjena vrednost (m/z): <b>233,0726</b>

#### 4.5 Sinteza spojine **11**

##### 1. stopnja: sinteze spojine **10**



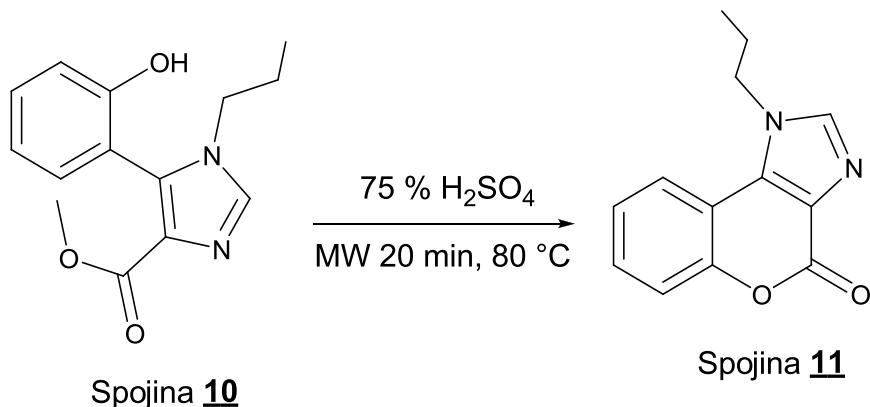
**Slika 18: Reakcijska shema sinteze spojine **10****

V suho 250 mL bučko smo z merilnim valjem odmerili MeOH (27 mL), dodali propilamin (0,58 mL, 7 mmol), salicilaldehid (0,74 mL, 7 mmol), piridin (0,56 mL, 7 mmol) ter bakrov(I) jodid (0,133g, 0,07 mmol) in spojino **1** (0,77 mL, 7 mmol). Nato smo z magnetnim mešalom pod refluxom mešali 20h pri 50°C. Po končani reakciji smo

reakcijski zmesi odparili topilo pod znižanim tlakom in produkt očistili s kolonsko kromatografijo. Izvedli smo gradientno kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili DKM, ki smo mu postopoma (v razmerju 50:1, 20:1 in na koncu 9:1) dodajali MeOH. Zbranim frakcijam produkta smo pod znižanim tlakom odparili topilo. Sledila je prekristalizacija iz acetona. Dobili smo bele kristale, ki smo jih nato še stehtali.

Spojina <b>10</b>	
IUPAC ime	metil 5-(2-hidroksifenil)-1-propil-1H-imidazol-4-karboksilat
Molekulska formula	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Molekulska masa	260,29
Izgled	beli kristali
Izkoristek reakcije	8 %
R <sub>f</sub> (mobilna faza)	0,47 (DKM:MeOH=9:1)
T <sub>tal</sub>	148-150 °C
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ (ppm) 0,80 (t, J= 7,2 Hz, 3H, CH <sub>3</sub> ); 1,61 (sex, J= 7,2 Hz 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,79–3,86 (m, 2H, NCH <sub>2</sub> ); 3,86 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ); 7,05 (t, J= 7,6 Hz, 1H, Ar-H); 7,14 (d, J= 7,6 Hz, 1H, Ar-H); 7,19 (d, J= 8,4 Hz, 1H, Ar-H); 7,41 (t, J= 7,6 Hz, 1H. Ar-H); 7,73 (br s, 1H, imidazol-H); 2H od Ar-OH je izmenjan
<sup>13</sup> C-NMR(100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ (ppm) 10,94; 23,60; 47,62; 51,89; 116,60; 118,21; 120,35; 130,19; 131,25; 131,50; 135,12; 137,80; 155,13; 164,07
IR	2961, 2698, 1985, 1709, 1594, 1556, 1509, 1449, 1391, 1350, 1327, 1288, 1220, 1194, 1166, 1108, 1056, 1014, 943, 902, 816, 791, 758, 709, 653 cm <sup>-1</sup>
ESI-HRMS	Izračunana vrednost [M+H <sup>+</sup> ] (m/z): <b>261,1238</b> Izmerjena vrednost (m/z): <b>261,1239</b>

## 2. stopnja: sinteza spojine **11**



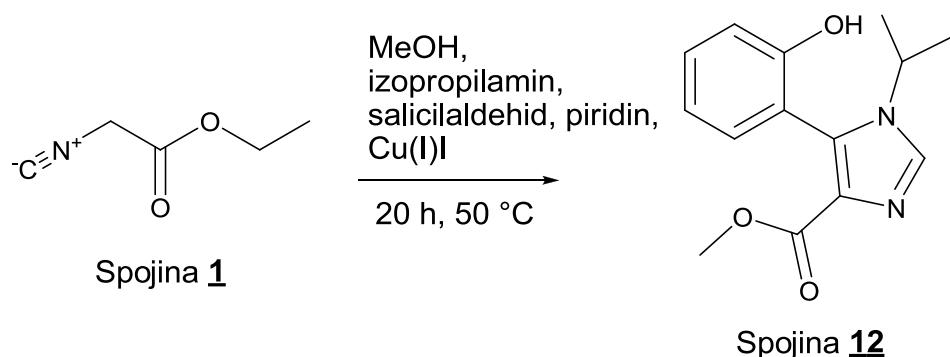
Slika 19: Reakcijska shema sinteze spojine **11**

V suho vialo za mikrovalovni reaktor smo natehtali kristale spojine **10**, dodali 70% žveplovo (VI) kislino (3 ml) in segrevali 20 minut v mikrovalovnem reaktorju pri 80°C. Sledilo je naalkaljenje z 1M natrijevim hidroksidom do pH vrednosti med 2 in 3. Nato smo reakcijski zmesi dodali etileter in z dodatkom petroletra izoborili spojino **11** v obliki belih kristalov.

Spojina <b>11</b>	
IUPAC ime	1-propilkromeno[3,4- <i>d</i> ]imidazol-4(1H)-on
Molekulska formula	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Molekulska masa	228,25
Izgled	beli kristali
Izkoristek reakcije	42 %
R <sub>f</sub> (mobilna faza)	0,55 (DKM:MeOH=9:1)
T <sub>tal</sub>	136-138 °C
<sup>1</sup> H-NMR (400 Hz, CDCl <sub>3</sub> )	δ (ppm) 1,07 (t, J = 7,2 Hz, 3H, CH <sub>3</sub> ); 1,97-2,04 (sex, 2H, J = 7,2 Hz, 2H, CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> ); 4,42 (t, J = 7,2 Hz, 2H, NCH <sub>2</sub> ); 7,36 (dt, J <sub>1</sub> = 1,2 Hz, J <sub>2</sub> = 7,6 Hz, 1H, Ar-H); 7,44-7,51 (m, 2H, 2 x Ar-H); 7,76 (d, J = 7,6 Hz, 1H, Ar-H); 7,82 (br s, 1H, imidazol-H)
<sup>13</sup> C-NMR (100 Hz, CDCl <sub>3</sub> )	δ (ppm) 11,05; 23,51; 49,42; 113,32; 118,38; 121,01; 124,54; 127,96; 129,75; 135,47; 143,67; 152,19; 156,98
HPLC	t <sub>r</sub> = 8,874 min (čistost 97,7 %)
IR	2969, 1732, 1616, 1585, 1550, 1520, 1477, 1460, 1408, 1376, 1311, 1266, 1211, 1130, 1077, 1040, 975, 889, 804, 746, 639 cm <sup>-1</sup>
ESI-HRMS	Izračunana vrednost [M+H <sup>+</sup> ] (m/z): <b>229,0976</b> Izmerjena vrednost (m/z): <b>229,0977</b>

#### 4.6 Sinteza spojine **13**

##### 1. stopnja: sinteze spojine **12**

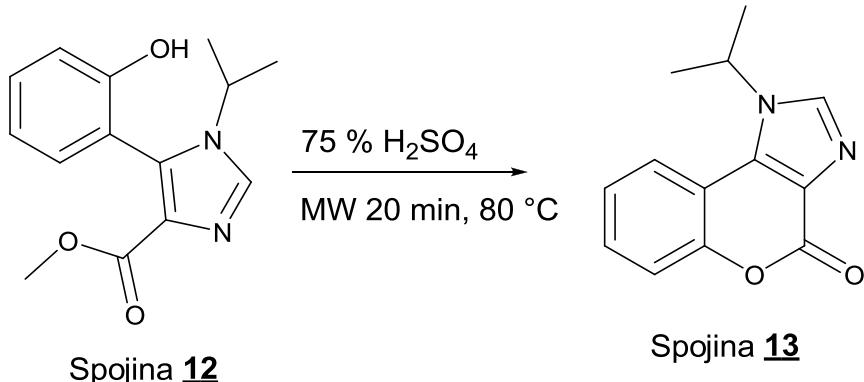


**Slika 20:** Reakcijska shema sinteze spojine **12**

V suho 250 mL bučko smo z merilnim valjem odmerili MeOH (27 mL), dodali izopropilamin (0,57 mL, 7 mmol), salicilaldehid (0,74 mL, 7 mmol), piridin (0,56 mL, 7 mmol) bakrov(I) jodid (0,133g, 0,07 mmol) in spojino **1** (0,77 mL, 7 mmol). Nato smo z magnetnim mešalom ter pod refluksom mešali 20h pri 50°C. Po končani reakciji smo reakcijski zmesi odparili topilo pod znižanim tlakom in produkt očistili s kolonsko kromatografijo. Izvedli smo gradientno kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili DKM, ki smo mu postopoma (v razmerju 50:1, 20:1 in na koncu 9:1) dodajali MeOH. Zbranim frakcijam produkta smo pod znižanim tlakom odparili topilo. Sledila je prekristalizacija iz acetona. Dobili smo bele kristale, ki smo jih nato še stehtali.

Spojina <b>12</b>	
IUPAC ime	metil 5-(2-hidroksifenil)-1-izopropil-1H-imidazol-4-karboksilat
Molekulska formula	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Molekulska masa	260,29
Izgled	beli kristali
Izkoristek reakcije	20 %
R <sub>f</sub> (mobilna faza)	0,43 (DKM:MeOH=9:1)
T <sub>tal</sub>	147-149 °C
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ (ppm) 1,39 (d, J= 6,8 Hz, 3H, CH <sub>3</sub> ); 1,48 (d, J= 6,4 Hz, 3H, CH <sub>3</sub> ); 3,83 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ); 4,20-4,32 (m, 1H, CH); 7,05 (d, J= 7,6 Hz, 1H, Ar-H); 7,14 (d, J= 7,6 Hz, 1H, Ar-H); 7,20 (d, J= 7,6 Hz, 1H, Ar-H); 7,41 (t, J= 7,6 Hz, 1H, Ar-H); 7,89 (br s, 1H, imidazol-H); 1H od Ar-OH je izmenjan.
<sup>13</sup> C-NMR (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ (ppm) 22,34; 23,52; 47,32; 50,54; 115,45; 116,32; 118,76; 128,72; 130,38; 132,30; 134,96; 136,70; 155,34; 163,06
IR	2942, 1708, 1592, 1559, 1496, 1453, 1361, 1287, 1250, 1223, 1192, 1150, 1109, 1024, 1011, 941, 813, 791, 760, 664 cm <sup>-1</sup>
ESI-HRMS	Izračunana vrednost [M+H <sup>+</sup> ] (m/z): <b>261,1233</b> Izmerjena vrednost (m/z): <b>261,1239</b>

## 2. stopnja: sinteza spojine **13**



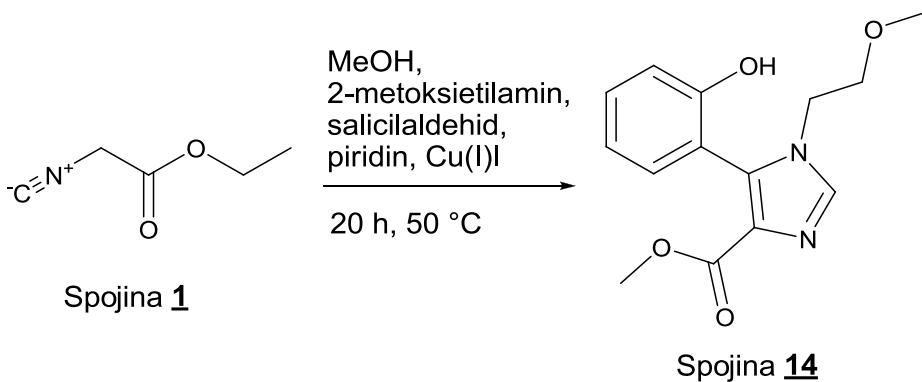
**Slika 21: Reakcijska shema sinteze spojine **13****

V suho vialo za mikrovalovni reaktor smo natehtali kristale spojine **12**, dodali 70% žveplovo (VI) kislino (3 ml) in segrevali 20 minut v mikrovalovnem reaktorju pri 80°C. Sledilo je naalkaljenje z 1M natrijevim hidroksidom do pH vrednosti med 2 in 3. Nato smo reakcijski zmesi dodali etileter in z dodatkom petroletra izoborili spojino **13** v obliki belih kristalov.

Spojina <b>13</b>	
IUPAC ime	1-izopropilkromeno[3,4- <i>d</i> ]-imidazol-4(1H)-on
Molekulska formula	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Molekulska masa	228,25
Izgled	beli kristali
Izkoristek reakcije	46 %
R <sub>f</sub> (mobilna faza)	0,57 (DKM:MeOH=9:1)
T <sub>tal</sub>	145-148 °C
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ (ppm) 1,74 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ); 1,76 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ); 5,05-5,08 (m, 1H, CH); 7,33-7,38 (m, 1H, Ar-H); 7,43-7,49 (m, 2H, Ar-H); 7,86 (d, J= 8,0 Hz, 1H, Ar-H); 7,99 (s, 1H, imidazol-H)
<sup>13</sup> C-NMR (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ (ppm) 23,20; 49,99; 113,32; 118,43; 121,02; 124,46; 127,39; 129,56; 134,63; 139,03; 152,14; 157,00
HPLC	t <sub>r</sub> = 8,369 min (čistost 99,4 %)
IR	3127, 2982, 1735, 1585, 1515, 1477, 1435, 1395, 1325, 1281, 1218, 978, 889, 861, 752, 637, 612 cm <sup>-1</sup>
ESI-HRMS	Izračunana vrednost [M+H <sup>+</sup> ] (m/z): <b>229,0981</b> Izmerjena vrednost (m/z): <b>229,0977</b>

#### 4.7 Sinteza spojine **15**

##### 1. stopnja: sinteza spojine **14**



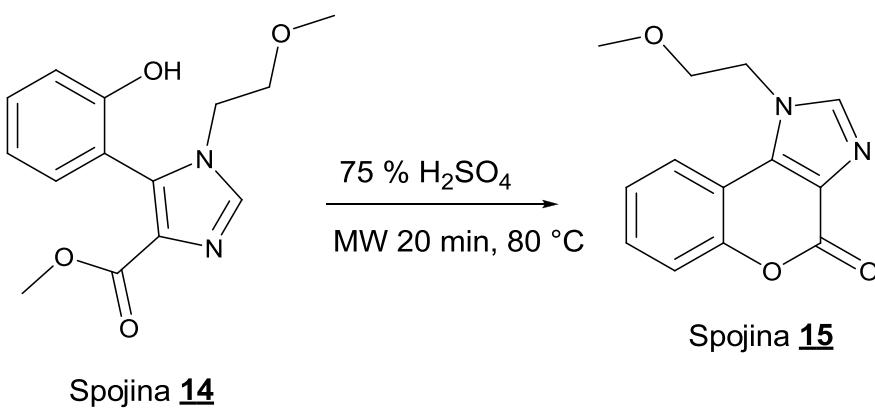
**Slika 22: Reakcijska shema sinteze spojine 14**

V suho 250 mL bučko smo z merilnim valjem odmerili MeOH (27 mL), dodali 2-metoksietilamin (0,60 mL, 7 mmol), salicilaldehid (0,74 mL, 7 mmol), piridin (0,56 mL, 7 mmol) ter bakrov(I) jodid (0,133g, 0,07 mmol) in spojino **1** (0,77 mL, 7 mmol). Nato smo z magnetnim mešalom pod refluksom mešali 20h pri 50°C. Po končani reakciji smo reakcijski zmesi odparili topilo pod znižanim tlakom in produkt očistili s kolonsko kromatografijo. Izvedli smo gradientno kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili DKM, ki smo mu postopoma (v razmerjih 50:1, 20:1 in na koncu 9:1) dodajali MeOH. Zbranim frakcijam produkta smo pod znižanim tlakom odparili topilo. Sledila je prekristalizacija iz acetona. Dobili smo bele kristale, ki smo jih nato še stehtali.

Spojina <b>14</b>	
IUPAC ime	metil 5-(2-hidroksifenil)-1-metoksietil-1H-imidazol-4-karboksilat
Molekulska formula	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
Molekulska masa	276,29
Izgled	beli kristali
Izkoristek reakcije	36 %
R <sub>f</sub> (mobilna faza)	0,56 (DKM:MeOH=9:1)
T <sub>tal</sub>	155-158 °C
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, aceton-d <sub>6</sub> )	δ (ppm) 3,21 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ); 3,42-3,59 (m, 2H, CH <sub>2</sub> O); 3,59 (s, 3H, COOCH <sub>3</sub> ); 3,97-4,02 (m, 2H, NCH <sub>2</sub> ); 6,94 (dt, J <sub>1</sub> =1,2 Hz, J <sub>2</sub> =7,6 Hz, 1H, Ar-H); 7,00 (dd, J <sub>1</sub> =1,2 Hz, J <sub>2</sub> =8,2 Hz, 1H, Ar-H); 7,22 (dd, J <sub>1</sub> =1,6 Hz, J <sub>2</sub> =8,0 Hz, 1H, Ar-H); 7,31 (ddd, J <sub>1</sub> =1,6 Hz, J <sub>2</sub> =8,0 Hz, J <sub>3</sub> =8,2 Hz, 1H, Ar-H); 7,71 (s, 1H, imidazol-H); 8,59 (s, 1H, OH)
<sup>13</sup> C-NMR (100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	44,55; 50,62; 57,85; 70,00; 115,51; 115,96; 118,76; 129,07; 130,48; 132,51; 135,41; 138,24; 155,11; 162,89
IR	3114, 2950, 1712, 1591, 1560, 1504, 1435, 1385, 1349, 1586, 1228, 1189, 1153, 1118, 1073, 1005, 968, 871, 817, 792, 763,

	707, 660 cm <sup>-1</sup>
ESI-HRMS	Izračunana vrednost [M+H <sup>+</sup> ] (m/z): <b>277,1192</b>
	Izmerjena vrednost (m/z): <b>277,1188</b>

## 2. stopnja: sinteza spojine **15**

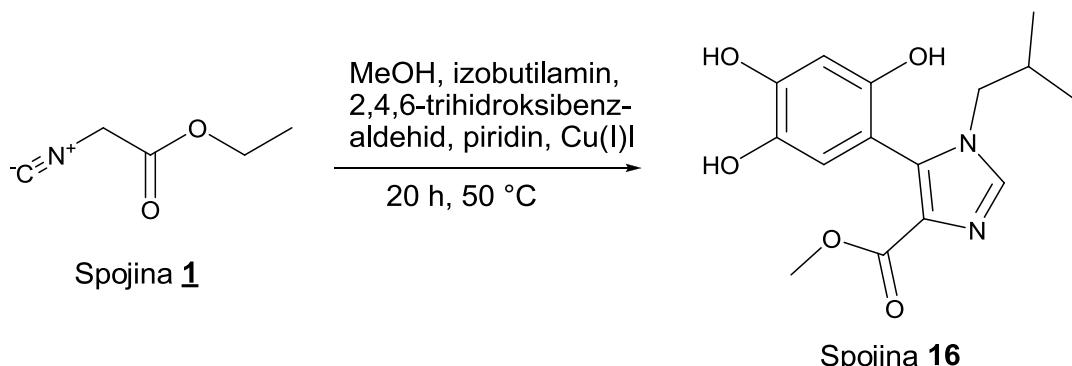


**Slika 23: Reakcijska shema sinteze spojine **15****

V suho vialo za mikrovalovni reaktor smo natehtali kristale spojine **14**, dodali 70% žveplovo (VI) kislino (5 ml) in segrevali 20 minut v mikrovalovnem reaktorju pri 80°C. Sledilo je naalkaljenje z 1M NaOH do pH vrednosti med 2 in 3. Nato smo reakcijski zmesi dodali etileter in z dodatkom petroletra izoborili spojino **11** v obliki belih kristalov.

Spojina <b>15</b>	
IUPAC ime	1-(metoksietyl)kromeno[3,4-d]imidazol-4(1H)-on
Molekulska formula	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Molekulska masa	244,25
Izgled	beli kristali
Izkoristek reakcije	54 %
R <sub>f</sub> (mobilna faza)	0,54 (DKM:MeOH=9:1)
T <sub>tal</sub>	146-150 °C
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ (ppm) 3,37 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ); 3,88 (t, J= 5,2 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> O); 4,64 (t, J= 5,2 Hz, 2H, NCH <sub>2</sub> ); 7,34-7,38 (m, 1H, Ar-H); 7,49-7,54 (m, 2H, 2 x Ar-H); 7,84 (d, J= 8,0 Hz, 1H, Ar-H); 7,88 (s, 1H, imidazol-H)
<sup>13</sup> C-NMR (100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ (ppm) 46,58; 49,17; 58,27; 59,57; 70,06; 113,04; 117,35; 122,21; 124,37; 126,20; 129,57; 135,10; 144,96; 151,41; 156,12
HPLC	t <sub>r</sub> = 7,153 min (čistost 53,7 %)
IR	2886, 1724, 1523, 1454, 1408, 1357, 1312, 1211, 1107, 1088, 1070, 1039, 1011, 979, 891, 840, 752, 651 cm <sup>-1</sup>
ESI-HRMS	Izračunana vrednost [M+H <sup>+</sup> ] (m/z): <b>245,0922</b> Izmerjena vrednost (m/z): <b>245,0926</b>

#### 4.8 Sinteza spojine 16

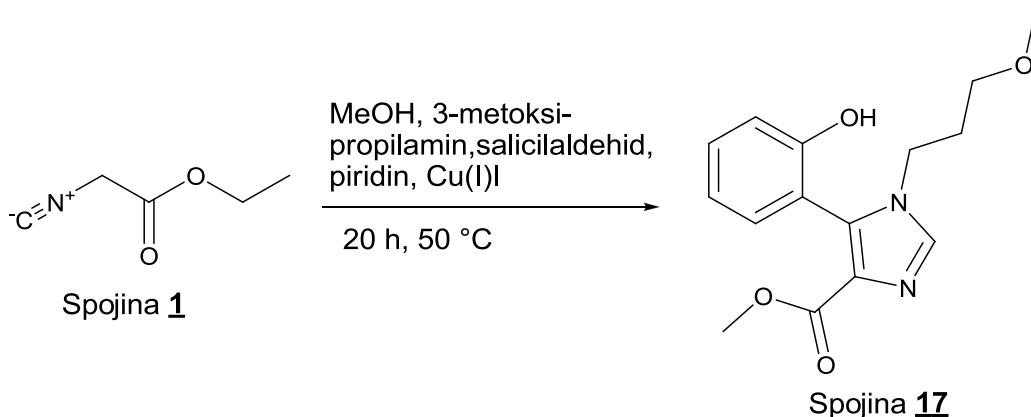


Slika 24: Reakcijska shema sinteze spojine 16

V suho 250 mL bučko smo z merilnim valjem odmerili MeOH (27 mL), dodali izobutilamin (0,70 mL, 7 mmol), 2,4,5-trihidroksibenzaldehid (1,08g, 7 mmol), piridin (0,56 mL, 7 mmol) ter bakrov(I) jodid (0,133g, 0,07 mmol) in etil 2-izocianoacetat (0,77 mL, 7 mmol). Nato smo z magnetnim mešalom pod refluksom mešali 20h pri 50°C. Naredili smo suh nanos na kolono, ker je bila reakcijska zmes zelo oljnata. Že pri TPK je bila ločba zelo slaba in tudi pri čiščenju s kolonsko kromatografijo smo izolirali nečisto spojino, ki smo jo nato zavrgli. Verjetno so dodatne hidrosilne skupine na aldehidu motile potek reakcije.

#### 4.9 Sinteza spojine 18

##### 1. stopnja: sinteze spojine 17

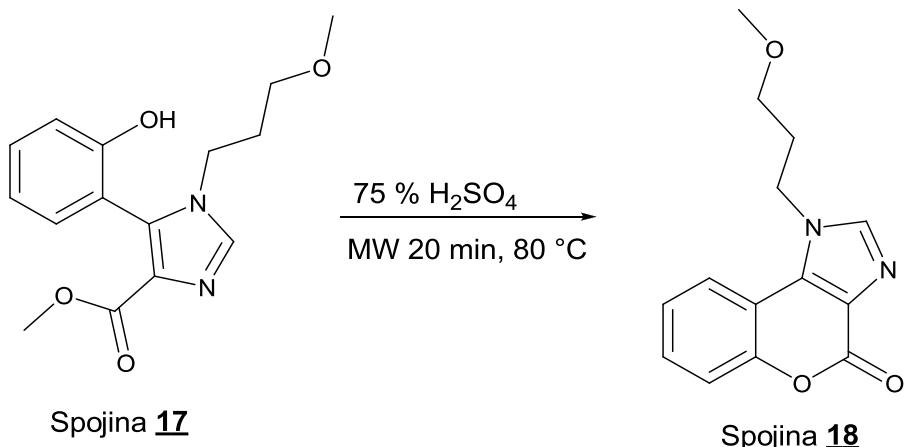


**Slika 25: Reakcijska shema sinteze spojine 17**

V suho 250 mL bučko smo z merilnim valjem odmerili MeOH (27 mL), dodali 3-metoksipropilamin (0,72 mL, 7 mmol), salicilaldehid (0,74 mL, 7 mmol), piridin (0,56 mL, 7 mmol) ter bakrov(I) jodid (0,133g, 0,07 mmol) in etil 2-izocianoacetat (Spojina 1) (0,77 mL, 7 mmol). Nato smo z magnetnim mešalom pod refluksom mešali 20h pri 50°C. Po končani reakciji smo reakcijski zmesi odparili topilo pod znižanim tlakom in produkt očistili s kolonsko kromatografijo. Izvedli smo gradientno kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili DKM : MeOH v razmerjih 25:1, 20:1, 15:1 in 9:1. Zbranim frakcijam kolonske kromatografije, ki so vsebovale spojino spojino 17, smo dodali DKM, dietileter in petroleter ter pustili stati čez noč. Dobljene kristale, ki so se usedli na dno bučke, smo odfiltrirali z odsesavanjem.

Spojina 17	
IUPAC ime	metil 5-(2-hidroksifenil)-1-metoksipropil-1H-imidazol-4-karboksilat
Molekulska formula	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
Molekulska masa	290,31
Izgled	beli kristali
Izkoristek reakcije	39 %
R <sub>f</sub> (mobilna faza)	0,56 (DKM:MeOH = 9:1)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, aceton-d <sub>6</sub> )	δ (ppm) 1,77-1,86 (m, 2H, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 3,17 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ); 3,21 (t, J= 5,6 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> O); 3,63 (s, 3H, COOCH <sub>3</sub> ); 3,98-4,02 (m, 2H, CH <sub>2</sub> N); 6,96 (t, J= 8,0 Hz, 1H, Ar-H); 7,03 (d, J= 8,0 Hz, 1H, Ar-H); 7,22 (d, J= 8,0 Hz, 1H, Ar-H); 7,31 (t, J= 8,0 Hz, 1H, Ar-H); 7,74 (br s, 1H, imidazol-H); 8,58 (s, 1H, OH)
<sup>13</sup> C-NMR (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ (ppm) 29,56; 43,27; 51,95; 58,58; 68,47; 115,51; 118,30; 120,38; 128,07; 129,85; 131,45; 134,07; 137,85; 155,21; 162,16
IR	3115, 2895, 1691, 1615, 1573, 1508, 1478, 1367, 1290, 1217, 1116, 1053, 1035, 1013, 944, 885, 818, 791, 755, 706 cm <sup>-1</sup>
ESI-HRMS	Izračunana vrednost [M+H <sup>+</sup> ] (m/z): <b>291,1339</b> Izmerjena vrednost (m/z): <b>291,1345</b>

## 2. stopnja: sinteza spojine **18**



**Slika 26: Reakcijska shema sinteze spojine **18****

V 2. stopnji smo spojini **17** dodali 70% žveplovo (VI) kislino (3 ml) ter segrevali 20 minut v mikrovalovnem reaktorju pri 80°C. Sledilo je naalkaljenje z 1M NaOH do pH vrednosti med 2 in 3 ter nato ekstrakcija z 3 x 20 mL etilacetata. Združenim organskim fazam smo dodali nasičeno raztopino NaCl ter sušili z brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po filtraciji smo matičnici uparili topilo ter produkt očistili s kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili DKM, nato pa DKM in MeOH v razmerjih 50:1, 25:1, 20:1 in 15:1. Na koncu smo izvedli še prekristalizacijo iz petroletra. Dobili smo bele kristale.

<b>Spojina <b>18</b></b>	
IUPAC ime	1-metoksipropilkromeno[3,4-d]imidazol-4(1H)-on
Molekulska formula	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Molekulska masa	258,27
Izgled	beli kristali
Izkoristek reakcije	3 %
R <sub>f</sub> (mobilna faza)	0,17 (DKM:MeOH = 50:1)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ (ppm) 2,17-2,23 (m, 2H, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 3,36 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ); 3,46 (t, J= 5,6 Hz; 2H, CH <sub>2</sub> O); 4,67 (t, J= 7,2 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> -N); 7,43-7,49 (m, 2H, Ar-H); 7,59 (ddd, J <sub>1</sub> = 1,6 Hz, J <sub>2</sub> = 7,2 Hz, J <sub>3</sub> = 8,6 Hz, 1H, Ar-H); 8,09 (dd, J <sub>1</sub> = 1,2 Hz, J <sub>2</sub> = 8,0 Hz, 1H, Ar-H); 8,12 (br s, 1H, imidazol-H)
<sup>13</sup> C-NMR (100 MHZ, MeOD)	δ (ppm) 31,23; 45,74; 59,08; 69,73; 114,21; 118,91; 123,17; 126,04; 127,57; 131,23; 136,78; 145,72; 153,40; 158,53
HPLC	t <sub>r</sub> = 8,003 min (čistost 96,9 %)
ESI-HRMS	Izračunana vrednost [M+H <sup>+</sup> ] (m/z): <b>259,1082</b> Izmerjena vrednost (m/z): <b>259,1083</b>

## 5. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1 Razlaga sinteznih postopkov

Sintezni postopek, ki vodi do derivatov kromeno[3,4]imidazol-4(1H)-ona, sestoji iz dveh stopenj. (5) Produkti prve stopnje so derivati metil 5-(2-hidroksifenil)-1H-imidazol-4-karboksilata, ki nastanejo z multikomponentno reakcijo (33), medtem ko gre v drugi stopnji za ciklizacijo do končnih spojih s pomočjo kislinsko katalizirane transesterifikacije.

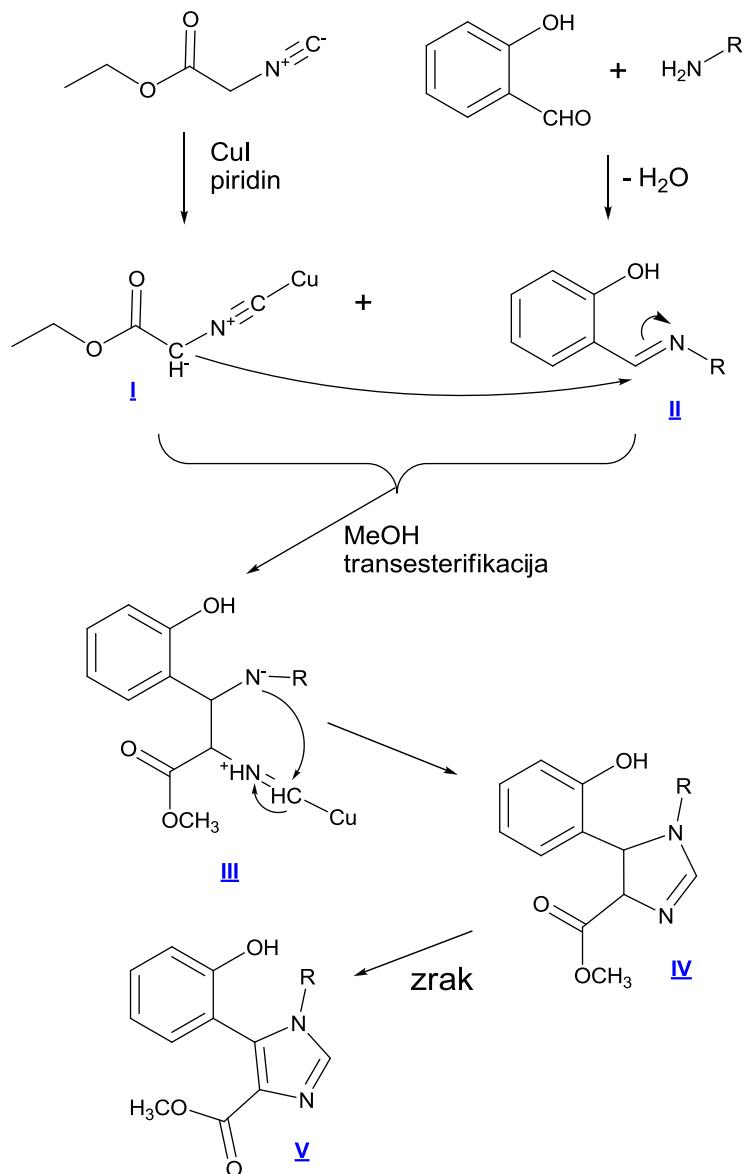
#### 5.1.1 Reakcija 1. stopnje

Reakcija prve stopnje je bila v preteklosti že dobro optimizirana. Ugotovljeno je bilo, da je **MeOH** najprimernejše topilo, saj dobro raztaplja vhodne snovi, produkt pa se med potekom reakcije izobarja in se lahko tako enostavno izolira s filtracijo. Ker zaradi stranskih produktov reakcije oz. nezreagiranih reagentov nismo dobili čistega produkta, smo po končani reakciji izvedli kolonsko kromatografijo. Za potek reakcije je nujno potreben baker kot katalizator. Testirane so bile različne bakrove soli, med katerimi se je najbolje izkazal **Cu(I)I**, katerega smo uporabili tudi mi. Pomembno je, da reakcija poteka v bazičnem mediju, zato smo reakcijski zmesi dodali **piridin**, ki podobno vpliva na proces kot DMAP, vendar bolje kot DBU (1,8-diazobicikloundek-7en) in DIPEA (*N,N*-diizopropiletilamin). (33)

Reakcija prve stopnje je **multikomponentna reakcija**. To je konvergentna reakcija, kjer reagirajo najmanj tri vhodne snovi in tvorijo produkt. Bistvo teh reakcij je, da dobimo čim manj stranskih produktov, saj so vsi atomi vhodnih snovi vključeni v molekulo produkta. Proses je močno odvisen od reakcijskih pogojev kot so topila, temperatura, katalizator, koncentracija, vrsta vhodnih snovi in funkcionalne skupine. Prednost je enostavnost reakcije, saj le-ta poteka v eni posodi/bučki (t.i. »one-pot reaction«), kar omogoča tudi avtomatizacijo kombinatorne sinteze. Kot produkt prve stopnje smo dobili nov obročni sistem, imidazol. Obročni sistemi imajo velik pomen v farmacevtski industriji. (34)

Kot izhodne reagente smo uporabili etil 2-izocianoacetat, salicilaldehid (oz. 5-fluorosalicilaldehid) in različne primarne amine. Potek reakcije ni točno znan, vendar se predvideva, da piridin kot baza deprotonira etil 2-izocianoacetat in nato le-ta tvori kompleks z bakrom (**I**). Medtem (5-fluoro)salicilaldehid reagira s primarnim aminom in preko kondenzacije nastane imin (**II**). Nukleofilen ogljik kompleksa A napade elektrofilen ogljik imina. V metanolu pride do transesterifikacije in nastanka intermediata **III**. Dušik iz

amina napade elektrofilno mesto imina in tako pride do ciklizacije in nastanka imidazolinskega obroča (**IV**). Le-ta na zraku hitro oksidira do imidazola (**V**), produkta reakcije prve stopnje. (33)



Slika 27: Reakcijska shema sinteze 1. stopnje, povzeto po (33)

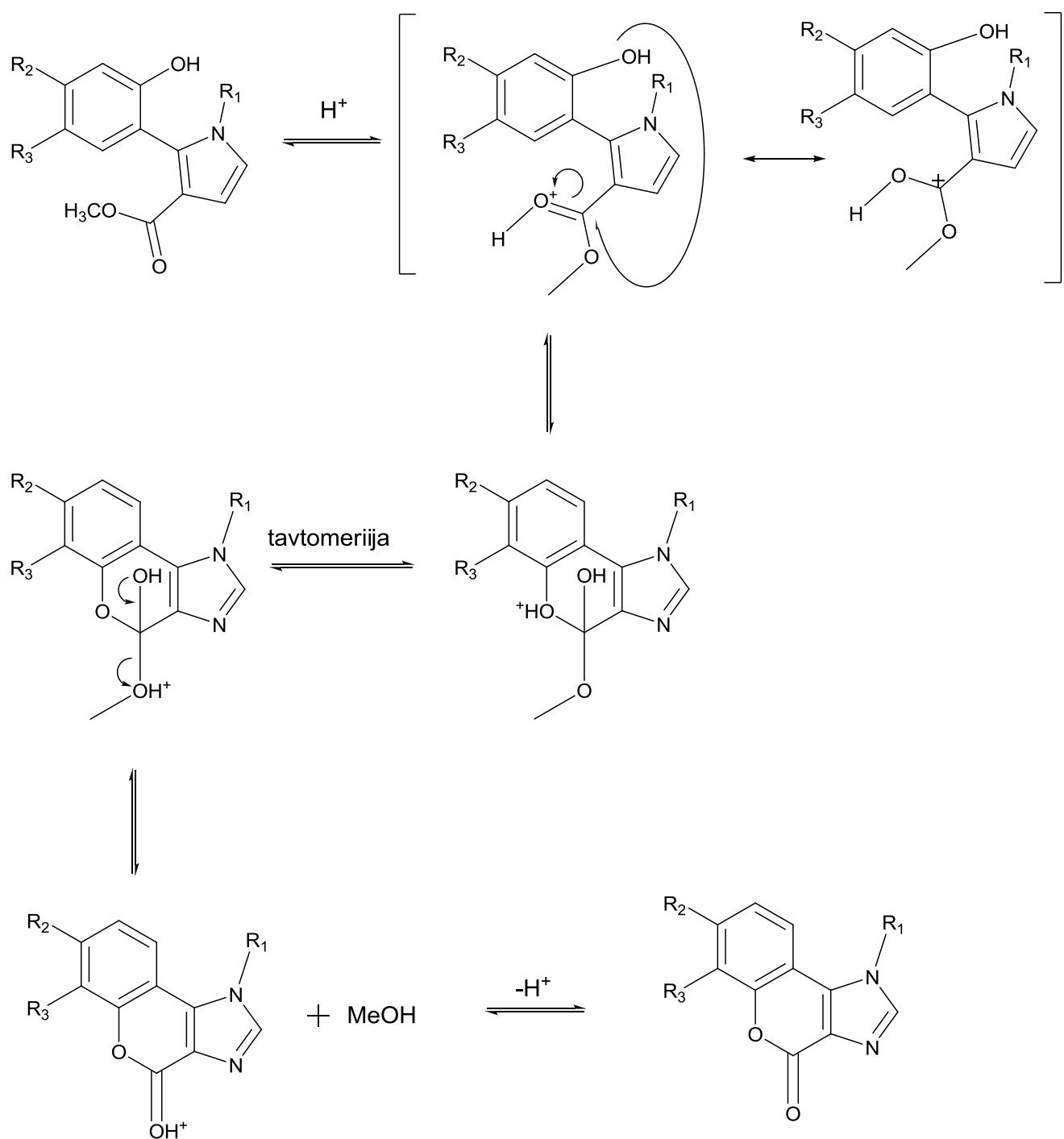
Izkoristki reakcij so se zelo razlikovali glede na različne substituente. Največji izkoristki so se gibali med 35 in 40% in sicer pri sintezi spojin **6** (alil na mestu 1), **14** (metoksietyl na mestu 1) in **17** (metoksipropil na mestu 1). Če primerjamo dolžine nerazvezanih alifatskih verig na mestu 1, izkoristek narašča z večanjem števila ogljikovih atomov (izkoristek spojine **8** < spojine **10** < spojine **2**), vendar ker se vrednosti ne razlikujejo veliko, spojina **8**

vsebuje fluor (elektronakceptorski substituent) na mestu 5 in ker moramo upoštevati še napake meritev, se na to ugotovitev ne moremo zanašati. Zanimivo je, da dušik v alkilni verigi na mestu 1 (spojina **4**), močno vpliva na potek in izkoristek reakcije. Le-ta je manj kot 0,5 %. Težave smo imeli tudi pri sintezi spojine **16**. Reakcijska zmes je bila zelo oljnata. Naredili smo suh nanos na kolono z namenom, da bi produkt očistili, vendar je bila ločba zelo slaba. TPK analiza nam je potrdila, da smo uspešno ločili le izhodni nezreagiran aldehid. Predvidevamo, da dodatni hidroksilni skupini na aldehidu motita potek reakcije oz. možna je tudi sterična oviranost izobutilne skupine. Sponja **8**, s fluorom na mestu 5, ima glede na ostale spojine, ki imajo na mestu 1 tudi alifatske substituente, nižji izkoristek. Možni vzrok je verjetno ta, da elektronprivlačni atom fluor na salicilaldehidu zmanjša elektrofilnost karbonilnega ogljika.

### **5.1.2 Reakcija 2. stopnje**

Druga stopnja je **kislinsko katalizirana ciklizacija** oz. **transesterifikacija**, to je reakcija, pri kateri se izmenjata alkoxi dela estrov, pri čemer mora biti alkoxi skupina na osnovnem estru dobra izstopajoča skupina, da je ravnotežje reakcije pomaknjeno v desno. V našem primeru je bila to metilna skupina oz. metanol, alkohol z nižjo temperaturo vrelišča kot glavni produkt. Reakcija je podobna Fischerjevi sintezi estrov, razlika je le v začetnem reagentu (kislina oz. ester) in končni izstopajoči molekuli (voda oz. alkohol). (35-37)

Kislina, v našem primeru  $H_2SO_4$ , poveča elektrofilnost karbonilnega ogljika na estru, katerega nato nukleofilni alkohol lažje napade. Nastane tetraedrični intermedijat, ki tavtomerizira v obliko, iz katere izstopi  $MeOH$ . (35-37)



**Slika 28: Reakcijska shema sinteze 2. stopnje, povzeto po (35)**

Z vzporedno potekajočo magistrsko nalogo Mane Gartner (32) smo optimizirali potek reakcije druge stopnje. Namesto suspendiranja produkta prve stopnje v 20 mL 75 % vodne raztopine  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in segrevanja 3 ure pri  $80^\circ\text{C}$ , kot je navedeno v literaturi (5), smo produkt prve stopnje suspendirali v nekaj mL 70 % vodne raztopine  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (100 mg

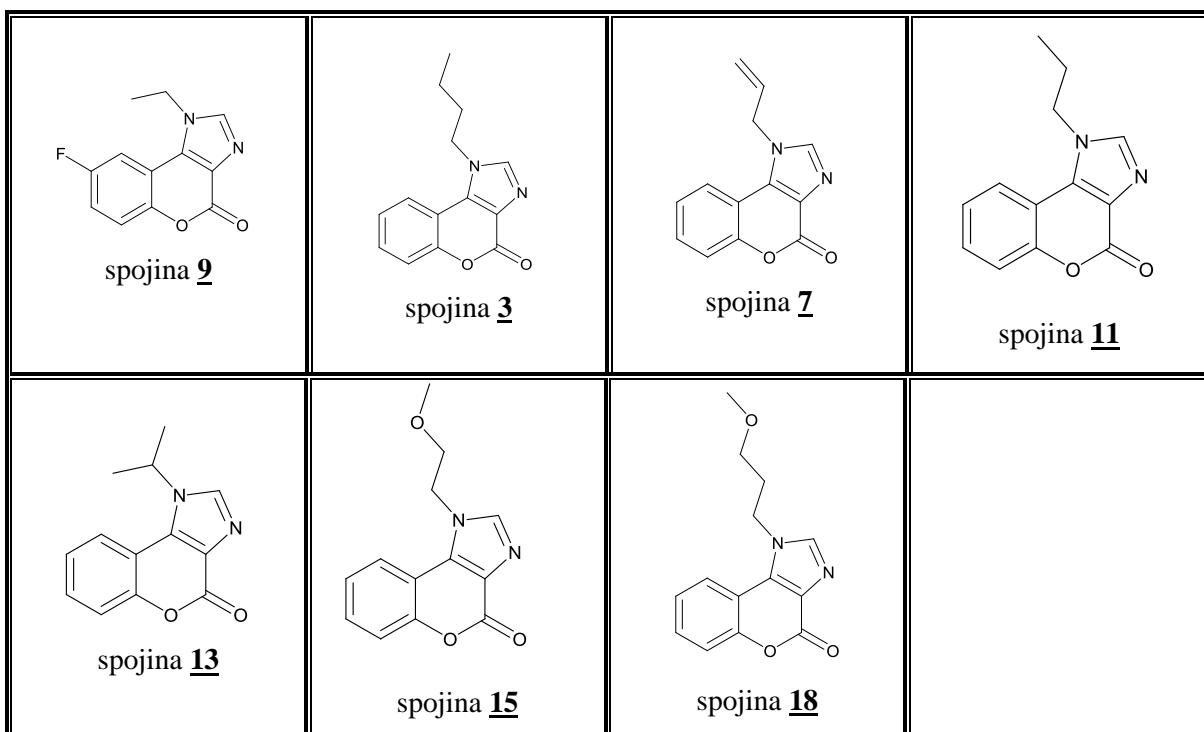
spojine/1 mL) in segrevali v mikrovalovnem reaktorju 20 minut pri 80 °C. Optimizacija se je izkazala za uspešno, saj smo z njo uspeli zmanjšati porabo topil, povečati izkoristek in skrajšati čas poteka reakcije.

Glede izkoristkov reakcije in različnih substituentov ne moremo vzpostaviti znatne povezave. Omenimo lahko, da je bil izkoristek sinteze spojine **9**, s fluorom na mestu 8 precej manjši od ostalih reakcij. Možno je, da fluor, tako kot v prvi stopnji reakcije, zmanjša elektrofilnost karbonilnega ogljika. Najboljši so bili izkoristki sintez spojin **11**, **13** in **15**, vendar sklepamo, da bi se njihovim vrednostim moral pridružit še izkoristek sinteze spojine **18**, saj je bil v prvi stopnji najvišji. Ker je bil izkoristek prve stopnje sinteze spojine **5** zelo majhen, smo v drugi stopnji uporabili zelo malo začetnega reagenta in dobili produkt druge stopnje le v sledovih, zato nismo mogli izračunati izkoristka reakcije.

## 5.2 Rezultati biološkega testiranja in SAR

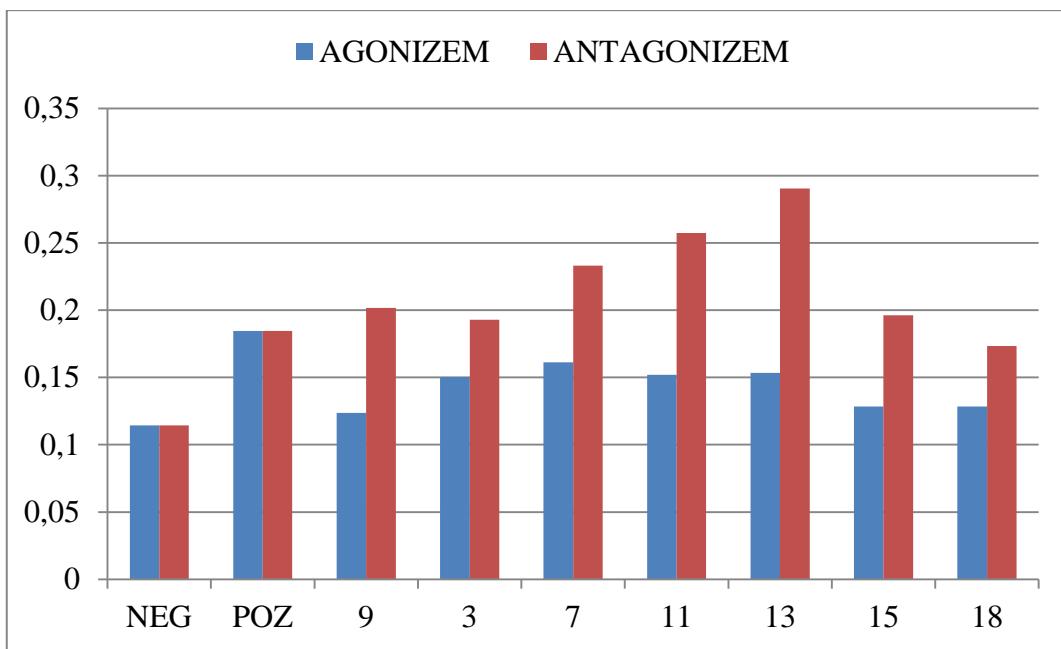
### 5.2.1 Biološko testiranje

V okviru paralelne magistrske naloge Mane Gartner (32) je bilo na Zavodu za transfuzijsko medicino Republike Slovenije pod mentorstvom doc. dr. Urbana Švajgerja izvedeno biološko testiranje sedmih derivatov kromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1H)-onov na celicah HEK-Blue<sup>TM</sup> hTLR7.



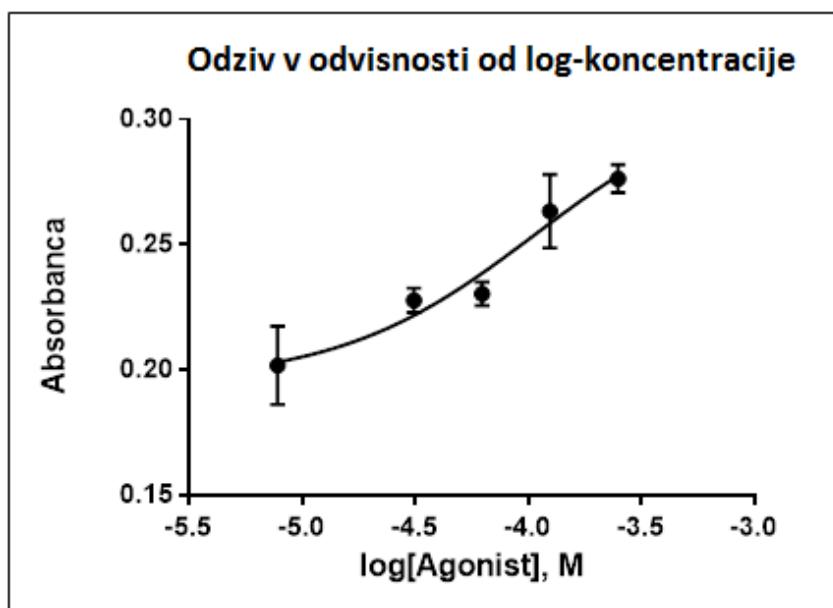
**Slika 29: Razpredelnica spojin, ki so bile biološko testirane**

Najprej so preverili topnost in citotoksičnost. Vse spojine so bile v celičnem mediju z 1% dodatkom DMSO topne, vendar tudi malo citotoksične. Kljub temu sta bili nadaljnje določeni agonistična ter antagonistična aktivnost pri koncentracijah 100 µM in 250 µM. Spodnja tabela prikazuje rezultate testiranja pri koncentraciji 250 µM. Vse spojine imajo šibko agonistično aktivnost in nobena ne izkazuje antagonistične aktivnosti. Pozitivna kontrola je bil imikvimod v obliki soli s HCl ( $c = 7,23 \mu\text{M} = 2\mu\text{g/mL}$ ) ter dodanim DMSO, negativna pa celice v mediju z dodanim DMSO.



**Slika 30: Rezultati testiranja agonistične in antagonistične aktivnosti spojin pri koncentraciji 250  $\mu\text{M}$**

Med testiranimi spojinami je imela najmočnejše agonistično delovanje spojina **3**, zato ji je bila z dodatnimi eksperimenti določena vrednost  $\text{EC}_{50} = 107 \mu\text{M}$  ( $R^2 = 0,88$ ). Točke na grafu odvisnosti absorbance od logaritma koncentracije bi morale biti v obliki eksponentne krivulje, vendar so zaradi netočnosti podatkov razpršene.



**Slika 31: Graf odvisnosti absorbance od logaritma koncentracije spojine **3****

### **5.2.2 Povezava med strukturo in delovanjem**

Iz rezultatov biološkega testiranja spojin ne moremo veliko sklepati na odnos med strukturo in delovanjem (SAR). Kot je bilo omenjeno že v uvodu, se strukturne lastnosti agonistov in antagonistov TLR7 zelo malo razlikujejo. Dober primer iz literature je gardikvimod. V našem primeru pa spojina **A** izkazuje antagonistično delovanje, medtem ko njeni analogi niso aktivni in delujejo celo šibko agonistično.

Spojina **A** in spojina **3** se razlikujeta samo v razvejanosti alifatske verige s štirimi ogljikovimi atomi na mestu 1, spojina **A** ima 2-metilpropilno, spojina **3** pa butilno, vendar sta izkazali povsem drugačno delovanje. Tudi v primerjavi spojine **A** in spojine **13**, ki se razlikujeta samo v dolžini stranske verige za en ogljikov atom, sta aktivnosti nasprotni.

Najbolje še agonsitično delovanje sta izkazali spojina **3** z nerazvezano alifatsko verigo s štirimi ogljikovimi atomi ter spojina **13** z izopropilno skupino. Spojini **15** in **18**, ki imata v stranski verigi kisikov atom, nista izkazali posebne aktivnosti. Tudi spojina **7**, z nenasičeno vezjo v stranski verigi, ni bila aktivna. Ker je reakcija sinteze spojine **5** slabo potekla, le-ta ni bila biološko ovrednotena, tako da ne vemo, kako delujejo derivati, ki imajo v stranski verigi dušikov atom. Pomembno je poudariti, da so vse testirane spojine šibko citotoksične, zato kljub temu da so šibki agonsti, le-ti niso primerni za klinično uporabo.

V prihodnje bi se lahko preizkusili derivati z že omenjenim bazičnim centrom v verigi na mestu 1 ter analoga spojine **A** in **3**, vsak z enim ogljikovim atomom več v stranski verigi.

Druga možnost optimiziranja analogov je na kromenskem obroču na mestu 7 in 8. Spojina **9** s fluorom na mestu 8 je močno zavirala rast celic. Naš namen je bil tudi sintetizirati analog s hidroksilnima skupinama hkrati na mestu 7 in 8, vendar že reakcija prve stopnje (spoјina **16**) ni potekla. Zaradi zmožnosti tvorbe vodikovih vezi, bi verjetno lahko vplivali na jakost delovanja. Dobro bi bilo tudi sintetizirati in biološko ovrednotiti derive z bazičnimi substituenti na mestih 7 ali 8, saj se TLR7 nahaja v kislem okolju endosoma in lisosoma. Tako da ostaja široka možnost nadaljnje sinteze in biološkega testiranja novih spojin.

## 6. SKLEP

V okviru magistrske naloge smo sintetizirali analoge kromeno[3,4-*d*]imidazol-4ona, s potencialnim agonističnim delovanjem na TLR7. Sintetiziranim spojinam so na Zavodu za transfuzijsko medicino v Ljubljani določili citotoksično, agonistično ter antagonistično delovanje. Na podlagi dobljenih rezultatov smo pridobili nekaj novih informacij o odnosu med strukturo in delovanjem naših spojin.

- 1) Z dvostopenjskim sinteznim postopkom smo sintetizirali sedem končnih spojin (**3, 7, 9, 11, 13, 15, 18**) z modifikacijami na mestih 1 in 8. Reakciji sinteze spojine **5** in **16** nista poteekli.
- 2) Uspelo nam je optimizirati reakcijo 2. stopnje. Z uporabo mikrovalovnega reaktorja smo zmanjšali porabo topil, skrajšali čas reakcije ter povečali izkoristek reakcije.
- 3) Pri spojinah **3, 7, 9, 11, 13, 15** in **18** je bila testirana topnost v celičnem mediju, citotoksičnost, agonistična in antagonistična aktivnost, spojini **3** pa je bila določena tudi EC<sub>50</sub> vrednost. Spojine so bile topne v celičnem mediju z 1% dodatkom DMSO ter šibko citotoksične. Na celičnih linijah z izraženim TLR7 niso kazale antagonistične aktivnosti, ampak so imele šibko agonistično delovanje. Najbolj aktivna je bila spojina **3** z butilno verigo na mestu 1. Ključnih informacij o SAR za TLR7 nismo pridobili, saj med agonistično in antagonistično aktivnostjo spojin odločajo že zelo majhne strukturne razlike (ponekod že celo regioizomerija). Rezultati kažejo, da kisik ali dvojna vez v stranski verigi na mestu 1 ne povečata aktivnosti. Nadalje bi bilo potrebno ponovno sintetizirati spojino **5**, ki ima dušik v stranski verigi in jo biološko ovrednotiti. Ugotovili smo, da fluor na mestu 8 v spojini **9** bolj zavira rast celic kot ostale testirane spojine. Verjetno bi bile na tem mestu bolj primerne funkcionalne skupine, ki so donorji vodikovih vezi, na primer hidroksilna skupina ali pa kakšna bazična skupina. Slednja bi lahko povzročila boljšo vezavo spojine, saj se receptor TLR7 nahaja v kislem okolju endosoma in lizosoma.

Uspešno smo sintetizirali in biološko ovrednotili 7 spojin. V nadaljnjih študijah bi bilo potrebno sintetizirati in biološko ovrednotiti analoge nizkomolekularnih agonistov TLR7 z drugimi substituenti, ki ne bi bili citotoksični in imeli močnejše agonistično delovanje.

## 7. VIRI IN LITERATURA

1. Vozelj M.: *Temelji imunologije*, 1. Izdaja, DZS d.d., Ljubljana, 2000: 2-9, 12-14
2. Kumar H., Kiyoshi T., Akira S.: Toll-Like Receptors, Encyclopedia of Biological Chemistry 2004; 4: 190-5
3. 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: 552-9
4. Yamamoto M., Takeda K.: Current Views of Toll-Like Receptor Signaling Pathways. Hindawi Publishing Corporation, Gastroenterology Research and Practice, vol. 2010; Article ID 240365, 8 strani.
5. Švajger U., Horvat Ž., Knez D., Rožman P., Turk S., Gobec S.: New antagonists of Toll-like receptor 7 discovered through 3D ligand-based virtual screening, Medicinal Chemistry Research 2015; 24: 362-71
6. Moresco E. M. Y., LaVine D., Beutler B.: Toll-like receptors, Current Biology 2011; 21, R488-93
7. Akira S., Takeda K.: Toll-like receptor signalling, Nature Reviews Immunology 2004; 4: 499-511
8. Pattern Recognition Receptors. R&D Systems, Tools for Cell Biology Research. Na voljo 1.3. 2014 ob 12:30 na internetni strani <http://www.rndsystems.com/Resources/Images/26231.pdf>
9. Degn S.E., Thiel S.: Humoral pattern recognition and the complement system. Scandinavian Journal of Immunology 2013; 78 (2): 181-193
10. Koegh B., Parker A. E.: Toll-like receptors as targets for immune disorders, Trends in Pharmacological Sciences 2011; 32: 435-42
11. Dimov V., Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and receptors (PRRs). Na voljo 7. 3. 2015 ob 10:15 na internetni strani [http://allergycases.blogspot.com/2010/09/pathogen-associated-molecular-patterns\\_04.html](http://allergycases.blogspot.com/2010/09/pathogen-associated-molecular-patterns_04.html)
12. Iliev D. B.: Pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-modulated gene expression in mononuclear phagocytes of rainbow trout, A Dissertation, Indiana, 2006: 7-11
13. Barberis A.: Recent Therapeutic Advances Targeting Toll-Like Receptors, Speciality Pharma 2011; 11: 65-8

14. Wang X., Smith C., Yin H.: Targeting toll-like receptors with small molecule agents, *Chem. Soc. Rev.* 2013; 42: 4859-66
15. Jurk M., Heil F., Vollmer J., Schettler C., Krieg A. M., Wagner H., Lipford G., Bauer S.: Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848, *Nature Immunology* 2002, 3: 499
16. Barrat F. J., Meeker T., Gregorio J., Chan J. H., Uematsu S., Akira S., Chang B., Duramad O., Coffman R. L.: Nucleic acid of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus, *The Journal of Experimental Medicine* 2005; 202: 1131-9
17. Blasius A., Beutler B.: Intracellular Toll-like receptors, *Immunity* 2010; 32: 305-15
18. Hemmi H., Kaisho T., Takeuchi O., Sato S., Sanjo H., Hoshino K., Horiuchi T., Tomizawa H., Takega K., Akira S.: Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway, *Nature Immunology* 2002; 3: 196-200
19. O`Neil L. A. J., Bryant C. E., Doyle S. L.: Therapeutic Targeting of Toll-Like Receptors for Infectious and Inflammatory Diseases and Cancer, *Pharmacological Reviews* 2009; 61: 177-97
20. Sistemski lupus eritematozus. Na voljo 22. 3. 2015 ob 10:40 na internetni strani <http://www.revma.net/priro-nik-za-revmatike/revmati-ne-bolezni/sistemski-lupus-eritematozus/#>
21. Xianbin W., Mingyu W., Dong X., Huiying L., Yan X., Fengchun Z., Xiaofeng Z.: Peripheral Neuropathies due to systemic lupus erythematosus in China, *Medicine* 2015; 94: 625
22. O`Neil L. A. J., Brint E.: Toll-like Receptors in Inflammation, Basel, 2006: Chapter 2: Sacre S. M., Drexler S. K., Foxwell B. M.: Toll-like receptors and rheumatoid arthritis: is there a connection?, 19-40
23. Chavele K. M., Ehrenstein M. R.: Regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis, *FEBS Letters*, 2011; 585: 3603-10
24. Chen J.-Q., Szodoray P., Zeher M.: Clinical Reviews in Allergy & Immunology: Toll-Like Receptor Pathways in Autoimmune Diseases, 2015
25. Karlsen M., Hansen T., Nordal H. H., Brun J. G., Jonsson R., Appel S.: Expression of Toll-Like Receptors -7 and -9 in B Cell Subsets from Patients with Primary Sjogren Syndrome, *PLOS ONE* 2015; 10 : 1-13

26. Vogelsang P., Karlsen M., Brun J. G., Jonsson R., Appel S.: Altered phenotype and Stat1 expression in Toll-like receptor 7/8 stimulated monocyte-derived dendritic cells from patients with primary Sjögren's syndrome, *Arthritis research & therapy* 2014; 16: R166
27. Shukla N. M., Kimbrell M. R., Malladi S. S., David S. A.: Regioisomerism-dependent TLR7 agonism and antagonism in an imidazoquimoline, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2009; 19: 2211-4
28. Shukla N. M., Malladi S. S., Day V., David S. A.: Preliminary evaluation of 3H imidazoquimoline library as dual TLR7/TLR8 antagonists, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2011; 19: 3801-11
29. Heil F., Ahmad-Nejad P., Hemmi H., Hochrein H., Ampenberger F., Gellert T., Dietrich H., Lipford G., Takeda K., Akira S., Wagner H., Bauer S.: The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily, *European Journal of Immunology* 2003; 33: 2987-97
30. Dzopalic T., Dragicevic A., Vasilijic S., Vučević D., Majstorović I., Božić B., Balint B., Colic M.: Loxoribine, a selective Toll-like receptor 7 agonist, induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells and stimulates their Th-1- and Th-17-polarizing capability, *International Immunopharmacology* 2010; 10: 142-33
31. Isatoribine. Na voljo 28. 4. 2015 ob 17:10 na internetni strani <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/134338977#section=Top>
32. Gartner M. Sinteza in vrednostenje modulatornega delovanja derivatov kromeno[3,4-*d*]imidazol-4-ona na Toll-u podobnem receptorju 7. Magistrska naloga. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, 2015.
33. Meng T., Zou Y., Khorec O., Jin Y., Zhou H., Zhang Y., Hu D., Ma L., Wang X., Shen J.: Simple and Efficient Copper(I)-Catalyzed Access to Three Versatile Aminocumarin-Based Scaffolds using Isocyanoacetate, *Advanced Synthesis & Catalysis* 2011; 353: 918-24
34. Multicomponent reactions. Na voljo 17. 4. 2015 ob 18:35 na internetni strani <http://www.organic-chemistry.org/topics/multicomponent-reactions.shtml>
35. Klein D.: Organic chemistry second edition, John Wiley & Sons, Hoboken, 2015: 1251-3

36. Solomons T. W. G., Fryhle C. B., Snyder S.A.: Organic chemistry 11E, John Wiley & Sons, Hoboken, 2014: 792
37. Fischer Esterification. Na voljo 21. 4. 2015 ob 19:02 na internetni strani <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/fischer-esterification.shtml>