

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MANA GARTNAR

**SINTEZA IN VREDNOTENJE MODULATORNEGA DELOVANJA DERIVATOV
KROMENO[3,4-*d*]IMIDAZOL-4-ONA NA TOLL-U PODOBNEM RECEPTORJU 7**

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

LJUBLJANA, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MANA GARTNAR

**SINTEZA IN VREDNOTENJE MODULATORNEGA DELOVANJA DERIVATOV
KROMENO[3,4-*d*]IMIDAZOL-4-ONA NA TOLL-U PODOBNEM RECEPTORJU 7**

**SYNTHESIS AND EVALUATION OF TOLL LIKE RECEPTOR 7
MODULATORY ACTIVITY OF CHROMENO[3,4-*d*]IMIDAZOL-4-ONE
DERIVATIVES**

LJUBLJANA, 2015

Magistrsko naložko sem opravila na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo in na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sovi, mag. farm., in somentorstvom doc. dr. Urbana Švajgerja, mag. farm. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo in Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani (Center za masno spektrometrijo).

ZAHVALA

Iskrena hvala mentorju doc. dr. Mateju Sovi, mag. farm., in somentorju doc. dr. Urbanu Švajgerju, mag. farm., za vso predano strokovno znanje, podporo in vodenje pri nastajanju magistrske naloge.

Zahvalila bi se tudi družini in prijateljem za spodbudo in lepe trenutke med študijem.

IZJAVA

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

Mana Gartnar

Ljubljana, 2015

Predsednica komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Tomaž Bratkovič, mag. farm.

Vsebina

KAZALO SLIK.....	III
KAZALO ENAČB	IV
KAZALO TABEL	IV
SEZNAM OKRAJŠAV.....	V
POVZETEK.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
UVOD.....	1
1. Imunski sistem	1
2. Toll-u podobni receptorji.....	2
3. Receptor TLR7	4
3.1. Terapevtska področja	5
3.2. Razvoj ligandov TLR7 kot zdravilnih učinkovin.....	8
NAMEN DELA.....	11
MATERIALI IN METODE	12
1. Kemijska sinteza	12
2. Biološko testiranje.....	14
EKSPERIMENTALNI DEL	19
1. Sinteza spojine 2	19
1. stopnja: sinteza spojine 1	19
2. stopnja: sinteza spojine 2	20
2. Sinteza spojine 4	21
1. stopnja: sinteza spojine 3	21
2. stopnja: sinteza spojine 4	22
3. Sinteza spojine 6	23
1. stopnja: sinteza spojine 5	23
2. stopnja: sinteza spojine 6	24
4. Sinteza spojine 8	25
1. stopnja: sinteza spojine 7	25
2. stopnja: sinteza spojine 8	26
5. Sinteza spojine 10	28
1. stopnja: sinteza spojine 9	28
2. stopnja: sinteza spojine 10	29

6. Sinteza spojine 12	30
1. stopnja: sinteza spojine 11	30
2. stopnja: sinteza spojine 12	31
REZULTATI IN RAZPRAVA.....	33
1. Kemijska sinteza	33
2. Biološko vrednotenje	36
2.1. Topnost	37
2.2. Citotoksičnost.....	38
2.3. Preliminarno testiranje agonistične in antagonistične aktivnosti	39
2.4. Določitev EC ₅₀	42
3. Odnos med strukturo in delovanjem spojin	46
SKLEP	48
VIRI	49

KAZALO SLIK

Slika 1: Signalna pot TLR7, povzeto po (14)	5
Slika 2: Struktura imikvimoda, povzeto po (27).....	9
Slika 3: Struktura analoga GSK2245035, povzeto po (31)	10
Slika 4: Struktura 1-izobutilkromeno[3,4- <i>d</i>]imidazol-4(1 <i>H</i>)-ona, povzeto po (35).....	10
Slika 5: Načrtovani novi derivati 1-izobutilkromeno[3,4- <i>d</i>]imidazol-4(1 <i>H</i>)-ona z različnimi substituenti na mestih 7 in 8	11
Slika 6: Reakcijska shema pretvorbe MTS v obarvan formazan, povzeto po (39)	17
Slika 7: Reakcijska shema sinteze spojine 1	19
Slika 8: Reakcijska shema sinteze spojine 2	20
Slika 9: Reakcijska shema sinteze spojine 3	21
Slika 10: Reakcijska shema sinteze spojine 4.....	22
Slika 11: Reakcijska shema sinteze spojine 5.....	23
Slika 12: Reakcijska shema sinteze spojine 6.....	24
Slika 13: Reakcijska shema sinteze spojine 7.....	25
Slika 14: Reakcijska shema sinteze spojine 8.....	26
Slika 15: Reakcijska shema sinteze spojine 9.....	28
Slika 16: Reakcijska shema sinteze spojine 10.....	29
Slika 17: Reakcijska shema sinteze spojine 11.....	30
Slika 18: Reakcijska shema sinteze spojine 12.....	31
Slika 19: Možen mehanizem nastanka produkta 1. stopnje, povzeto po (42).....	34
Slika 20: Mehanizem nastanka produkta 2. stopnje, povzeto po (44).....	35
Slika 21: Prikaz citotoksičnosti spojin (250 µM, 1. ponovitev)	38
Slika 22: Prikaz citotoksičnosti spojin (250 µM, 2. ponovitev)	38
Slika 23: Prikaz citotoksičnosti spojin (100 µM, 1. ponovitev)	39
Slika 24: Strukture gardikvimoda, 3 <i>H</i> -regioizomera in 4-dezamino-3 <i>H</i> -regioizomera, povzeto po (46).....	40
Slika 25: Preliminarno testiranje agonistične aktivnosti (250 µM, 1. ponovitev)	40
Slika 26: Preliminarno testiranje agonistične aktivnosti (100 µM, 1. ponovitev)	40
Slika 27: Preliminarno testiranje agonistične aktivnosti (100, 250 µM, 2. ponovitev).....	41
Slika 28: Preliminarno testiranje antagonistične aktivnosti (250 µM, 1. ponovitev).....	41
Slika 29: Preliminarno testiranje antagonistične aktivnosti (250 µM, 2. ponovitev).....	42
Slika 30: Graf odvisnosti odziva od logaritma koncentracije spojine 8	43
Slika 31: Graf odvisnosti odziva od koncentracije spojine 8	43
Slika 32: Graf odvisnosti odziva od koncentracije spojine 10.....	44
Slika 33: Graf odvisnosti odziva od koncentracije spojine 12.....	45
Slika 34: Graf odvisnosti odziva od koncentracije spojine 14.....	45

KAZALO ENAČB

Enačba I: Enačba za izračun števila celic, povzeto po (38) 16

KAZALO TABEL

Tabela I: Pregled receptorjev TLR in njihovih ligandov, povzeto po (3, 6-8, 13).....	4
Tabela II: Niz spojin za biološko testiranje.....	37
Tabela III: Tabela vrednosti absorbanc za spojino 8 (prva ponovitev)	42
Tabela IV: Tabela vrednosti absorbanc za spojino 8 (druga ponovitev)	43
Tabela V: Tabela vrednosti absorbanc za spojino 10.....	44
Tabela VI: Tabela vrednosti absorbanc za spojino 12	44
Tabela VII: Tabela vrednosti absorbanc za spojino 14	45

SEZNAM OKRAJŠAV

angl	angleško
AP-1	aktivacijski protein 1
APC	antigene predstavljače celice (angl.: antigen presenting cells)
Ar-H	aromatski vodikov atom
ATR	oslabljen popolni odboj (angl.: attenuated total reflectance)
CLR	lektinski receptor tipa C (angl.: C-type lectin receptor)
DAMP	s poškodbami povezani molekulski motivi (angl.: damage-associated molecular pattern)
DC	dendritične celice
DKM	diklorometan
DMEM	celično gojišče z visoko vsebnostjo glukoze, vitaminov in aminokislin (angl.: Dulbecco's modified Eagle's medium)
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl.: deoxyribonucleic acid)
DPBS	fosfatni pufer (angl.: Dulbecco's phosphate-buffered saline)
dsRNA	dvoverižna RNA (angl.: double-stranded RNA)
EC ₅₀	srednja efektivna koncentracija (angl.: median effective concentration)
ESI	ionizacija z razprševanjem (angl.: electrospray ionization)
FBS	fetalni goveji serum (angl.: fetal bovine serum)
HEK	celična linija, pridobljena iz človeških embrionalnih ledvičnih celic (angl.: human embryonic kidney cell line)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl.: high performance liquid chromatography)
HPV	humani papiloma virus
HRMS	masna spektrometrija visoke ločljivosti (angl.: high-resolution mass spectrometry)
hTLR7	humani receptor TLR7 (angl.: human TLR7)
IC ₅₀	srednja inhibitorna koncentracija (angl.: median inhibition concentration)
IFN	interferon
IKK	kinaza IκB
IL	interlevkin

iNOS	inducibilna sintaza dušikovega oksida (angl.: inducible nitric oxide synthase)
IP3	inozitol trifostat (angl.: inositol triphosphate)
IRAK	kinaza, aktivirana z receptorjem IL-1 (angl.: IL-1 receptor-activated kinase)
IUPAC ime	ime, določeno po predpisanim sistemu Mednarodne zveze za čisto in uporabno kemijo
IκB	inhibitorni protein za NF-κB
LRR	z levcinom bogata regija (angl.: leucin rich repeats)
MF	mobilna faza
M _r	molekulska masa
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol
MyD88	diferenciacijski mielodni protein 88 (angl.: myeloid differentiation primary-response protein 88)
NF-κB	jedrni dejavnik κB (angl.: nuclear factor κB)
NK	celice ubijalke (angl.: natural killer cells)
NLR	NOD-u podobni receptor (angl.: NOD like receptor)
NMR	jedrska magnetna resonanca (angl.: nuclear magnetic resonance)
PAMP	za patogen značilen molekulski vzorec (angl.: pathogen-associated molecular pattern)
pDC	plazmacitoidna dendritična celica
PMS	fenazin metilsulfat (angl.: phenazine methosulfate)
PRR	receptorji za prepoznavo molekulskih vzorcev (angl.: pattern recognition receptors)
Rf	retencijski faktor
RLR	RIG-I podoben receptor (angl.: RIG-I like receptor)
RNA	ribonukleinska kislina (angl.: ribonucleic acid)
RSV	respiratorni sincicijski virus
Rt	retencijski čas (angl.: retention time)
SAR	odnos med strukturo in delovanjem (angl.: stucture-activity relationship)
SEAP	alkalna fosfataza, ki jo izločajo embrionalne celice (angl.: secreted embryonic alkaline phosphatase)
SLE	sistemski lupus eritematozus

ssRNA	enoverižna RNA (angl.: single-stranded RNA)
TAB	TAK1 vezavni protein (angl.: TAK1-binding protein)
TAK	s TGF-β povezana kinaza (angl.: TGF-β-associated kinase)
Th	celica T pomagalka (angl.: T helper cell)
TIR	Toll/Il-1 receptor
TLR	Toll-u podoben receptor (angl.: Toll like receptor)
TNF	dejavnik tumorske nekroze (angl.: tumor necrosis factor)
TPK	tankoplastna kromatografija
Tr	regulatorni limfocit T
TRAF	s TNF-receptorjem povezan faktor (angl.: TNF receptor-associated factor)
TRIF	adapterski protein, ki vključuje domeno TIR in faktor IFN-β (angl.: TIR-domain-containing adaptor-including IFN-β-factor)
T_{tal}	temperatura tališča

POVZETEK

Imunski sistem s svojo sposobnostjo zaščite pred patogenimi mikroorganizmi predstavlja enega izmed ključnih mehanizmov za ohranjanje homeostaze v telesu. Del imunskega sistema predstavljajo tudi Toll-u podobni receptorji oziroma TLR, ki sprožijo prirojen imunski odziv in omogočajo kasnejši razvoj specifičnega pridobljenega imunskega odziva. Gre za receptorje, ki se aktivirajo ob prisotnosti značilnih molekulskeih motivov patogenov (PAMP) in s poškodbami povezanih molekulskeih motivov (DAMP). Pri človeku so odkrili 10 različnih tipov receptorjev TLR, med njimi tudi TLR7. Ta se nahaja v endosomu znotraj celic in prepoznavata enoverižne RNA. Njegova glavna naloga je obramba organizma pred virusnimi okužbami. Terapevtsko zanimivi so tako agonisti receptorja TLR7 (za zdravljenje virusnih okužb, nekaterih rakavih obolenj in astme ter kot adjuvansi pri cepljenju) kot tudi antagonisti (zdravljenje nekaterih avtoimunskih bolezni).

V sklopu magistrske naloge smo sintetizirali derivate znanega liganda TLR7, 1-izobutilkromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-ona, z vpeljavo novih funkcionalnih skupin na mestih 7 in 8. Za pripravo končnih spojin smo uporabili dvostopenjski sintezi postopek, pri čemer smo reakcijo 2. stopnje z izvedbo v mikrovalovnem reaktorju optimizirali in na ta način zagotovili višje izkoristke, krajsi čas in večjo varnost izvedbe.

Sledilo je biološko vrednotenje spojin kot ligandov TLR7. Nizu sintetiziranih spojin smo dodali še derivate kromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-ona z različnimi substituenti na mestu 1. Vsem spojinam smo najprej preverili topnost v celičnem gojišču, sledilo je vrednotenje citotoksičnosti na transgenih celicah HEK-Blue™ hTLR7, ki izražajo humani TLR7 in reporterski gen za alkalno fosfatazo pod nadzorom interferonskega promotorja. Na tej isti celični liniji smo vrednotili tudi agonistično in antagonistično delovanje spojin.

Izmed testiranih spojin je najmočnejše agonistično delovanje izkazoval derivat 1-izobutilkromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-ona s hidroksi substituentom na mestu 8 (spojina **10**, EC₅₀ = 114 µM), medtem ko ostale spremembe na osnovni strukturi niso bistveno vplivale na delovanje spojin. Vsekakor pa spojina **10** predstavlja dobro izhodišče v nadaljnjih raziskavah iskanja novih nizkomolekularnih ligandov TLR7 kot potencialnih zdravilnih učinkovin.

ABSTRACT

With its ability to protect human body from pathogen organisms, the immune system is one of the key mechanisms for maintaining homeostasis. Part of the immune system are also Toll like receptors (TLR), which activate innate immune response and help to develop adaptive immunity. The TLR receptors are activated in presence of so called PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Pattern) and DAMPs (Damage-Associated Molecular Pattern). Up to date, there have been 10 different types of TLR discovered in humans, one of them being TLR7. It is located in intracellular endosomes, where it recognizes single-stranded RNA, therefore, one of its main functions is defense against viral infections. Ligands acting on TLR7 are interesting as novel active substances for treating various medical conditions; agonists have the potential for treating viral infections, asthma and some types of cancer, furthermore, they can also be used as vaccines adjuvants. Antagonists on the other hand show potential for treating some types of autoimmune diseases.

As part of this master's thesis we synthesized analogues of a known TLR7 ligand 1-isobutylchromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-one, where new functional groups on positions 7 and 8 were added. In order to obtain final compounds two-step synthetic procedure was used. The second step was optimized by using a microwave reactor, where higher yields were obtained. Furthermore, our microwave-assisted procedure offers higher level of safety and shorter reaction time.

The next step of our study involved the biological evaluation of compounds as TLR7 ligands. The test set included synthesized compounds and analogues of chromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-one with structurally diverse substituents on position 1. The solubility in cell-culture medium and cytotoxicity of compounds were tested on transgenic cell line HEK-BlueTM hTLR7, which expresses human TLR7 and reporter enzyme alkaline phosphatase under control of interferon promoter. This was followed by evaluation of agonistic and antagonistic activity on the same cell line.

The most promising compound of the test set was the analogue with hydroxyl group on position 8 (compound **10**, EC₅₀ = 114 μM), whereas other modifications on the target molecule did not affect the activity in a noticeable manner. Nevertheless, compound **10** represents an important starting point for further development of small molecule TLR7 ligands as potential novel drugs.

UVOD

1. Imunski sistem

Ena izmed ključnih nalog človeškega organizma za ohranjanje homeostaze je obramba pred škodljivimi organizmi, tako imenovanimi patogeni, med katere sodijo razni virusi, bakterije, glice in paraziti. V tam namen se je tokom evolucije razvil imunski sistem, ki skrbi za odstranjevanje in uničenje teh organizmov. Imunski sistem sestoji iz dveh delov, prirojenega in pridobljenega imunskega odziva, ki pa sta med seboj neločljivo povezana (1).

Prvo obrambno linijo predstavlja prirojen imunski odziv, ki je sicer precej nespecifičen, njegova prednost pa je v hitrem delovanju. Sestoji iz anatomskeih ovir, ki onemogočajo vdor patogenov v telo, in iz celičnega odziva. Anatomske ovire predstavljajo koža in epitelij na tkivih, ki so v stiku z zunanjim okoljem. Epitelij že mehansko onemogoči prehod mikroorganizmov v telo, za dodatno zaščito poskrbijo kemične in biološke snovi, ki delujejo protimikrobnno (razni encimi, kisel pH želodca, RNaze, DNaze, komenzalni mikrobi itd.). Celična komponenta prirojenega imunskega odziva se aktivira, ko patogen že preide v telo. Celice, ki sodelujejo pri tej fazi, so levkociti mieloidne vrste (granulociti, monociti, makrofagi in dendritične celice (DC)), celice ubijale (NK) ter fagociti. Pomembna komponenta prirojenega celičnega odziva je razlikovanje tujih molekul od lastnih, saj le tako lahko imunski sistem deluje selektivno in ne škodi lastnemu organizmu. Celice prepoznavajo značilne molekulske motive patogenov (PAMP; pathogen-associated molecular pattern) in s poškodbami povezane molekulske motive (DAMP; damage-associated molecular pattern). Pri tem je potrebno opozoriti, da se PAMP ne nahajajo samo na patogenih, ampak so lahko prisotni tudi na nepatogenih mikroorganizmih. Receptorje, ki prepoznavajo PAMP oziroma DAMP, imenujemo receptorji za prepoznavo molekulskeih vzorcev (PRR; pattern recognition receptors). Obstaja več družin PRR, med drugim: Toll-u podobni receptorji (TLR), lektinski receptorji tipa C (CLR), NOD-u podobni receptorji (NLR) in RIG-I podobni receptorji (RLR). PRR se nahajajo tako na celični membrani kot tudi v notranjosti celice. Izražajo jih predvsem levkociti (monociti, makrofagi, granulociti, DC in limfociti) ter celice, ki so pogosto v stiku s patogeni (koža, epitelijske celice, fibroblasti ipd). Po aktivaciji PRR se sproži nespecifičen vnetni odziv, delujejo pa tudi kot premostitveni sistem med prirojenim in pridobljenim imunskim odzivom (1-5).

Druga faza imunskega odziva je tako imenovana pridobljena imunost, ki je nekakšna nadgradnja prirojene imunosti z večjo učinkovitostjo in specifičnostjo. Pridobljen imunski odziv lahko razdelimo na dve veji: humoralno in celično imunost. Faze so nadzorovane preko citokinov, ključne celice, udeležene v tem tipu imunosti, pa so limfociti tipa T in B. Faza pridobljene imunosti se prične s predstavitvijo antiga na antogene predstavlajočih celicah (APC, najpogosteje so to DC) naivnemu limfocitu T. Ta se ob stiku z antigenom lahko razvije v celico T pomagalko (Th). Obstaja več vrst celic Th, med katerimi sta najbolj preučeni naslednji:

- celice Th1, ki aktivirajo celično imunost. Za ta tip imunosti je značilna aktivacija makrofagov in citotoksičnih T-celic ter nadaljnje izločanje citokinov.
- celice Th2 na drugi strani aktivirajo humoralno imunost. Stimulirajo proliferacijo limfocitov B v plazmatke, ki proizvajajo protitelesa. Protitelesa povežejo antogene s celicami imunskega odziva in sprožijo fagocitozo, sproščanje vnetnih mediatorjev ter aktivirajo sistem komplementa.

V katero smer bo šla diferenciacija naivnih limfocitov T, je v veliki meri odvisno od sproščenih citokinov; tako na primer IL-2 in IFN- γ spodbujata razvoj Th1, medtem ko ob prisotnosti IL-4 nastajajo predvsem celice Th2. V vsakem primeru pa se ob prvem stiku z antigenom tvorijo spominske celice tipa T in B, kar ob naslednjem vdoru patogena v telo pomeni precej hitrejši in bolj specifičen imunski odziv (1, 2, 5).

2. Toll-u podobni receptorji

Receptorji TLR so bili prvi odkriti PRR in imajo za enkrat najbolje opisano strukturo in delovanje. Ime izhaja iz homologije s proteinom Toll, ki ga najdemo v mušici *Drosophila* in je pomemben pri obrambi pred glivami. TLR so transmembranski receptorji tipa I, sestavljeni iz zunanje, z levcinom bogate regije (LRR) in z eno ali dvema s cisteinom bogatima regijama. Ta del je odgovoren za prepoznavo liganda in se med različnimi tipi TLR rahlo razlikuje. Citoplazemska domeno zaradi strukturne podobnosti z domeno receptorja IL-1 imenujemo Toll/IL-1R (TIR). Za razliko od večine ostalih receptorjev tipa I, kot so na primer tirozin-kinaze, citoplazemska domena ne poseduje encimske aktivnosti, ampak ob stiku z agonistom pride do di- ali oligomerizacije receptorjev, na katere se vežejo adapterski proteini. Dva ključna adapterja sta MyD88 in TRIF. Večina TLR prenese signal preko MyD88, izjemi sta TLR3, ki uporablja TRIF, in TLR4, ki signalizira prek obeh poti (tj. preko MyD88 in TRIF). Vezava adapterja sproži signalno kaskado, ki vodi

do aktivacije jedrnega dejavnika κB (NF-κB). Ta sproži transkripcijo več genov za proteine, ki sodelujejo v obeh fazah imunosti, kot so razni encimi (na primer iNOS), kemokini in citokini (na primer: TNF- α , IL-1, IL-6 in IFN- α). Kombinacija izraženih produktov poskrbi za hiter, nespecifičen imunski odziv kot tudi sproži aktivacijo pridobljene faze imunosti, pri čemer aktivacija TLR propagira predvsem odziv limfocitov Th1 (3, 6-8).

Do danes je bilo odkritih 23 različnih tipov receptorjev TLR, vendar je le 10 od njih funkcionalnih pri človeku. Razlikujejo se glede na ligande, ki receptor aktivirajo (povzeto v tabeli I), kot tudi po lokaciji v sami celici. TLR 1, 2, 4, 5, 6 in 10 se nahajajo na celični membrani in so specializirani za prepoznavo molekul, ki so značilne za bakterije in jih pri človeku ne najdemo; medtem ko so TLR 3, 7, 8 in 9 lokalizirani na membrani znotrajceličnih veziklov in se aktivirajo ob prisotnosti nukleinskih kislin, najpogosteje ob virusnih okužbah. Sposobnost receptorja, da se ne odziva na lastne nukleinske kisline, ni v specifični prepoznavi virusnega genskega materiala, temveč v sami lokaciji receptorja v citoplazmi, kjer človeške DNA oziroma RNA praviloma ni, izjema so nekatere avtoimunske bolezni (9, 10).

Receptorji TLR so izraženi v večini človeških celic, največ jih je v tkivih, ki so izpostavljena zunanjemu okolju (pljuča, gastrointestinalni trakt) oz. so imunološko pomembna (levkociti, predvsem DC in makrofagi, ter celice vranice) (7, 11).

Terapevtsko so potencialno uporabni tako agonisti kot antagonisti receptorjev TLR, odvisno od bolezenskega stanja. Tako bi se na primer lahko agonisti uporabljali za zdravljenje rakavih obolenj in kot adjuvansi pri cepljenju, antagonisti pa za zdravljenje nekaterih avtoimunskih bolezni (sistemska lupus erimatozus (SLE), revmatoidni artritis, sistemska skleroza, Sjögrenov sindrom). Poleg tega bi s selektivnimi ligandi za specifičen receptor lahko vplivali tudi na zdravljenje sepse, astme, vnetnih obolenj, kronične obstruktivne pljučne bolezni, kardiovaskularnih obolenj, bolečine, virusnih obolenj itd (9, 12).

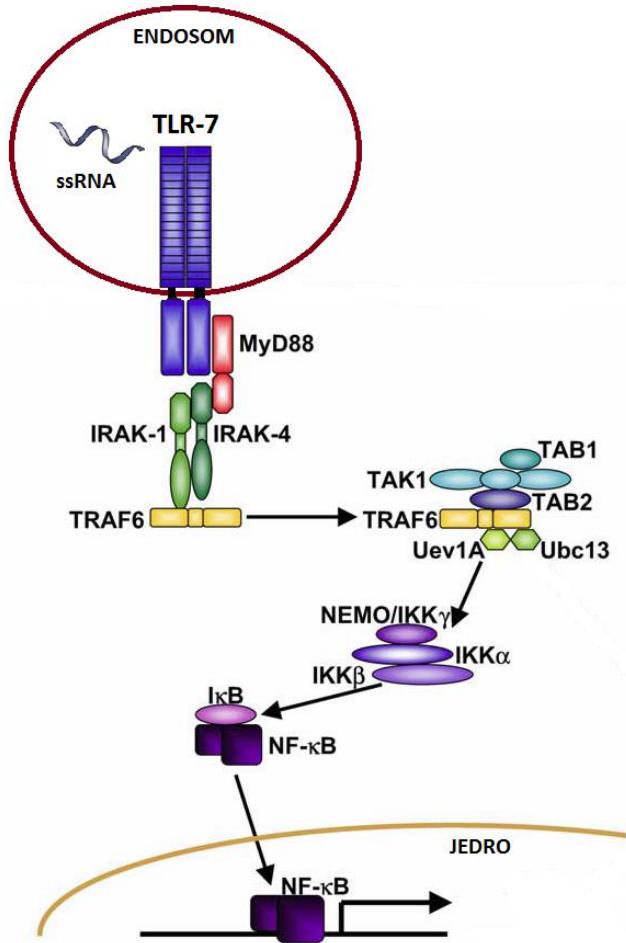
Tabela I: Pregled receptorjev TLR in njihovih ligandov, povzeto po (3, 6-8, 13)

Receptor	Ligand	Izvor liganda
TLR1	Triacilirani lipopeptidi	Mikobakterije in Gram-negativne bakterije
TLR2	Peptidoglikan	Gram-pozitivne bakterije
	Lipoprotinini	Mikobakterije in druge bakterije
TLR3	Dvojerižna RNA (dsRNA)	Virusi
TLR4	Lipopolisaharid	Gram-negativne bakterije
TLR5	Flagelin	Bakterije
TLR6	Diacilirani lipopeptidi	Mikoplazma
TLR7	Enoverižna RNA (ssRNA)	Virusi
	Imidazolkinozini, bropirimin	Sintezne molekule
TLR8	ssRNA	Virusi
TLR9	Nemetilirana citidin-gvanozin DNA	Bakterije in virusi
TLR10	Ligandi niso znani	/

3. Receptor TLR7

Toll-u podoben receptor 7 oziroma TLR7 se nahaja znotrajcelično na endosomalnih membranah, najpogosteje v plazmacitoidnih dendritičnih celicah (pDC). Njegova glavna naloga je prepoznavanje enoverižne RNA (ssRNA) bogate z gvanozin-uridinom oziroma samim uridinom. Receptor lahko aktivirajo tudi majhne sintezne molekule, kot je na primer imikvimod (3, 10).

Ob aktivaciji receptorja pride do že prej omenjene dimerizacije, ki privede do vezave adapterja MyD88. Sledi združitev receptorskega kompleksa z IRAK1, IRAK4 in TRAF6. IRAK1 in TRAF6 disociirata in se združita z drugim kompleksom, sestavljenim iz TAK1 ter TAB 1 in 2. Ob tem se sproži aktivacija TAK1, ki nadalje aktivira kompleks IKK. IKK fosforilira I κ B, kar spodbudi prehod NF- κ B v jedro, kjer se prične transkripcija genov, ki izražajo provnetne mediatorje. Značilni za TLR7 so predvsem IFN tipa I, ki imajo močno izraženo protivirusno delovanje. Večstopenjska signalna pot omogoča modulacijo prenosa informacije na več nivojih, kar pomeni, da je sam odziv dobro in natančno reguliran. Signalna pot je shematsko prikazana na sliki 1 (10, 14).



Slika 1: Signalna pot TLR7, povzeto po (14)

3.1. Terapevtska področja

Ligandi TLR7 so kot potencialne zdravilne učinkovine uporabni na več terapevtskih področjih. Trenutno je registrirana ena zdravilna učinkovina (imikvimod) v obliki dermalne kreme, z indikacijami za dermalno zdravljenje genitalnih bradavic povzročenih s humanim papiloma virusom (HPV), manjših površinskih karcinomov bazalnih celic in akitiničnih keratoz (15).

Možna terapevtska uporaba ligandov TLR7:

a) VIRUSNA OBOLENJA

Temeljna naloga TLR7 je zaznava ssRNA in posledična aktivacija imunskega sistema kot odgovor na virusno okužbo. Receptor se praviloma odzove na viruse, ki ali vsebujejo ali proizvajajo ssRNA, med katerimi slediči dokazano aktivirajo TLR7: virus gripe, HPV, HIV, virus hepatitisa C, virus *Herpes Simplex*, respiratorni sincicijski virus (RSV),

Parechovirus, virus rumene mrzlice, Langat virus, virus japonskega encefalitisa in še nekateri drugi. Terapevtsko uporabni so predvsem agonisti TLR7, ki okrepijo protivirusno delovanje organizma ob okužbi (16-18).

Prednost agonistov TLR7 pred trenutno uporabljenimi zdravilnimi učinkovinami pri terapiji virusnih obolenj (npr. IFN- α pri kroničnem hepatitisu C) je v mestu delovanja, saj se receptor nahaja na začetku signalne kaskadne poti. Tako se ob aktivaciji receptorja izraža več vrst vnetnih mediatorjev (med drugim tudi IFN- α), poleg tega agonist TLR7 sproži aktivacijo obeh vej imunskega sistema. Velja tudi omeniti, da parenteralno apliciran pegiliran IFN- α pri zdravljenju kroničnega hepatitisa C povzroča precej neželenih učinkov (17).

b) **AVTOIMUNSKE BOLEZNI**

V krvi se poleg limfocitov T, ki se bojujejo proti patogenom, nahaja tudi manjše število limfocitov T, ki imajo delovanje usmerjeno proti komponentam lastnega telesa. Ti avto-reaktivni limfociti T so v spečem stanju, kot posledica delovanja regulatornih limfocitov T (Tr), ki delujejo zaviralno na aktivirane limfocite T. Aktivacija TLR na DC vodi do izločanja citokina IL-6 in neznanega faktorja, ki nasprotujeta zavirальнemu delovanju celic Tr. Ta mehanizem je sicer želen pri boju s patogeni, saj se na ta način aktivirajo limfociti T, vendar to velja tudi za avto-reaktivne limfocite T, kar lahko vodi v razvoj avtoimunskih bolezni. Navedeno potrjuje tudi raziskava, v kateri so ugotovili, da so miši s pomanjkanjem IL-6 (eden izmed produktov aktivacije receptorjev TLR) bolj odporne na pojav revmatoidnega artritisa. Tako bi potencialne antagoniste TLR7 lahko uporabljali za zdravljenje avtoimunskih bolezni (18).

Veliko pozornosti se namenja iskanju antagonistov TLR7 (in tudi TLR9) za zdravljenje SLE. Gre za avtoimunsko bolezen, pri kateri je prirojen del imunskega sistema kronično stimuliran s strani endogenih nukleinskih kislin, ki se zaradi povečane poškodbe lastnih celic v telesu pojavljajo v večjem obsegu kot običajno. Trenutno se v terapiji uporablja glukokortikoidi, katerih mehanizem delovanja temelji na inhibiciji aktivacije NF- κ B, vendar to ne velja v primeru pDC, ki so ene izmed ključnih celic pri vzpostavitvi imunskega odziva. Ob terapiji z glukokortikoidi se sicer zmanjša izražanje vnetnih faktorjev tudi iz pDC, ampak na račun (nezaželenega) citotoksičnega delovanja. Slaba lastnost glukokortikoidov je tudi nespecifično protivnetno delovanje, ki tako oslabi celoten imunski sistem, medtem ko bi potencialni inhibitor TLR deloval bolj specifično in zaviral

samo del, ki se aktivira ob stiku z nukleinskimi kislinami. Prednost antagonistov TLR je tudi v zaviranju aktivacije NF-κB v pDC brez apoptoze celic, poleg tega se ob aplikaciji antagonistov TLR poveča tudi odpornost pDC na citotoksično delovanje glukokortikoidov, kar predstavlja prednost ob morebitni kombinirani terapiji. Antagonisti TLR bi delovali na dveh ravneh: zmanjšala bi se produkcija IFN α (povečane koncentracije so namreč značilne za SLE) ter produkcija limfocitov B in protiteles, kar posledično pomeni upočasnitev napredovanja bolezni (17, 19, 20).

c) ADJUVANSI PRI CEPLJENJU

Adjuvansi so snovi, ki povečajo oziroma modulirajo imunski odziv organizma ob stiku z antigenom in tako pripomorejo k močnejši ter učinkovitejši obrambni reakciji. Zaradi navedenih lastnosti se uporablja v kombinaciji z antigeni v cepivih, saj se na ta način zagotovi boljša imunizacija osebka oziroma se zmanjša količina apliciranega antiga. Prve generacije adjuvantov večinoma delujejo nespecifično, kot na primer pogosto uporabljeni aluminijev hidroksid, katerega mehanizem je ustvarjanje kompleksa z antigenom, zaradi česar pride do lokalno povečane koncentracije antiga in posledično večje stimulacije APC. Slaba lastnost aluminijevega hidroksida je, da poveča predvsem humoralno imunost in ne celične, ki je z vidika dolgotrajne zaščite pomembnejša. Tako se je kmalu po odkritju mehanizma delovanja receptorjev TLR začelo iskanje agonistov kot adjuvantov. Prednosti so v spodbujanju celične imunosti in specifičnem delovanju s potencialno manj neželenimi učinki, poleg tega v nasprotju z aluminijevim hidroksidom spodbujajo predvsem Th1-celični odziv, kar predstavlja prednost ob sočasnem zdravljenju alergij. Trenutno je na trgu kot edini adjuvan z delovanjem na TLR registriran monofosforil lipid A, sicer agonist TLR4. V zadnjem času je predmet raziskav tudi možnost fizične povezave antiga z agonistom TLR, kar bi pomenilo dodatno prednost, saj je v tem primeru antigen dostavljen na mesto delovanja k APC (17, 21).

d) RAKAVA OBOLENJA

Aktivacija receptorjev TLR7 je lahko koristna tudi pri terapiji rakavih obolenj. Ob vezavi agonista pride do splošnega imunostimulatornega delovanja, v sklopu katerega se med drugim poveča izražanje IFN α ter aktivacija celic NK in limfocitov T. Omenjeno vodi do lize rakavih celic, kar je osnovni mehanizem protitumornega delovanja, sproženega z aktivacijo TLR. Ob tem je potrebno paziti na določene vrste tumorskega tkiva, ki izražajo

povečano število receptorjev TLR, pri čemer aktivacija lahko vodi v povečano odpornost proti apoptozi in invazivnosti tkiva. V tem primeru zato aplikacija agonistov ni sprejemljiva, potencialno primerna bi bila uporaba antagonistov. Kot zdravilna učinkovina je trenutno na trgu registriran imikvimod, ki deluje kot agonist na TLR7. Tudi sicer se več pozornosti v raziskavah namenja iskanju agonistov TLR kot potencialnim protitumornim učinkovinam, pri čemer se je potrebno zavedati možnosti ravno nasprotnega delovanja pri določenih vrstah raka (17, 18, 22).

e) ASTMA

Astma je kronična vnetna bolezen dihal, za katero so značilna akutna poslabšanja z reverzibilno zožitvijo dihalnih poti, pri čemer je eden od razlogov za pojav teh poslabšanj tudi virusna okužba. Ker se velik delež receptorjev TLR7 v telesu nahaja ravno v pljučih in so bili s pojavom bolezni povezani tudi nekateri polimorfizmi teh receptorjev, so agonisti TLR7 prepoznani kot potencialne zdravilne učinkovine za zdravljenje astme. Zaviranje bronhokonstrikcije ob aplikaciji agonista TLR7 je hitro (nekaj minut) in poteka preko sinteze dušikovega oksida. Hitrost delovanja je nekonsistentna s kaskadno signalno potjo opisano zgoraj, kar nakazuje na drugo pot prenosa signala, vendar ta za enkrat še ni bila opisana. Glavna prednost agonistov TLR7 je v njihovem dvojnem delovanju; poleg hitre brohodilatacije se kronično zmanjša hiperodzivnost pljuč na virusne okužbe. Poleg tega aktivacija TLR7 promovira predvsem Th1-celični odziv v nasprotju s Th2-odzivom, ki je prevladujoč pri astmi in alergijah (23, 24).

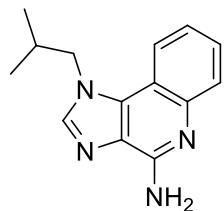
3.2. Razvoj ligandov TLR7 kot zdravilnih učinkovin

Namen uporabe ligandov TLR7 je modulacija imunskega odziva organizma in s tem zdravljenje različnih bolezenskih stanj. Ker kristalna struktura receptorja TLR7 še ni znana, iskanje novih aktivnih spojin večinoma poteka preko sinteze analogov že znanih ligandov oziroma preko virtualnega rešetanja na osnovi ligandov. Prva in do sedaj edina zdravilna učinkovina, ki deluje kot ligand TLR7, je majhna sintezna molekula imikvimod. Tudi danes se večina raziskav usmerja v iskanje nizkomolekularnih sinteznih molekul (25).

a) IMIKVIMOD

Imikvimod je imidazolkinolinski amin (molekulska struktura je prikazana na sliki 2) in je trenutno edina registrirana zdravilna učinkovina, ki deluje preko vpliva na receptor TLR7.

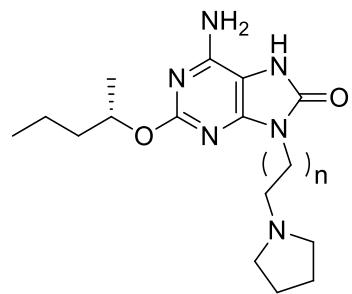
Registriran je bil že leta 1997 v ZDA oziroma 1998 v Evropski uniji, ko sicer še ni bilo jasno, kakšen je mehanizem delovanja. Znano je bilo, da poveča izražanje IFN α , IFN γ in IL-12, aktivira celice NK in makrofage, da izločajo citokine in dušikov oksid, ter inducira proliferacijo in diferenciacijo limfocitov B, točen mehanizem, torej agonizem na receptorjih TLR7, pa je bil odkrit šele leta 2002. Kasneje je bil dokazan tudi antagonizem na histaminskih H₂ in adenozinskih A2a receptorjih ter antagonizem na IP3 receptorjih. Večina učinkov je kljub temu posledica vezave na TLR7, kar sovpada tudi z indikacijami, za katere je zdravilna učinkovina registrirana (protitumorno in protivirusno delovanje). Zdravilo je na voljo v obliki dermalne kreme, poskušali so tudi s peroralno in intravensko aplikacijo, vendar v tem primeru klinično testiranje ni bilo uspešno (4, 25-28).



Slika 2: Struktura imikvimoda, povzeto po (27)

b) GSK2245035

GSK2245035 je nizkomolekularni selektivni antagonist TLR7 v fazi kliničnih testiranj kot imunomodulator za intranasalno zdravljenje blage astme in alergijskega rinitisa. Mehanizem delovanja temelji na lokalno povečanem izražanju IFN tipa 1, ki spremeni razmerje med celičnim odzivom Th1 in Th2 v korist Th1. Spojina je konec avgusta 2014 prestala fazo II kliničnih testiranj in je trenutno ena najbolj obetavnih za prehod v klinično uporabo. Točna struktura sicer še ni bila razkrita, šlo naj bi za analog spodaj prikazane spojine (slika 3). GSK2245035 ima primerljivo afiniteto do receptorja TLR7 kot imikvimod (mikromolarno območje), nizko biološko uporabnost (1%) in visok očistek (29-31).



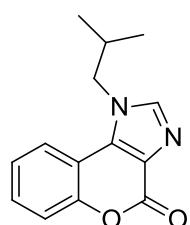
Slika 3: Struktura analoga GSK2245035, povzeto po (31)

c) IMO-8400

IMO-8400 je sintezni oligonukleotid (točna molekulska struktura še ni razkrita), ki deluje kot antagonist na TLR7, TLR8 in TLR9. Spojina je uspešno prestala klinično testiranje v fazi I in je trenutno v fazi II, kjer je vrednotena na bolnikih z rakom limfocitov B (difuzni velikocelični B limfom in Waldenstromova makroglobulinemija) ter bolnikih z avtoimunske boleznijo (luskavica). Spojina je v kliničnih testiranjih subkutano injicirana (32-34).

d) 1-IZOBUTILKROMENO[3,4-d]IMIDAZOL-4(1H)-ON

1-izobutilkromeno[3,4-d]imidazol-4(1H)-on (struktura je prikazana na sliki 4) je nov nizkomolekularni antagonist receptorja TLR7, odkrit na Fakulteti za farmacijo. Izmed spojin, pridobljenih z virtualnim rešetanjem na osnovi liganda, je kazal najboljšo *in vitro* antagonistično aktivnost z vrednostjo $IC_{50} = 23 \mu M$. Spojine so bile testirane in vrednotene na celični liniji HEK-BlueTM hTLR7, ob predpogojih, da so bile topne v celičnem gojišču ter niso izkazovale citotoksičnega delovanja (35).



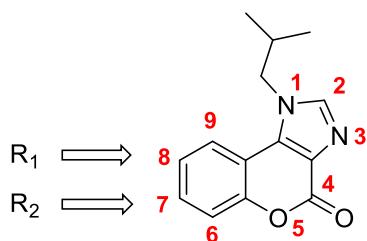
Slika 4: Struktura 1-izobutilkromeno[3,4-d]imidazol-4(1H)-ona, povzeto po (35)

NAMEN DELA

Glavni namen dela je sinteza in biološko vrednotenje novih ligandov receptorja TLR7 kot potencialnih zdravilnih učinkovin. Sintetizirali in ovrednotili bomo agonistično in antagonistično delovanje novih derivatov kromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-ona.

1. Kemijska sinteza

Sintetizirali bomo derivate 1-izobutilkromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-ona z modifikacijami na kromenskem delu molekule na mestih 7 in 8 (slika 5). Ker je v literaturi opisan sintezni postopek precej dolgotrajen in zahteva relativno veliko porabo nevarnih topil (70 % vodna raztopina H₂SO₄), bomo poskušali drugo stopnje reakcije optimizirati in tako zagotoviti hitrejše in varnejše reakcije z višjim izkoristkom.



Slika 5: Načrtovani novi derivati 1-izobutilkromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-ona z različnimi substituenti na mestih 7 in 8

2. Biološko vrednotenje spojin na celičnih linijah

Biološko bomo vrednotili niz spojin, sestavljen iz naših sintetiziranih spojin in derivatov kromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-ona z različnimi substituenti na imidazolskem dušiku (mesto 1), ki bodo sintetizirani na Fakulteti za farmacijo v okviru magistrskega dela Tine Čujež (36). Spojinam bomo preverili topnost v DMSO in celičnem gojišču, ocenili citotoksičnost ter ovrednotili njihovo agonistično in antagonistično delovanje na celicah HEK-BlueTM hTLR7. Izbranim aktivnim spojinam bomo nadaljnje določili vrednost IC₅₀ oziroma EC₅₀.

3. Ugotavljanje odnosa med strukturo in delovanjem (SAR)

Na podlagi dobljenih rezultatov biološkega testiranja bomo opredelili odnos med strukturo liganda in njegovim delovanjem na receptor TLR7. Zbrani rezultati bodo v prihodnosti pripomogli k lažjemu in bolj usmerjenemu razvoju nizkomolekularnih ligandov TLR7 kot potencialnih novih zdravilnih učinkovin.

MATERIALI IN METODE

1. Kemijska sinteza

Pri delu smo uporabili reagente in topila naslednjih proizvajalcev: Acros Organics, J. T. Baker, Carlo Erba reagents, Gram-mol, Maybridge, Merck, Panreac in Sigma-Aldrich (Aldrich, Fluka, Sigma).

Uporabljeni reagenti so bili: etil 2-izocianoacetat, izobutilamin, 5-fluorosalicilaldehid, piridin, bakrov (I) jodid, natrijev hidrogenkarbonat, natrijev hidroksid, žveplova (VI) kislina, 2-hidroksi-5-metoksibenzaldehid, 2-hidroksi-5-nitrobenzaldehid, 2-hidroksi-5-metilbenzaldehid, 4-benziloksi-2-hidroksibenzaldehid in 2-hidroksi-4-metoksibenzaldehid.

Topila, ki smo jih uporabljali pri sintezi in čiščenju spojin: metanol, diklorometan, etilacetat in prečiščena voda.

Ostala laboratorijska oprema:

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

Kromatografske metode

Tankoplastna kromatografija (TPK)

Za izvedbo TPK smo uporabili plošče Silikagel 60 F254 proizvajalca Merck z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem. Uporabili smo različne mobilne faze, ki so opisane pri posameznih sintezah. Za detekcijo spojin smo plošče osvetlili z UV svetlobo pri valovni dolžini 254 nm ali 366 nm.

Kolonska kromatografija

Za čiščenje spojin smo uporabili »flash« kolonsko kromatografijo s stacionarno fazo Silikagel 60 (Merck) z velikostjo delcev 0,040 – 0,063 mm. Mobilne faze so se razlikovale pri različnih sintezah in so navedene pri posameznih reakcijah.

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Za določevanje čistosti spojin smo uporabili HPLC z obrnjeno fazo na sistemu Agilent 1100, opremljenim s kvarterno črpalko in detektorjem več valovnih dolžin. Uporabili smo kolono Agilent Eclipse Plus C18 (4.6 x 50 mm, 5 µm), hitrost pretoka 1,0 mL/min in detekcijo pri valovni dolžini 254 nm. Elucijski sistem sta sestavljali topili A (0,1 % TFA v H₂O) in B (acetonitril). Gradient za metodo je bil prvih 15 minut 40 % B → 90 % B v A, med 15. in 17,5. minuto 90 % B v A , med 17,5. in 18. minuto 90 % B → 40 % B v A ter med 18. in 22. minuto 40 % B v A. Analiza je potekala 23 minut pri temperaturi 25 °C.

Vse spojine so presegle zahtevano čistost 95,0 %.

Spektroskopske metode

Jedrska magnetna resonanca

¹H-NMR in ¹³C-NMR spektre smo posneli na Bruker Avance 400 DPX spektrometru na Fakulteti za farmacijo. Snemanje je potekalo pri 25 °C in 400 MHz za ¹H-NMR oziroma 100 MHz za ¹³C-NMR spektre. Kemijske premike (δ) smo podali v »parts per million« (ppm) glede na interni standard tetrametilsilan (TMS δ 0,00 ppm), sklopitvene konstante (J) v hertzih (Hz), oblike vrhov pa s standardnimi oznakami za singlet (s), razširjen singlet (rs), dublet (d), dublet dubleta (dd), triplet (t) in multiplet (m). Za analizo spektrov smo uporabili računalniški program MestReNova 8.1 proizvajalca Mestrelab Research S.L.

Masna spektroskopija

Masni spektri so bili posneti na masnem spektrometu Q-TOF Premier proizvajalca Waters-Micromass s tehniko ESI v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

Določanje temperature tališča

Temperature tališč (T_{tal}) smo določali na mikroskopu Leica z ogrevalno mizico in so nekorigirane.

Mikrovalovni reaktor

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

Nomenklatura in risanje spojin

Za risanje in poimenovanje struktur spojin ter za risanje slik in shem reakcij smo uporabili računalniški program ChemDraw Ultra 12.0.

2. Biološko testiranje

Biološko vrednotenje aktivnosti spojin smo izvedli na celicah komercialno dostopne celične linije HEK-BlueTM hTLR7 proizvajalca InvivoGen, namenjenim raziskovanju stimulacije humanega receptorja TLR7. Celice so bile pripravljene s transfekcijo z genom za hTLR7 in reporterskim genom za SEAP, ki je pod kontrolo promotorja IFN-β, spojenega s petimi vezavnimi mesti za NF-κB in AP-1. Stimulacija receptorja TLR7 povzroči izražanje NF-κB in AP-1, kar vodi v nastajanje alkalne fosfataze, katere aktivnost nadaljnje lahko kvantificiramo s testom QUANTI-BlueTM in tako ocenimo aktivacijo receptorja TLR7 (37).

Pri delu smo uporabljali naslednje aparature in materiale:

- komora z laminarnim pretokom zraka Biosafe 7-130-2 proizvajalca Ehret
- centrifugo Heraeus Sepatech Megafuge 1.0
- mikroskop Nikon Eclipse TE2000-S
- inkubator Heraeus Hera Cell 150
- optični čitalec mikrotitrskih plošč Epoch proizvajalca Biotek Instruments
- Bürker-Türkovo ploščico za štetje celic z globino 0,100 mm
- celično gojišče DMEM High Glucose with stabile glutamine proizvajalca Gibco z dodanim FBS (fetalni goveji serum) v koncentraciji 100 µg/ml
- celični pufer DPBS brez Ca²⁺ in Mg²⁺ (Gibco)
- MTS (Promega)

- triptansko modrilo (Sigma-Aldrich)
- QUANTI-BlueTM (InvivoGen)
- imikvimod (InvivoGen)
- antibiotika BlasticidinTM in ZeocinTM (InvivoGen)
- računalniški program GraphPad Prism 6.05

Priprava in rokovanje s celicami

Celice smo prejeli v zamrznjenem stanju in jih je bilo tako potrebno najprej na pravilen način pripraviti na nadaljnje rokovanje. V tekočem dušiku globoko zamrznjene celice smo na hitro odtalili v vodni kopeli, nato pa vsebino prenesli v večjo centrifugirko na ledeno kopel in počasi po kapljicah dodajali ohlajen celični pufer do okoli 15 ml. Celice smo nato centrifugirali 5 min pri 700 obratih na minuto. Supernatant smo odlili, celice pa previdno suspendirali v celičnem gojišču.

Za gojenje celic smo uporabili gojilne posode, namenjene za rast adherentnih celic, s površino 75 cm², kamor smo dodali približno 10 ml pripravljenega celičnega gojišča. Celice smo inkubirali pri temperaturi 37,0 °C in 5 % CO₂. Uspešnost rasti smo preverjali z opazovanjem celic pod mikroskopom, običajno smo celice gojili en teden, oziroma dokler niso preraščale do okoli 70 – 80 % površine gojilne posode. Za nadaljnje delo je bilo potrebno celice precepiti v novo celično gojišče. Celicam v gojilni posodi smo s pipeto odstranili gojišče, jih 2 – 3x sprali s celičnim pufrom brez Ca²⁺ in Mg²⁺ ter jim tako odvzeli ione, ki jih potrebujejo za tvorjenje adhezijskih vezi med seboj in dnem posode. Nato smo dodali približno 13 ml pufra in celice 10 min rahlo stresali, da so se ločile od dna posode in se čim bolj suspendirale. Vsebino smo prenesli v centrifugirko in jo centrifugirali 4 minute pri 300 obratih na minuto. Supernatant smo previdno odstranili s pipeto, usedlino celic pa smo suspendirali v 1 ml pufra.

Za spremmljanje uspešnosti rasti in testiranje je potrebno poznati število izoliranih celic. V ta namen smo 20 µl celic, suspendiranih v pufru, prenesli k 180 µl triptanskega modrila, dobro premešali in pripravljeno suspenzijo nanesli na ploščico za štetje celic. Triptansko modrilo deluje kot indikator viabilnosti celic; mrtve celice imajo namreč poškodovano celično membrano zato vanje vdre barvilo in se obarvajo temno modro, medtem ko žive celice ostanejo neobarvane. Uporabili smo Bürker-Türkovo ploščico za štetje celic z

globino 0,100 mm, kjer smo prešteli celice v 25 točno določenih kvadratkih s stranicami 0,200 mm. Število živih celic smo izračunali po naslednji enačbi:

$$\frac{\text{število živih celic}}{\text{ml suspenzije}} = \frac{\text{število preštetih živih celic}}{25 \times (0,2 \text{ mm})^2 \times 0,1 \text{ mm}} \times \frac{180 + 20}{20} \times 1000$$

Enačba 1: Enačba za izračun števila celic, povzeto po (38)

V prvem ulomku izračunamo koncentracijo živih celic, z uporabo faktorja 200/20 upoštevamo redčenje celic s triptanskim modrilm, faktor 1000 je namenjen pretvorbi iz kubičnih milimetrov v mililitre.

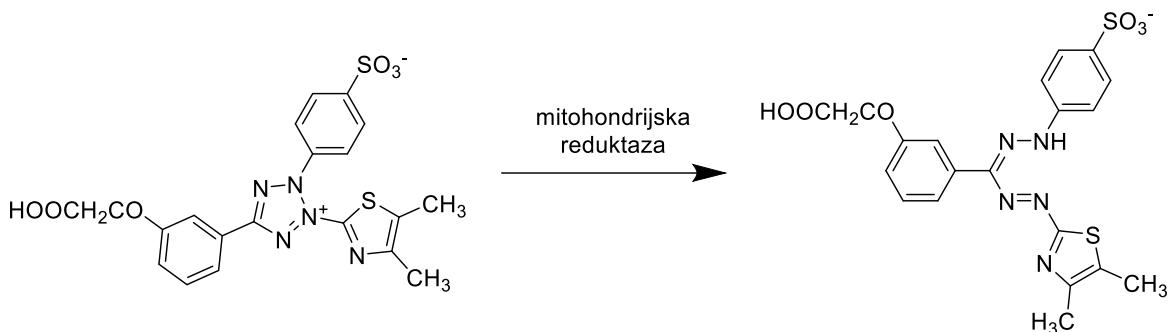
Del celic smo precepili v novo gojilno posodo s svežim celičnim gojiščem (okoli 4×10^6 celic), del smo porabili za testiranje. Celice so bile za testiranje primerne šele po tretjem krogu presajanja, takrat smo v gojišče tudi začeli dodajati antibiotika ZeocinTM (v koncentraciji 100 µg/ml; nanj so odporne celice z vstavljenim plazmidom, ki kodira SEAP) in BlasticidinTM (v koncentraciji 10 µg/ml; nanj so odporne celice z vstavljenim plazmidom, ki kodira hTLR7). Celična linija ostane stabilna do okoli 20 ciklov presajanja.

Topnost

Spojine za testiranje morajo biti v celičnem gojišču popolnoma topne, sicer dobimo lažno pozitivne oziroma negativne rezultate pri testiranju citotoksične, agonistične in antagonistične aktivnosti, ker je dejanska koncentracija spojine nižja od predpostavljene. Ker so bile testirane spojine vse dokaj lipofilne narave, smo jih najprej raztopili v DMSO in nadalje to osnovno raztopino dodali celičnemu gojišču. Natehtanim spojinam smo v 1,5 ml epruvetah z zapiralom dodali izračunan volumen DMSO, da smo pridobili raztopine s koncentracijo 25 mM. Vsebino smo dobro premešali in jo vizualno pregledali v kolikor bi ostali kakšni neraztopljeni delci. Nadaljevali smo s preverjanjem topnosti v celičnem gojišču, kjer smo pripravili raztopine s koncentracijo 250 µM, kar je pomenilo, da je v raztopini tudi 1 % DMSO, kar je največja še sprejemljiva koncentracija, ki bistveno ne vpliva na viabilnost celic. Pripravljene raztopine smo vizualno pregledali pod optičnim mikroskopom pri 100x povečavi, kjer je prisotnost precipitatov pomenila nepopolno raztapljanje spojine.

Citotoksičnost

Citotoksično delovanje smo preverjali s testom MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol). MTS ob prisotnosti fenazin metilsulfata (PMS) deluje kot substrat, ki ga žive celice pretvorijo v obarvan formazan (shema reakcije je prikazana na sliki 6). Intenziteta obarvanja je sorazmerna z deležem živih celic (399).



Slika 6: Reakcijska shema pretvorbe MTS v obarvan formazan, povzeto po (39)

Za izvedbo testa smo najprej v vdolbinice na mikrotitrni plošči nasadili po 20.000 celic v 100 µl celičnega gojišča. Celice smo inkubirali 24 ur, da so se adherirale na dno vdolbin. Naslednji dan smo dodali 100 µl raztopine testiranih spojin v celičnem gojišču, tako da smo dosegli končno koncentracijo spojin v vdolbinici 100 oziroma 250 µM. Mikrotitrne plošče smo zopet inkubirali 24 ur, nato smo v vsako vdolbinico dodali 10 µl raztopine MTS in počakali nekaj ur, da so celice pretvorile MTS v obarvan produkt, ki smo ga detektirali z optičnim čitalcem pri valovni dolžini 492 nm.

Test smo najprej izvedli pri koncentraciji spojin 250 µM, nato pa za potrditev rezultatov še enkrat pri dveh koncentracijah (100 in 250 µM). Vse teste smo izvajali v treh paralelkah, kot slepo določitev smo uporabili celice z ustreznim dodatkom DMSO (1 % pri koncentraciji spojin 250 µM in 0,4 % pri koncentraciji 100 µM). DMSO namreč deluje rahlo citotoksično, zato ga pri določitvah nikakor ne smemo zanemariti.

Določanje agonistične aktivnosti

Agonistično aktivnost smo določali s kolorimetričnim encimskim testom QUANTI-Blue™, ki deluje na principu spremeljanja encimske reakcije alkalne fosfataze, kar povzroči spremembo barve gojišča v modro-vijolično (40).

Podobno kot pri testu citotoksičnosti smo najprej v vdolbinice na mikrotitrni plošči nasadili po 40.000 celic v 100 µl celičnega gojišča in to inkubirali 24 h. Naslednji dan smo celicam dodali 100 µl raztopine spojin v celičnem gojišču in zopet inkubirali 24 h. Celicam smo nato odvzeli 20 µl supernatanta, ki smo ga primešali 180 µl raztopine QUANTI-Blue™ in zmes inkubirali pri 37 °C nekaj ur (od 2 – 6 h, odvisno od izražene aktivnosti). Stopnjo obarvanja smo kvantificirali na optičnem čitalcu pri valovni dolžini 620 nm.

Vse meritve smo izvajali v treh paralelkah, kot pozitivno kontrolo smo uporabili imikvimod v koncentracijah 1 oz. 2 µg/ml, kateremu smo dodali tudi testiranim spojinam primerljivo koncentracijo DMSO. Kot negativno kontrolo smo uporabili celice v gojišču z dodanim DMSO. Preliminarno testiranje smo izvedli pri koncentracijah 100 in 250 µM v dveh ponovitvah.

Določanje antagonistične aktivnosti

Test antagonistične aktivnosti se je od preverjanja agonizma razlikoval le v tem, da smo celicam poleg spojin dodali še učinkovino imikvimod v koncentraciji 1 µg/ml. To smo storili 2 uri po dodatku spojin in tako omogočili, da so preiskovane spojine zasedle mesta na receptorju pred imikvimodom.

Meritve smo prav tako izvajali v treh paralelkah, uporabili smo tudi enake kontrole. Test smo izvedli v dveh ponovitvah, v tem primeru samo pri koncentraciji 250 µM.

Določanje EC₅₀

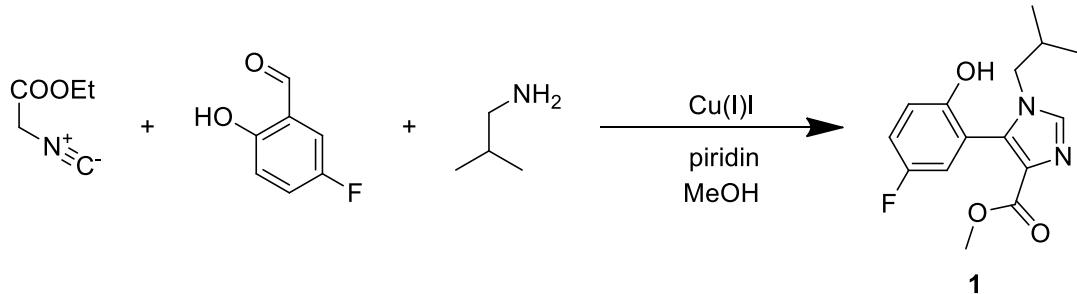
Določitve EC₅₀ so potekale po enakem protokolu kot določanje agonistične aktivnosti, le da smo izbrane spojine testirali pri več različnih koncentracijah: 250; 125; 62,5; 31,3; 15,6; 7,81; 3,91 in 1,95 µM.

Številčno vrednost EC₅₀ smo določili v programu GraphPad Prism, preko izračuna z nelinearno regresijo. Uporabili smo model s tremi parametri, ki predpostavlja, da je Hillov koeficient (predstavlja strmino krivulje) enak 1,0 ter da sta spodnji in vrhnji plato enaka tako pri kontroli kot pri preiskovani spojni. Model je primeren, kadar imamo na voljo manjše število podatkov za analizo, vendar je ob tem potrebno opozoriti, da dobimo nekoliko manj zanesljive rezultate. Program nam poda tudi vrednost R², interval zaupanja ter izriše krivuljo odziva v odvisnosti od logaritma koncentracije. Vsi ti podatki nam pomagajo oceniti zanesljivost in točnost dobljenih vrednosti EC₅₀ (41).

EKSPERIMENTALNI DEL

1. Sinteza spojine 2

1. stopnja: sinteza spojine 1



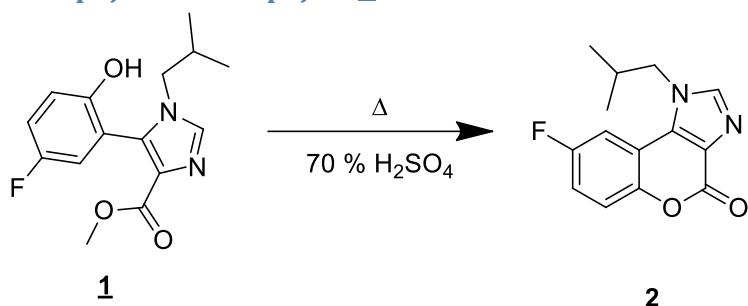
Slika 7: Reakcijska shema sinteze spojine 1

Raztopini *etil 2-izocianoacetata* (0,765 ml; 7,00 mmol), *izobutilamina* (0,696 ml; 7,00 mmol) in *5-fluorosalicilaldehyda* (0,981 g; 7,00 mmol) v metanolu (27 ml) smo pri sobni temperaturi dodali *piridin* (0,564 ml; 7,00 mmol) ter *bakov (I) jodid* (0,133 g; 0,700 mmol). Reakcijsko zmes smo nato segrevali 20 ur pri temperaturi 50 °C. Po pretečenem času smo reakcijski zmesi uparili topilo pod znižanim tlakom. Preostanek smo čistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: diklorometan/metanol = 50/1), da smo izolirali čist produkt (zeleno-rjavi kristali).

IUPAC ime	Metil 5-(5-fluoro-2-hidroksifenil)-1-izobutil-1<i>H</i>-imidazol-4-karboksilat (1)
M _r	292,31
Izgled	Zeleno-rjavi kristali
Izkoristek reakcije	50,6 %
Rf	0,48 (MF: DKM/MeOH = 9/1)
T _{tal}	86-88 °C
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) 0,73 (d, J = 5,6 Hz, 6H, 2 x CH ₃); 1,68-1,76 (m, 1H, CH); 3,64-3,72 (m, 2H, CH ₂); 3,80 (s, 3H, OCH ₃); 6,84 (d, J = 8,0 Hz, 1H, Ar-H); 7,07-7,09 (m, 2H, 2 x Ar-H); 7,57 (rs, 2H, imidazol-H + Ar-OH)
¹³ C-NMR (100 MHZ, CDCl ₃)	δ (ppm) 19,8; 29,2; 41,1; 52,4; 117,3 (d, J _{C,F} = 23,8 Hz); 118,1 (d, J _{C,F} = 8,4 Hz); 118,3 (d, J _{C,F} = 23,8 Hz); 120,1 (d, J _{C,F} = 8,4 Hz); 129,7; 131,9; 137,9; 151,5 (d, J _{C,F} = 1,5 Hz); 156,4 (d, J _{C,F} = 240,1 Hz); 164,9

ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₅ H ₁₇ N ₂ O ₃ F: Izmerjena vrednost (m/z):	293,1301 [M+H] ⁺ 293,1303
IR (ATR)	2960, 1715, 1568, 1504, 1439, 1389, 1346, 1271, 1224, 1194, 1164, 1109, 1047, 1024, 949, 884, 813, 777, 658 cm ⁻¹	

2. stopnja: sinteza spojine 2



Slika 8: Reakcijska shema sinteze spojine 2

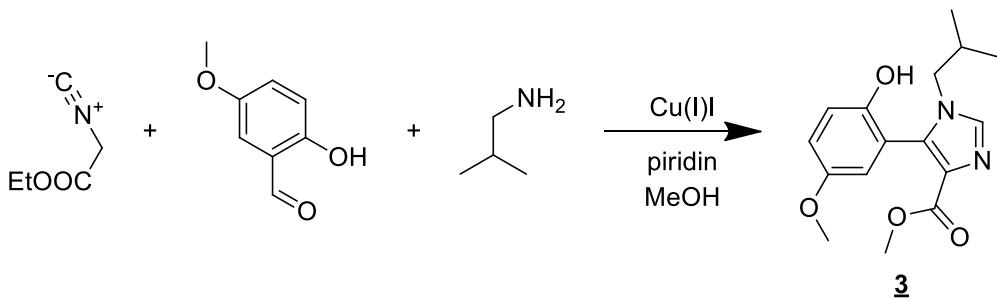
Metil 5-(5-fluoro-2-hidroksifenil)-1-izobutil-1H-imidazol-4-karboksilat (spojava **1**; 0,680 g; 2,33 mmol) smo raztopili v 70 % vodni raztopini H₂SO₄. Zmes smo nato pustili mešati tri ure pri temperaturi 80 °C. Ker smo s spremljanjem reakcije s tankoplastno kromatografijo ocenili, da reakcija še ni potekla v celoti, smo še 3 ure nadaljevali z mešanjem pri temperaturi 50 °C in potem še pri sobni temperaturi čez noč. Raztopino smo nevtralizirali najprej s približno 200 ml nasičene raztopine NaHCO₃, zatem pa s 3 M NaOH uravnali pH vrednost na okoli 10. To zmes smo ekstrahirali s 3 x 400 ml etilacetata. Združene organske faze smo sprali s 400 ml nasičene raztopine NaCl, sušili z brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali in uparili topilo. Surov preostanek smo analizirali z NMR in TPK, pri čemer smo ugotovili, da reakcija še vedno ni potekla do konca (razmerje med izhodno in končno spojino je bilo okoli 3:2 v korist produkta prve stopnje), zato smo preostanek raztopili v minimalnem volumnu 70 % vodne raztopine H₂SO₄ ter zmes pustili mešati čez noč pri 50 °C. Vodno fazo smo ekstrahirali s 3 x 80 ml etilacetata. Združene organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl, sušili z brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali in uparili topilo. Surov produkt smo nato čistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: diklorometan/metanol = 100/1), pri čemer smo izolirali bele kristale produkta.

IUPAC ime	8-fluoro-1-izobutilkromeno[3,4-d]imidazol-4(1H)-on (2)
M _r	260,26

Izgled	Beli kristali
Izkoristek reakcije	2,8 %
Rf	0,59 (MF: DKM/MeOH = 9/1)
T _{tal}	178 °C
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) 1,03 (d, J = 6,8 Hz, 6H, 2 x CH ₃); 2,13-2,27 (m, 1H, CH); 4,21 (d, J = 7,2 Hz, 2H, CH ₂); 7,17 (ddd, J = 9,1; 7,8; 2,9 Hz, 1H, Ar-H); 7,35 (dd, J = 8,9; 2,8 Hz, 1H, Ar-H); 7,39 (dd, J = 9,1; 4,7 Hz, 1H, Ar-H); 7,41 (s, 1H, imidazol-H)
¹³ C-NMR (100 MHZ, CDCl ₃)	δ (ppm) 19,5; 29,0; 54,5; 106,9 (d, J _{C,F} = 26,3 Hz); 113,6 (d, J _{C,F} = 8,8 Hz); 116,7 (d, J _{C,F} = 24,1 Hz); 119,6 (d, J _{C,F} = 8,8 Hz); 127,8; 133,9; 143,9; 148,1 (d, J _{C,F} = 2,2 Hz); 156,2; 158,5 (d, J _{C,F} = 243,6)
HPLC Rt	10,974 min (98,8 % čistost)
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₄ H ₁₃ FN ₂ O ₂ 261,1039 [M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z) 261,1033
IR (ATR)	3058, 2959, 1728, 1590, 1528, 1472, 1422, 1397, 1293, 1264, 1184, 1136, 1104, 1088, 1012, 865, 838, 778, 699, 646, 624 cm ⁻¹

2. Sinteza spojine 4

1. stopnja: sinteza spojine 3

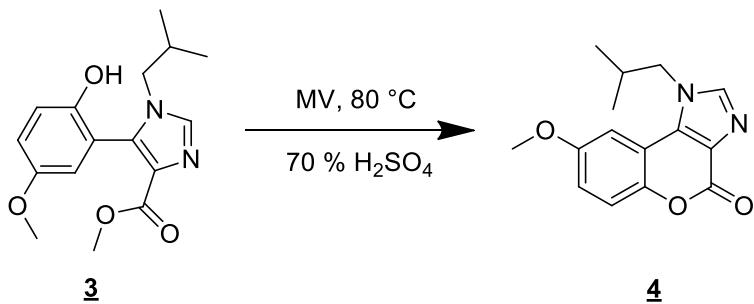


Slika 9: Reakcijska shema sinteze spojine 3

Raztopini etil 2-izocianoacetata (0,7695 ml; 7,00 mmol), izobutilamina (0,696 ml; 7,00 mmol) in 2-hidroksi-5-metoksibenzaldehida (0,874 ml; 7,00 mmol) v metanolu (27 ml) smo pri sobni temperaturi dodali piridin (0,564 ml; 7,00 mmol) ter bakrov (I) jodid (0,133 g; 0,700 mmol). Reakcijsko zmes smo nato segrevali 20 ur pri temperaturi 50 °C. Po pretečenem času smo reakcijski zmesi uparili topilo pod znižanim tlakom. Preostanek smo čistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: diklorometan/metanol = 50/1).

IUPAC ime	Metil 5-(2-hidroksi-5-metoksifenil)-1-izobutil-1<i>H</i>-imidazol-4-karboksilat (3)
M _r	304,34
Izgled	Rjava oljnata tekočina
Izkoristek reakcije	41,3 %
Rf	0,42 (MF: DKM/MeOH = 9/1)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) 0,71 (s, 6H, 2 x CH ₃); 1,68-1,80 (m, 1H, CH); 3,58-3,83 (m, 8H, CH ₂ + 2 x OCH ₃); 6,64-6,70 (m, 1H, Ar-H); 6,85-6,91 (m, 1H, Ar-H); 6,99-7,10 (m, 1H, Ar-H); 7,57 (rs, 1H, imidazol-H); 8,11 (rs, 1H, OH)
¹³ C-NMR (100 MHZ, CDCl ₃)	δ (ppm) 19,8; 29,4; 51,9; 53,3; 55,8; 116,3; 116,9; 117,2; 119,4; 130,4; 135,1; 138,2; 149,0; 153,1; 164,2
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₆ H ₂₀ N ₂ O ₄ 305,1501 [M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z) 305,1515
IR (ATR)	2957, 1712, 1560, 1504, 1427, 1357, 1277, 1194, 1164, 1111, 1023, 947, 912, 873, 812, 777, 727, 659 cm ⁻¹

2. stopnja: sinteza spojine **4**



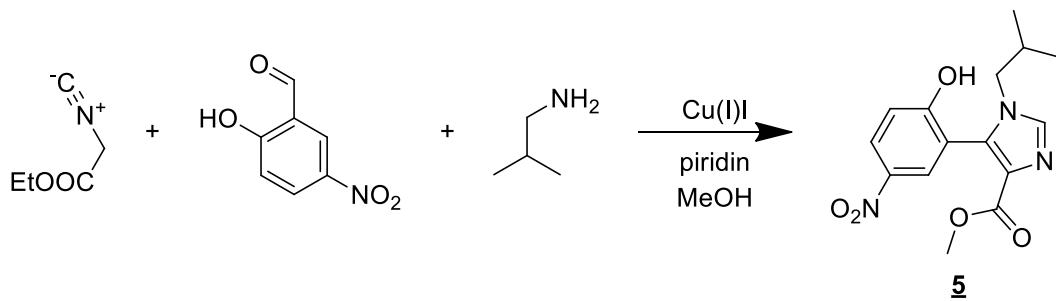
Slika 10: Reakcijska shema sinteze spojine **4**

Metil 5-(2-hidroksi-5-metoksifenil)-1-izobutil-1*H*-imidazol-4-karboksilatu (spojina **3**; 0,243 g; 0,798 mmol) smo dodali 3 ml 70 % vodne raztopine H₂SO₄ in zmes 15 min segrevali v mikrovalovnem reaktorju pri 80 °C (začetna moč 50 W). Reakcijsko zmes smo s 3 M NaOH naalkalili do pH vrednosti okoli 2, pri čemer so iz raztopine začeli izpadati kristali, ki smo jih izolirali s filtracijo z odsesavanjem. Surov produkt smo še dodatno čistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: diklorometan/metanol = 50/1).

IUPAC ime	1-izobutil-8-metoksikromeno[3,4-d]imidazol-4(1H)-on (4)
M _r	272,30
Izgled	Beli kristali
Izkoristek reakcije	43,6 %
Rf	0,26 (MF: DKM/MeOH = 20/1)
T _{tal}	191 - 192 °C
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) 1,07 (d, J = 6,4 Hz, 6H, 2 x CH ₃); 2,23-2,33 (m, 1H, CH); 3,90 (s, 3H, OCH ₃); 4,21 (d, J = 7,2 Hz, 2H, CH ₂); 7,06 (dd, J = 9,0; 2,4 Hz, 1H, Ar-H); 7,16 (d, J = 2,8 Hz, 1H, Ar-H); 7,40 (d, J = 9,0 Hz, 1H, Ar-H); 7,81 (rs, 1H, imidazol-H)
¹³ C-NMR (100 MHZ, CDCl ₃)	δ (ppm) 19,8; 29,2; 55,0; 55,8; 105,2; 115,7; 119,2; 126,2; 128,2; 130,8; 134,0; 144,5; 146,5; 155,3
HPLC Rt	10,760 min (97,8 % čistost)
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₅ H ₁₆ N ₂ O ₃ 273,1239 [M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z) 273,1245
IR (ATR)	3104, 2952, 1725, 1617, 1525, 1465, 1414, 1377, 1304, 1246, 1205, 1125, 1088, 1035, 1003, 950, 895, 833, 778, 649 cm ⁻¹

3. Sinteza spojine 6

1. stopnja: sinteza spojine 5



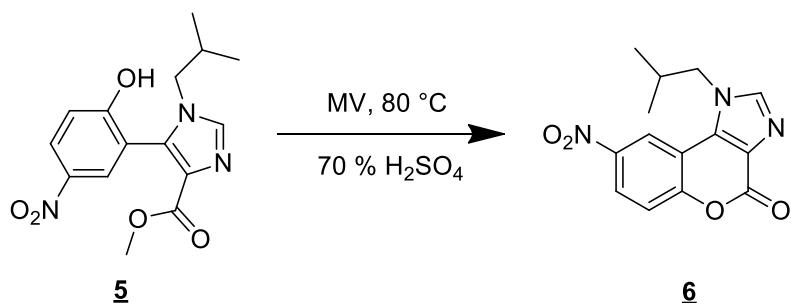
Slika 11: Reakcijska shema sinteze spojine 5

Raztopini *etyl 2-izocianoacetata* (0,874 ml; 8,00 mmol), *izobutilamina* (0,795 ml; 8,00 mmol) in *2-hidroksi-5-nitrobenzaldehyda* (1,34 g; 8,00 mmol) v metanolu (30 ml) smo pri sobni temperaturi dodali *piridin* (0,644 ml; 8,00 mmol) ter *bakov (I) jodid* (0,152 g; 0,800 mmol). Reakcijsko zmes smo nato segrevali 20 ur pri temperaturi 50 °C. Po pretečenem

času smo odfiltrirali oborino in matičnici uparili topilo. Surov produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: diklorometan/metanol = 50/1).

IUPAC ime	Metil 5-(2-hidroksi-5-nitrofenil)-1-izobutil-1<i>H</i>-imidazol-4-karboksilat (5)
M _r	319,31
Izgled	Zeleni kristali
Izkoristek reakcije	32,4 %
Rf	0,41 (MF: DKM/MeOH = 9/1)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) 0,80 (s, 6H, 2 x CH ₃); 1,76-1,89 (m, 1H, CH), 3,56-3,82 (m, 5H, OCH ₃ + CH ₂); 7,14-7,16 (m, 1H, Ar-H); 7,62 (rs, 1H, imidazol-H); 8,13-8,26 (m, 2H, 2 x Ar-H) *1H (Ar-OH) je izmenjan
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₅ H ₁₇ N ₃ O ₅ 320,1246 [M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z) 320,1242
IR (ATR)	2957, 2360, 1690, 1593, 1496, 1441, 1335, 1295, 1228, 1170, 1101, 1025, 882, 830, 752, 721, 636 cm ⁻¹

2. stopnja: sinteza spojine **6**



Slika 12: Reakcijska shema sinteze spojine **6**

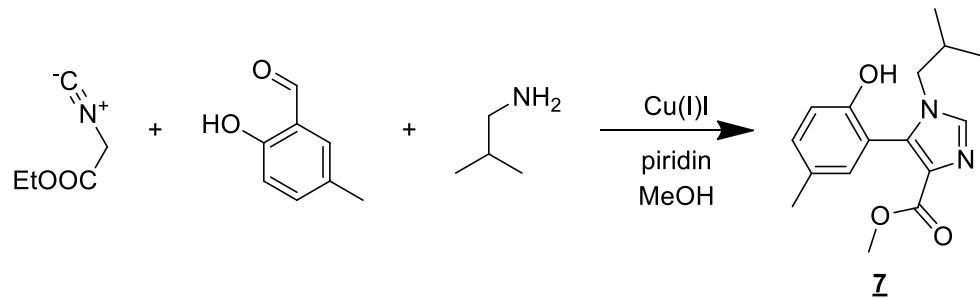
Metil 5-(2-hidroksi-5-nitrofenil)-1-izobutil-1*H*-imidazol-4-karboksilatu (spojava **5**; 0,484 g; 1,52 mmol) smo dodali 4 ml 70 % vodne raztopine H₂SO₄ in zmes segrevali v mikrovalovnem reaktorju 20 min pri 80 °C (začetna moč 50 W). Ker smo s pomočjo tankoplastne kromatografije ocenili, da reakcija še ni potekla do konca, smo zmes še dvakrat vstavili v mikrovalovni reaktor (za 30 in 15 min, pri enakih pogojih). Reakcijsko zmes smo nato z 1 M NaOH naalkalili do pH vrednosti okoli 2 in jo ekstrahirali s 3 x 60 ml

etilacetata. Združene organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl in sušili z brezvodnim Na₂SO₄. Po filtriranju smo matičnici uparili topilo in surov produkt čistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: diklorometan/metanol = 50/1).

IUPAC ime	1-izobutil-8-nitrokromeno[3,4-d]imidazol-4(1H)-on (6)
M _r	287,27
Izgled	Rumeni kristali
Izkoristek reakcije	4,1 %
Rf	0,57 (MF: DKM/MeOH = 20/1)
T _{tal}	212 - 214 °C
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) 1,15 (d, J = 6,4 Hz, 6H, 2 x CH ₃); 2,23-2,34 (m, 1H, CH); 4,31 (d, J = 7,2 Hz, 2H, CH ₂); 7,66 (d, J = 9,2 Hz, 1H, Ar-H); 7,88 (s, 1H, imidazol-H); 8,41 (dd, J = 9,0; 2,8 Hz, 1H, Ar-H); 8,69 (d, J = 3,2 Hz, 1H, Ar-H)
¹³ C-NMR (100 MHZ, CDCl ₃)	δ (ppm) 19,8; 29,4; 55,1; 113,6; 117,0; 119,4; 124,5; 128,5; 133,5; 143,8; 144,5; 155,2; 155,7
HPLC Rt	11,513 min (96,5 % čistost)
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O ₄ 288,0984 [M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z) 288,0980
IR (ATR)	3123, 2961, 1748, 1596, 1517, 1470, 1343, 1325, 1290, 1257, 1217, 1129, 1076, 1034, 989, 913, 888, 837, 774, 744, 692, 646 cm ⁻¹

4. Sinteza spojine 8

1. stopnja: sinteza spojine 7

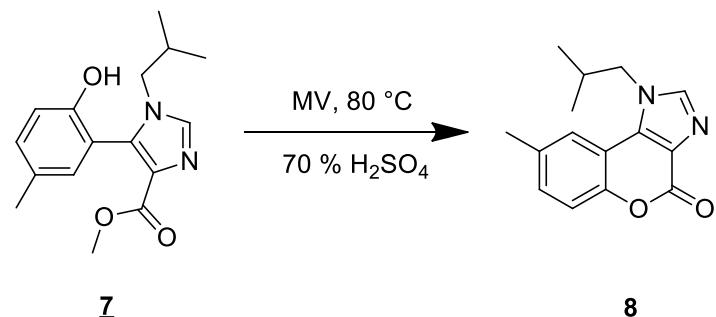


Slika 13: Reakcijska shema sinteze spojine 7

Raztopini etil 2-izocianoacetata (0,546 ml; 5,00 mmol), izobutilamina (0,497 ml; 5,00 mmol) in 2-hidroksi-5-metilbenzaldehyda (0,680 g; 5,00 mmol) v metanolu (20 ml) smo pri sobni temperaturi dodali piridin (0,403 ml; 5,00 mmol) ter bakrov (*I*) jodid (0,095 g; 0,500 mmol). Reakcijsko zmes smo nato segrevali 20 ur pri temperaturi 50 °C. Po pretečenem času smo uparili topilo in surov produkt čistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: diklorometan/metanol = 25/1).

IUPAC ime	Metil 5-(2-hidroksi-5-metilfenil)-1-izobutil-1<i>H</i>-imidazol-4-karboksilat (7)
M _r	288,34
Izgled	Zeleno-rjavi kristali
Izkoristek reakcije	51,3 %
Rf	0,68 (MF: DKM/MeOH = 9/1)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) 0,72 (s, 6H, 2 x CH ₃); 1,67-1,82 (m, 1H, CH), 2,30 (s, 3H, Ar-CH ₃); 3,57-3,98 (m, 5H, OCH ₃ + CH ₂); 6,85-6,96 (m, 1H, Ar-H); 6,99-7,07 (m, 1H, Ar-H); 7,09-7,18 (m, 1H, Ar-H); 7,61 (rs, 1H, imidazol-H); 8,30 (rs, 1H, OH)
¹³ C-NMR (100 MHZ, CDCl ₃)	δ (ppm) 19,8; 20,5; 29,2; 50,3; 51,6; 115,9; 117,3; 128,9; 129,9; 131,8; 132,0; 136,1; 137,8; 152,9; 163,9
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₆ H ₂₀ N ₂ O ₃ 289,1552 [M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z) 289,1554
IR (ATR)	3119, 2962, 1707, 1508, 1440, 1364, 1287, 1263, 1236, 1195, 1164, 1120, 1028, 949, 867, 828, 814, 776, 671 cm ⁻¹

2. stopnja: sinteza spojine 8



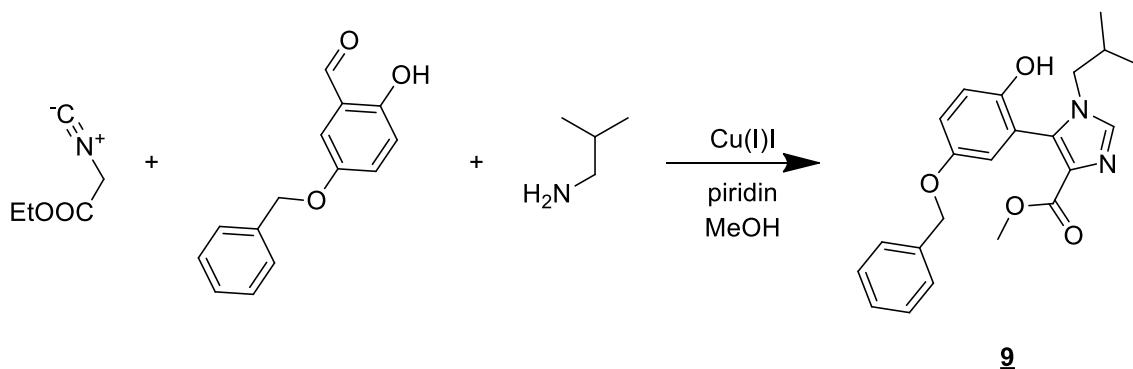
Slika 14: Reakcijska shema sinteze spojine 8

Metil 5-(2-hidroksi-5-metilfenil)-1-izobutil-1H-imidazol-4-karboksilatu (spojina **7**; 0,246 g; 0,853 mmol) smo dodali 3 ml 70 % vodne raztopine H₂SO₄ in zmes segrevali v mikrovalovnem reaktorju 15 min pri 80 °C (začetna moč 50 W). Reakcijsko zmes smo nato z 1 M NaOH naalkalili do pH vrednosti okoli 2 in jo ekstrahirali s 3 x 60 ml etilacetata. Združene organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl in sušili z brezvodnim Na₂SO₄. Po filtriranju smo matičnici uparili topilo in surov produkt čistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: diklorometan/metanol = 25/1).

IUPAC ime	1-izobutil-8-metilkromeno[3,4-d]imidazol-4(1H)-on (8)
M _r	256,30
Izgled	Beli kristali
Izkoristek reakcije	56,7 %
Rf	0,60 (MF: DKM/MeOH = 9/1)
T _{tal}	185 - 186 °C
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) 1,07 (d, J = 6,4 Hz, 6H, 2 x CH ₃); 2,21-2,32 (m, 1H, CH); 2,48 (s, 3H, Ar-CH ₃); 4,21 (d, J = 7,6 Hz, 2H, CH ₂); 7,30 (d, J = 8,4 Hz, 1H, Ar-H); 7,36 (d, J = 8,4 Hz, 1H, Ar-H); 7,48 (s, 1H, Ar-H); 7,73 (s, 1H, imidazol-H)
¹³ C-NMR (100 MHZ, CDCl ₃)	δ (ppm) 19,7; 21,3; 54,8; 112,9; 118,0; 120,7; 127,7; 130,5; 133,9; 134,8; 143,3; 150,3; 157,0
HPLC Rt	11,770 min (96,5 % čistost)
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₅ H ₁₆ N ₂ O ₂ 257,1290 [M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z) 257,1295
IR (ATR)	3101, 2963, 2953, 2872, 1727, 1524, 1464, 1375, 1305, 1274, 1212, 1186, 1141, 1087, 1042, 1013, 821, 778, 648 cm ⁻¹

5. Sinteza spojine 10

1. stopnja: sinteza spojine 9

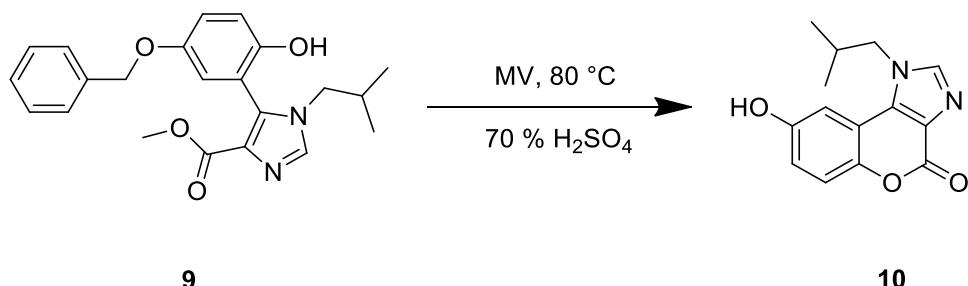


Slika 15: Reakcijska shema sinteze spojine 9

Raztopini *etil 2-izocianoacetata* (0,874 ml; 8,00 mmol), *izobutilamina* (0,795 ml; 8,00 mmol) in *4-benziloksi-2-hidroksibenzoaldehida* (1,83 g; 8,00 mmol) v metanolu (30 ml) smo pri sobni temperaturi dodali *piridin* (0,644 ml; 8,00 mmol) ter *bakov (I) jodid* (0,152 g; 0,800 mmol). Reakcijsko zmes smo nato segrevali 20 ur pri temperaturi 50 °C. Po pretečenem času smo iz reakcijske zmesi s filtracijo z odsesavanjem izolirali produkt.

IUPAC ime	Metil 5-(5-(benziloksi)-2-hidroksifenil)-1-izobutil-1H-imidazol-4-karboksilat (<u>9</u>)
M _r	380,44
Izgled	Zeleno-rjavi kristali
Izkoristek reakcije	41,9 %
Rf	0,57 (MF: DKM/MeOH = 9/1)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) 0,75 (s, 6H, 2 x CH ₃); 1,57-1,63 (m, 1H, CH), 3,59-3,78 (m, 2H, CH ₂); 3,80-3,95 (m, 3H, OCH ₃); 6,69 (d, J = 7,6 Hz; 1H, Ar-H); 6,75-6,85 (m, 1H, Ar-H); 6,99-7,08 (m, 1H, Ar-H); 7,42-7,51 (m, 6H, 5 x Ar-H + imidazol-H); 7,55 (rs, 1H, OH)
ESI-HRMS	Izračunano za C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₄ 381,1814 [M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z) 381,1803
IR (ATR)	2956, 2873, 1702, 1619, 1594, 1560, 1512, 1429, 1367, 1316, 1262, 1219, 1184, 1165, 1112, 1019, 1001, 977, 768, 741, 699, 656 cm ⁻¹

2. stopnja: sinteza spojine **10**



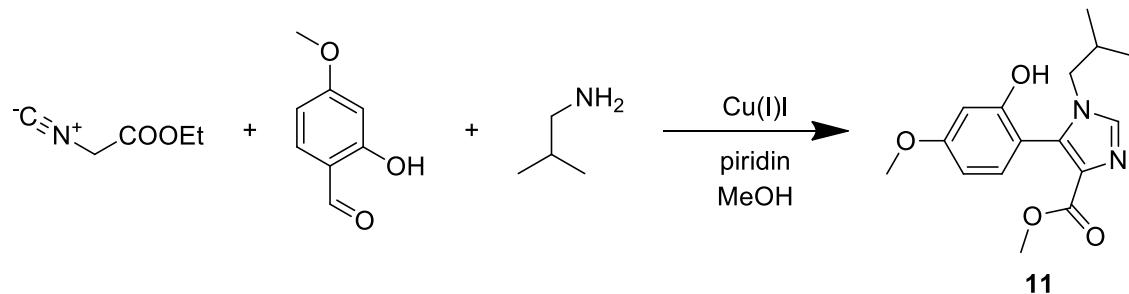
Slika 16: Reakcijska shema sinteze spojine **10**

Metil 5-(5-(benziloksi)-2-hidroksifenil)-1-izobutil-1H-imidazol-4-karboksilatu (spojava **9**; 0,135 g; 0,355 mmol) smo dodali 1,2 ml 70 % vodne raztopine H₂SO₄ in zmes segrevali v mikrovalovnem reaktorju 30 min pri 80 °C (začetna moč 50 W). Reakcijsko zmes smo nato z 1 M NaOH naalkalili do pH vrednosti okoli 2 in jo ekstrahirali s 3 x 30 ml etilacetata. Združene organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl in sušili z brezvodnim Na₂SO₄. Po filtriranju smo matičnici uparili topilo in surov produkt čistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: diklorometan/metanol = 25/1).

IUPAC ime	8-hidroksi-1-izobutilkromeno[3,4-d]imidazol-4(1H)-on (10)
M _r	258,27
Izgled	Beli kristali
Izkoristek reakcije	9,0 %
Rf	0,15 (MF: DKM/MeOH = 20/1)
T _{tal}	184 - 187 °C
¹ H-NMR (400 MHz, (CD ₃) ₂ CO)	δ (ppm) 1,03 (d, J = 6,8 Hz, 6H, 2 x CH ₃); 2,20-2,34 (m, 1H, CH); 4,40 (d, J = 7,6 Hz, 2H, CH ₂); 6,92 (d, J = 2,4 Hz, 1H, Ar-H); 6,96 (dd, J = 8,8; 2,4 Hz, 1H, Ar-H); 7,87 (d, J = 8,4 Hz, 1H, Ar-H); 7,97 (s, 1H, imidazol-H); 9,39 (rs, 1H, Ar-OH)
¹³ C-NMR (100 MHZ, CDCl ₃)	δ (ppm) 19,8; 29,7; 54,6; 104,6; 106,6; 113,6; 123,9; 126,2; 136,7; 144,4; 154,9; 157,1; 159,9
HPLC Rt	7,923 min (96,5 % čistost)
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₃ 259,1083 [M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z) 259,1090
IR (ATR)	2954, 2873, 2364, 1728, 1622, 1584, 1522, 1497, 1407, 1375, 1299, 1241, 1160, 1085, 1001, 828, 768, 734, 644 cm ⁻¹

6. Sinteza spojine 12

1. stopnja: sinteza spojine 11

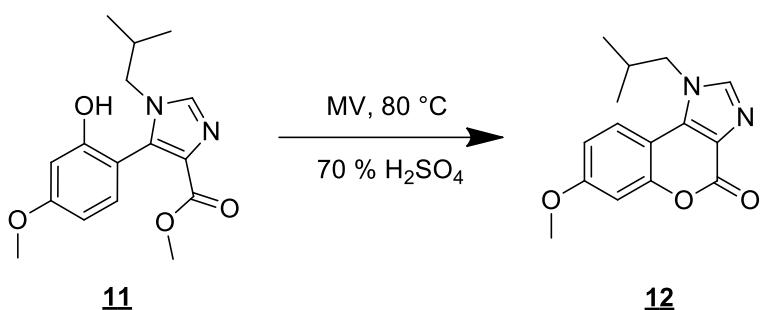


Slika 17: Reakcijska shema sinteze spojine **11**

Raztopini *etyl 2-izocianoacetata* (0,546 ml; 5,00 mmol), *izobutilamina* (0,497 ml; 5,00 mmol) in *2-hidroksi-4-metoksibenzaldehida* (0,761 g; 5,00 mmol) v metanolu (20 ml) smo pri sobni temperaturi dodali *piridin* (0,403 ml; 5,00 mmol) ter *bakov (I) jodid* (0,095 g; 0,500 mmol). Reakcijsko zmes smo nato segrevali 20 ur pri temperaturi 50 °C. Po pretečenem času smo reakcijski zmesi uparili topilo in surov produkt čistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: diklorometan/metanol = 20/1).

IUPAC ime	Metil 5-(2-hidroksi-4-metoksifenil)-1-izobutil-1H-imidazol-4-karboksilat (11)
M _r	304,34
Izgled	Zelena oljnata tekočina
Izkoristek reakcije	21,2 %
Rf	0,47 (MF: DKM/MeOH = 9/1)
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) 0,72 (m, 6H, 2 x CH ₃); 1,70-1,80 (m, 1H, CH); 3,62-3,72 (m, 5H, CH ₂ + OCH ₃); 3,80 (s, 3H, Ar-O-CH ₃); 6,54 (dd, <i>J</i> = 8,4; 2,4 Hz, 1H, Ar-H); 6,68 (d, <i>J</i> = 2,4 Hz, 1H, Ar-H); 7,04 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H, Ar-H); 7,49 (s, 1H, imidazol-H); 8,80 (rs, 1H, OH)
¹³ C-NMR (100 MHZ, CDCl ₃)	δ (ppm) 19,7; 29,2; 51,7; 53,3; 55,3; 102,7; 106,4; 107,8; 129,0; 132,6; 136,0; 137,8; 156,6; 162,1; 163,4
ESI-HRMS	Izračunano za C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₄ 305,1407 [M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z) 305,1411
IR (ATR)	2957, 2364, 1712, 1619, 1592, 1509, 1434, 1368, 1294, 1198, 1163, 1109, 1048, 1008, 960, 815, 790, 727 cm ⁻¹

2. stopnja: sinteza spojine 12



Slika 18: Reakcijska shema sinteze spojine 12

*Metil 5-(2-hidroksi-4-metoksifenil)-1-izobutil-1*H*-imidazol-4-karboksilatu* (spojina **11**; 0,195 g; 0,641 mmol) smo dodali 3 ml 70 % vodne raztopine H₂SO₄ in zmes segrevali v mikrovalovnem reaktorju 15 min pri 80 °C (začetna moč 50 W). Reakcijsko zmes smo nato z 1 M NaOH naalkalili do pH vrednosti okoli 2 in jo ekstrahirali s 3 x 80 ml etilacetata. Združene organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl in sušili z brezvodnim Na₂SO₄. Po filtriranju smo matičnici uparili topilo in surov produkt čistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: diklorometan/metanol = 50/1).

IUPAC ime	1-izobutil-7-metoksikromeno[3,4-d]imidazol-4(1<i>H</i>)-on (12)
M _r	272,30
Izgled	Beli kristali
Izkoristek reakcije	56,7 %
Rf	0,58 (MF: DKM/MeOH = 9/1)
T _{tal}	198 – 200 °C
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) 1,04 (d, J = 6,4 Hz, 6H, 2 x CH ₃); 2,17-2,27 (m, 1H, CH); 3,88 (s, 3H, OCH ₃); 4,16 (d, J = 7,6 Hz, 2H, CH ₂); 6,89-6,99 (m, 2H, 2 x Ar-H); 7,59 (d, J = 9,2 Hz, 1H, Ar-H); 7,67 (s, 1H, imidazol-H)
¹³ C-NMR (100 MHZ, CDCl ₃)	δ (ppm) 19,6; 28,9; 54,5; 55,6; 102,3; 106,2; 112,3; 121,6; 125,6; 135,4; 142,8; 153,8; 156,9; 160,7
HPLC Rt	10,901 min (98,8 % čistost)
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₃ 273,1203 [M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z) 273,1209

IR (ATR)	3104, 2967, 1727, 1614, 1556, 1492, 1442, 1374, 1278, 1249, 1220, 1196, 1166, 1080, 1044, 987, 952, 877, 806, 772, 647, 613 cm ⁻¹
----------	---

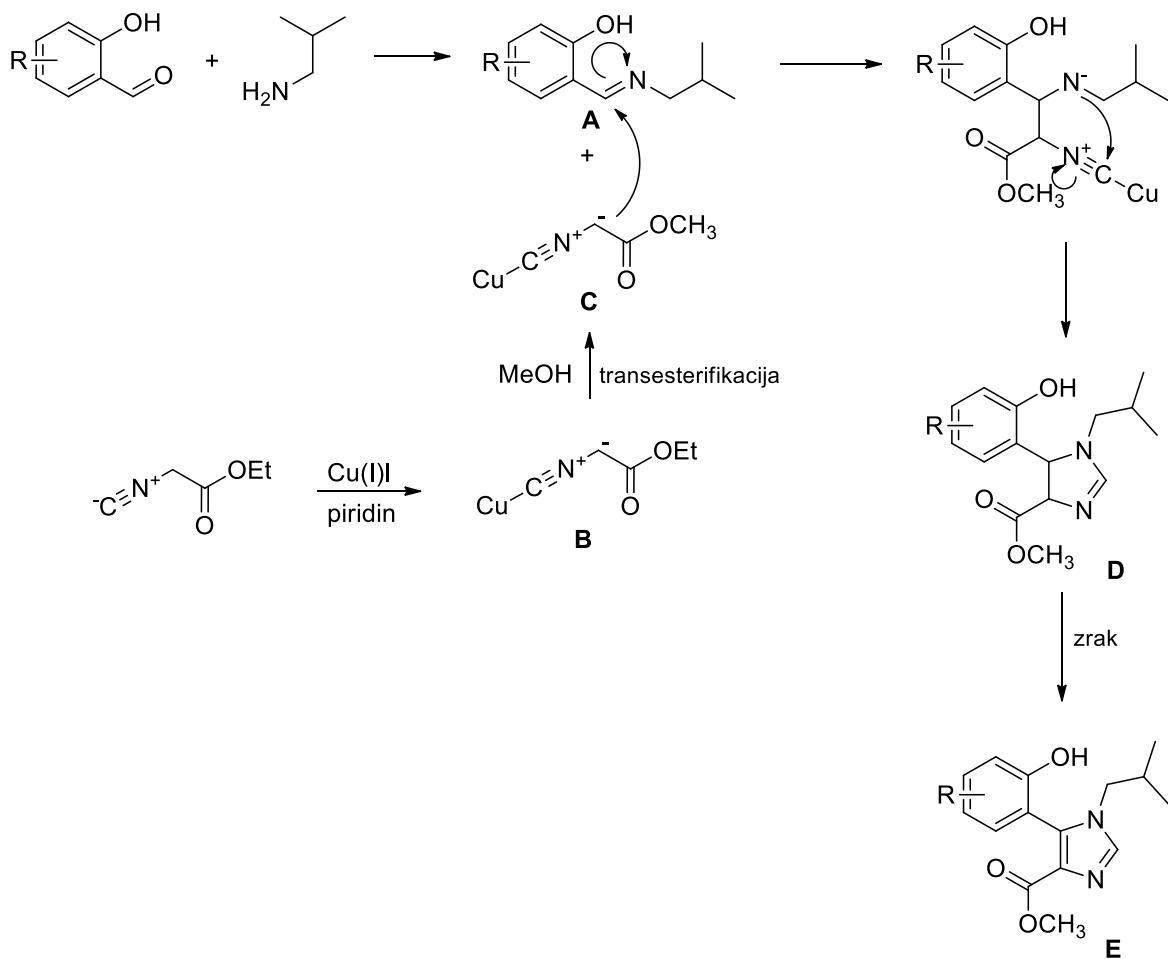
REZULTATI IN RAZPRAVA

1. Kemijska sinteza

Za sintezo derivatov 1-izobutilkromeno[3,4-*d*]imidazol-4(*IH*)-ona smo uporabili dvostopenjski sintezni postopek (35), pri čemer smo v prvi stopnji iz etil 2-izocianoacetata, izobutilamina in derivata 2-hidroksibenzaldehida z dodatkom piridina in bakrovega (I) jodida kot katalizatorja z multikomponentno reakcijo pripravili imidazolske derivate. V drugi stopnji smo s kislinsko katalizirano transesterifikacijo izvedli ciklizacijo do končnih spojin.

V prvi stopnji smo izvedli tako imenovano multikomponentno reakcijo, kar pomeni, da v reakciji naenkrat vstopajo vsaj trije reagenti, ki skupaj tvorijo en produkt. Tak tip reakcij je zelo zaželen v farmacevtski industriji, tako v fazi razvoja, kjer omogoča hitro in enostavno sintezo derivatov in s tem hitrejšo optimizacijo, kot tudi v sami proizvodnji, saj je v tem primeru sintezni postopek običajno krajši in cenejši poleg tega se ob tem upošteva tudi načela »zelene kemije«, saj je poraba (organskih) topil običajno manjša (432, 43).

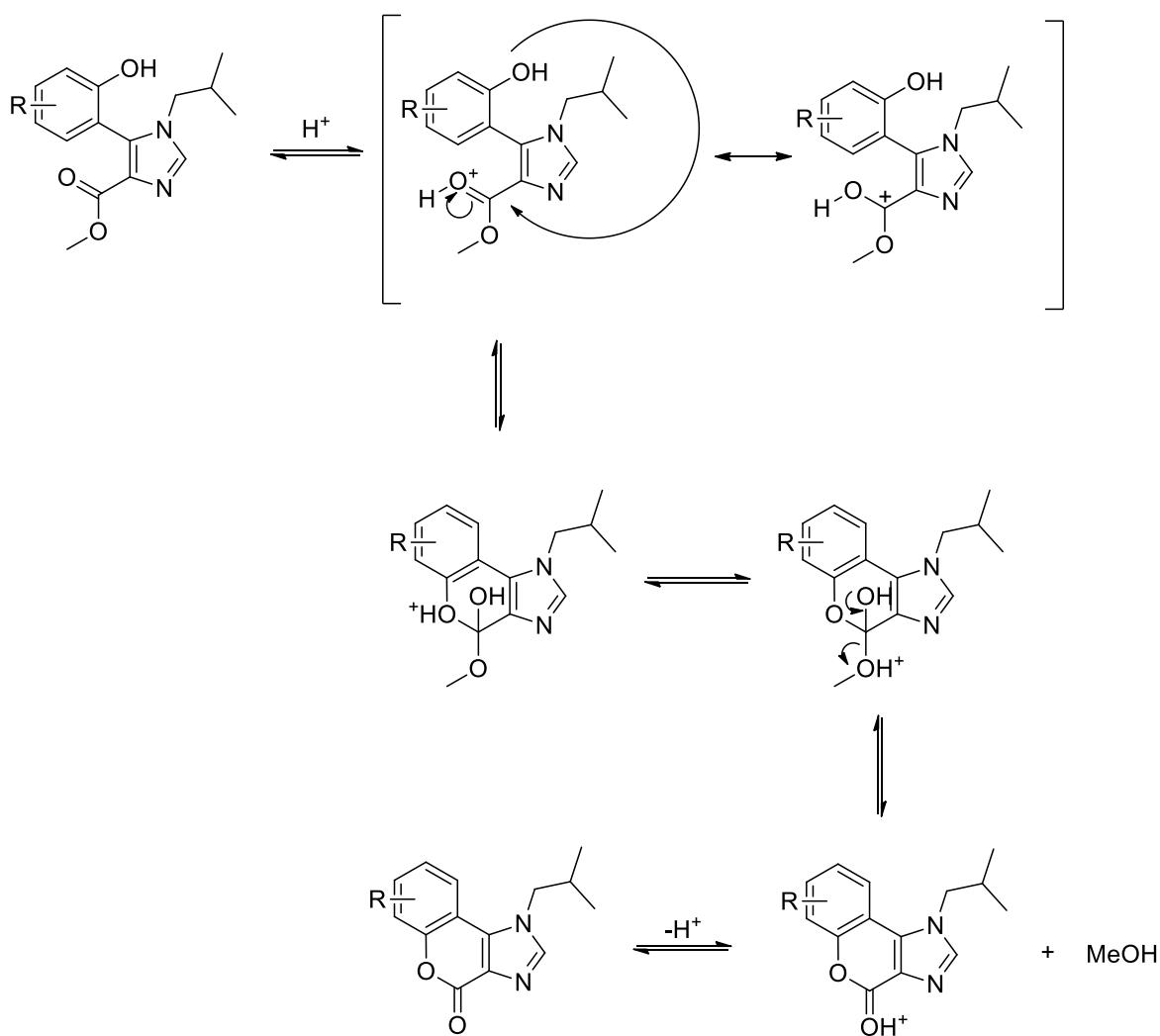
V našem primeru smo izhajali iz treh izhodnih reagentov, in sicer etil 2-izocianoacetata, izobutilamina in derivata 2-hidroksibenzaldehida. Za potek reakcije bila potrebna še baza (piridin) in bakrov (I) jodid kot katalizator. Mehanizem reakcije ni točno znan, predpostavlja se naslednje (shematsko predstavljeno na sliki 19): v prvi fazi se iz salicilaldehida in amina tvori imin (**A**), obenem pa iz etil 2-izocianata ob prisotnosti piridina in Cu(I)I nastane intermedijat **B**, pri čemer v metanolu pride do reakcije transesterifikacije, kar povzroči nastanek metil 2-izocianatnega derivata (**C**), ki kot nukleofil napade elektrofilno mesto na iminu. Temu sledi ciklizacija do imidazolinskega obroča (**D**), ki hitro (ob atmosferskih pogojih) oksidira do imidazola (**E**) (42).



Slika 19: Možen mehanizem nastanka produkta 1. stopnje, povzeto po (42)

Izkoristki reakcij prve stopnje so bili za večino spojin povprečni, od 32,4 do 51,3 %, pri čemer nekoliko izstopa sinteza spojine **11**, kjer je izkoristek le 21,2 %. To lahko pripisemo pozitivnemu resonančnemu efektu *para* metoksi skupine (glezano na aldehid), ki zmanjšuje elektrofilno naravo karbonilnega ogljika in posledično zmanjša tudi njegovo reaktivnost (444).

V drugi stopnji je potekla ciklizacija preko kislinsko katalizirane transesterifikacije. Mehanizem je podoben Fisherjevi sintezi estrov. Dodatek kislinskega katalizatorja (v našem primeru H_2SO_4) poveča elektrofilnost karbonilnega ogljika, katerega napade nukleofilni alkohol, kar ima za posledico nastanek tetraedričnega intermediata. V naslednji stopnji se odcepi alkohol (metanol) in nastane končni produkt. Gonilni sili za potek reakcije sta odstranjevanje nastalega alkohola s povišano temperaturo in nastanek resonančno stabiliziranega produkta. Mehanizem je predstavljen tudi shematsko (slika **20**) (454, 45).



Slika 20: Mehanizem nastanka produkta 2. stopnje, povzeto po (444)

V prvem poskusu sinteze končnega produkta (sinteza spojine **2**) smo uporabili literaturni postopek (35), kjer smo produkt najprej raztopili v 60 ml 70 % H_2SO_4 in nato zmes 2 uri segrevali pri 80 °C. Ker smo s spremljanjem reakcije s tankoplastno kromatografijo in NMR spektroskopijo ugotovili, da reakcija še ni potekla do konca, smo reakcijski čas podaljšali še za približno 24 ur, vendar na nekoliko nižji temperaturi (50 °C). Izkoristek reakcije je bil zelo majhen (2,8 %), pri čemer je treba upoštevati, da je bil del izgub posledica dvakratno izvedene izolacije.

Zaradi omenjenega nizkega izkoristka in časovno dolgotrajnega postopka pri sintezi spojine **2**, smo se pri naslednjih sintezah končnega produkta odločili za optimizacijo postopka z uporabo mikrovalovnega reaktorja. V tem primeru smo produkt prve stopnje suspendirali v 3 – 5 ml 70 % H_2SO_4 in zmes segrevali v mikrovalovnem reaktorju pri temperaturi 80 °C in začetni moči 50 W. Čas reakcije smo nastavili na 15 minut in ga po

potrebi (glede na potek reakcije, spremljano s tankoplastno kromatografijo) podaljšali do največ ene ure. Spremenjeni reakcijski pogoji so se izkazali za uspešne, saj smo močno skrajšali čas sinteze (od 24 ur do manj kot ene ure) in povečali izkoristke reakcij, ki so po našem modificiranem postopku znašali od 4,1 % do 56,7 %. Poleg tega smo tudi povečali samo varnost pri izvajanju reakcije, saj se je močno zmanjšala količina uporabljeni 70 % H_2SO_4 (iz 60 na največ 5 ml).

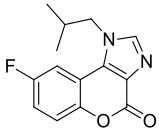
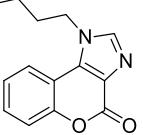
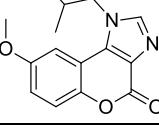
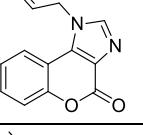
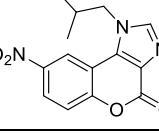
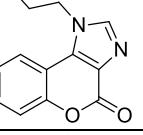
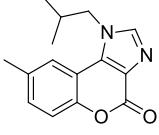
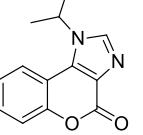
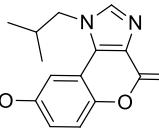
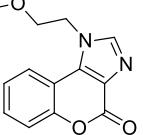
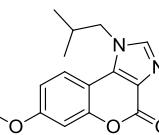
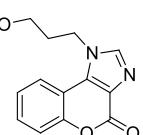
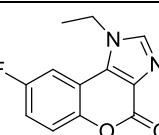
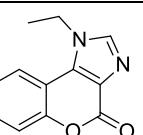
Izkoristki pri drugi stopnji sinteze so se med seboj precej razlikovali. Najnižji je bil izkoristek pri sintezi spojine **2**, kar je posledica uporabe še ne optimiziranega postopka in dvakratno izvedene izolacije. Relativno nizek izkoristek (9,0 %) je bil tudi pri sintezi spojine **10**, kjer vzrok najbrž leži v hkratnem poteku dveh reakcij. Poleg želene ciklizacije je ob prisotnosti vodne raztopine močne kisline prišlo še do hkratne odcepitve benzilne zaščitne skupine.

Na podlagi ostalih izkoristkov reakcij 2. stopnje lahko sklepamo, da je za dober potek reakcije potrebna elektronondonorska skupina. Največji izkoristek (56,7 %) je pri sintezi spojine **8**, kjer je na aromatski obroč vezana metilna skupina s pozitivnim induktivnim efektom. Sledi sinteza spojine **4** (izkoristek 43,6 %), kjer metoksi skupina deluje s pozitivnim resonančnim in negativnim induktivnim efektom. Malo nižji izkoristek (37,9 %) je pri sintezi spojine **12**, kjer zaradi *meta* položaja metoksi skupine glede na hidroksi ni pozitivnega resonančnega efekta, ampak deluje samo z negativnim induktivnim učinkom. Najslabši izkoristek (samo 4,1 %) pa je pri spojini **6**, kjer nitro skupina deluje kot močan elektronakceptor (negativen resonačen in induktiven efekt) (44).

2. Biološko vrednotenje

Delovanje derivatov kromeno[3,4-*d*]imidazol-4-ona na receptor TLR7 smo biološko ovrednotili na celicah komercialno dostopne celične linije HEK-BlueTM hTLR7. Poleg sintetiziranih derivatov z modifikacijo na kromenskem delu smo testirali tudi 8 analogov s spremembami na imidazolskem delu molekule (sintesa teh spojin je opisana v magistrskem delu Tine Čujež (36)). Niz spojin za biološko testiranje je predstavljen v tabeli **II**. Spojinam smo najprej preverili topnost v celičnem gojišču, določili potencialno citotoksično delovanje in naredili preliminarni test agonistične oziroma antagonistične aktivnosti. Najbolj aktivnim spojinam smo nadalje določili še vrednosti EC₅₀.

Tabela II: Niz spojin za biološko testiranje

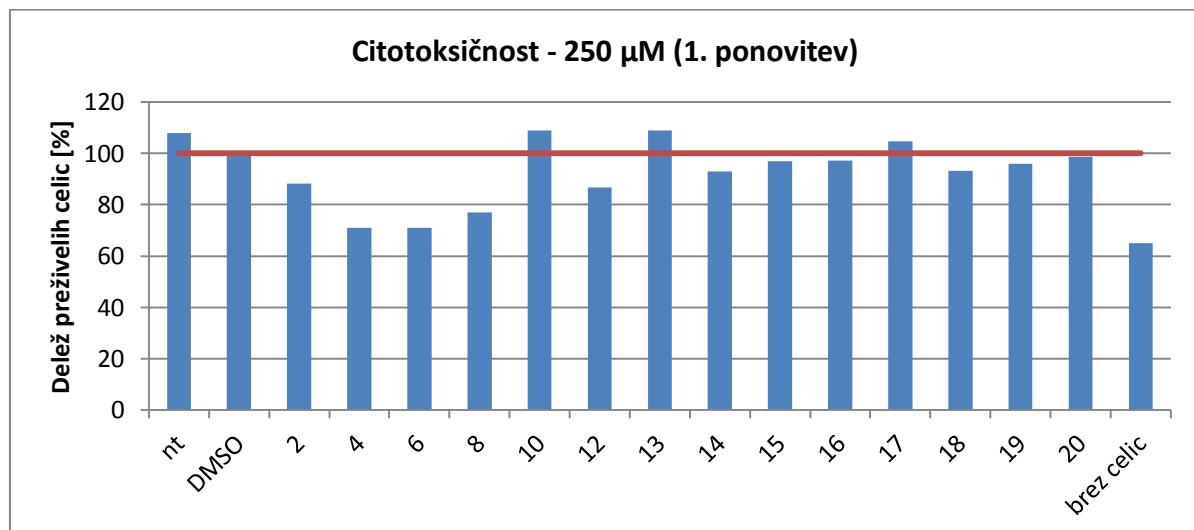
Oznaka spojine	Strukturna formula	Oznaka spojine	Strukturna formula
<u>2</u>		<u>14</u>	
<u>4</u>		<u>15</u>	
<u>6</u>		<u>16</u>	
<u>8</u>		<u>17</u>	
<u>10</u>		<u>18</u>	
<u>12</u>		<u>19</u>	
<u>13</u>		<u>20</u>	

2.1. Topnot

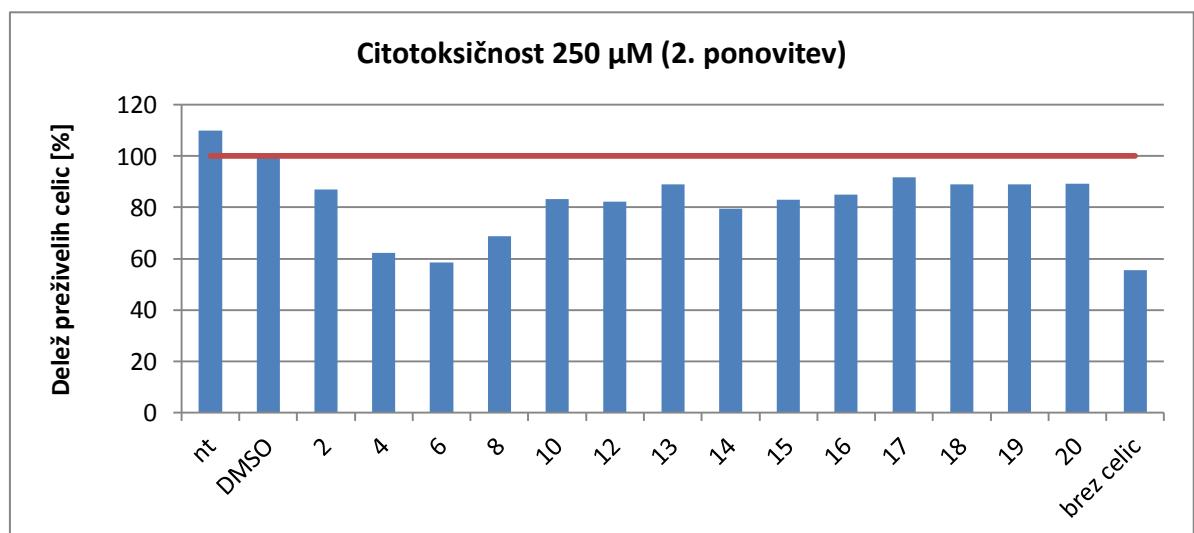
Vseh 14 spojin je bilo popolnoma topnih v celičnem gojišču (ob dodatku DMSO – 1 %) pri koncentraciji 250 μM , kar je pomenilo, da smo lahko nadaljevali s testiranjem z vsemi spojinami.

2.2. Citotoksičnost

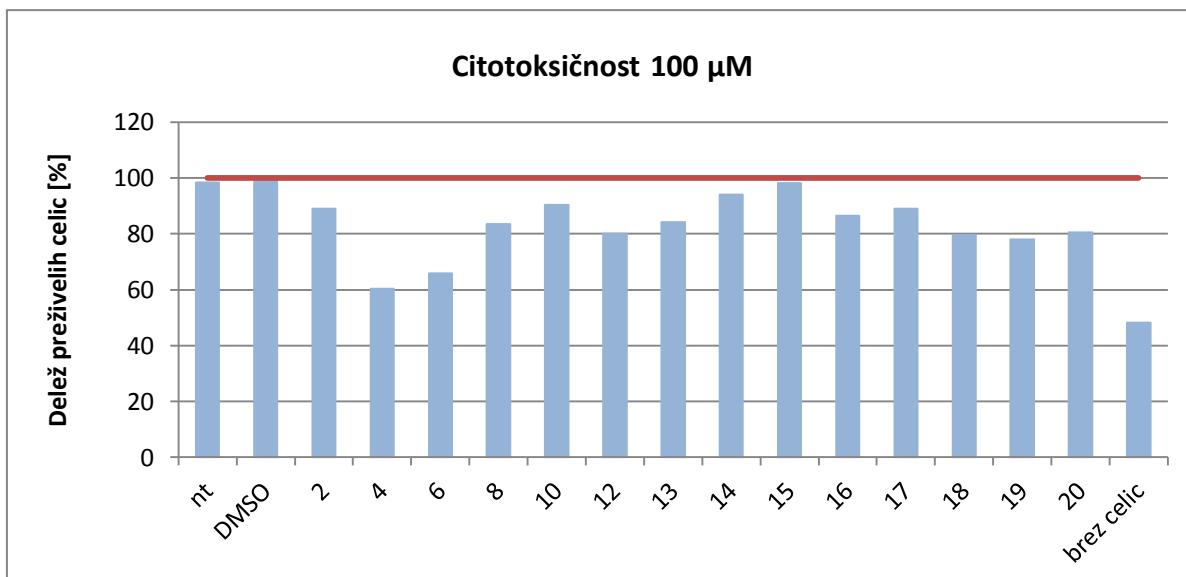
Citotoksičnost smo preverjali s testom MTS pri koncentracijah spojin 100 in 250 μM . Grafični prikaz rezultatov je na slikah 21, 22 in 23, kjer rdeča črta označuje raven slepe določitve (celice ob ustreznem dodatku DMSO).



Slika 21: Prikaz citotoksičnosti spojin (250 μM , 1. ponovitev)



Slika 22: Prikaz citotoksičnosti spojin (250 μM , 2. ponovitev)

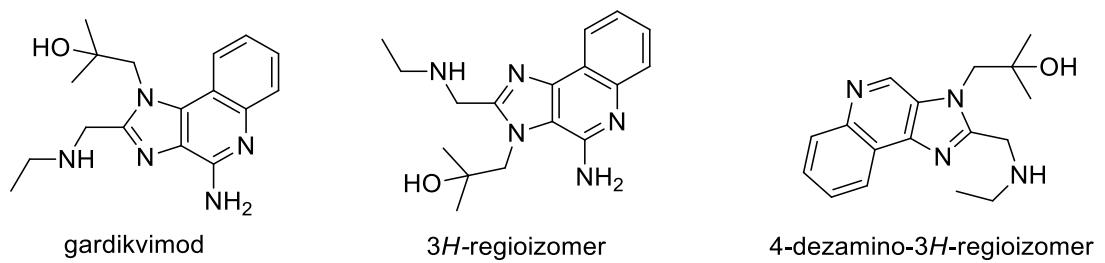


Slika 23: Prikaz citotoksičnosti spojin (100 µM, 1. ponovitev)

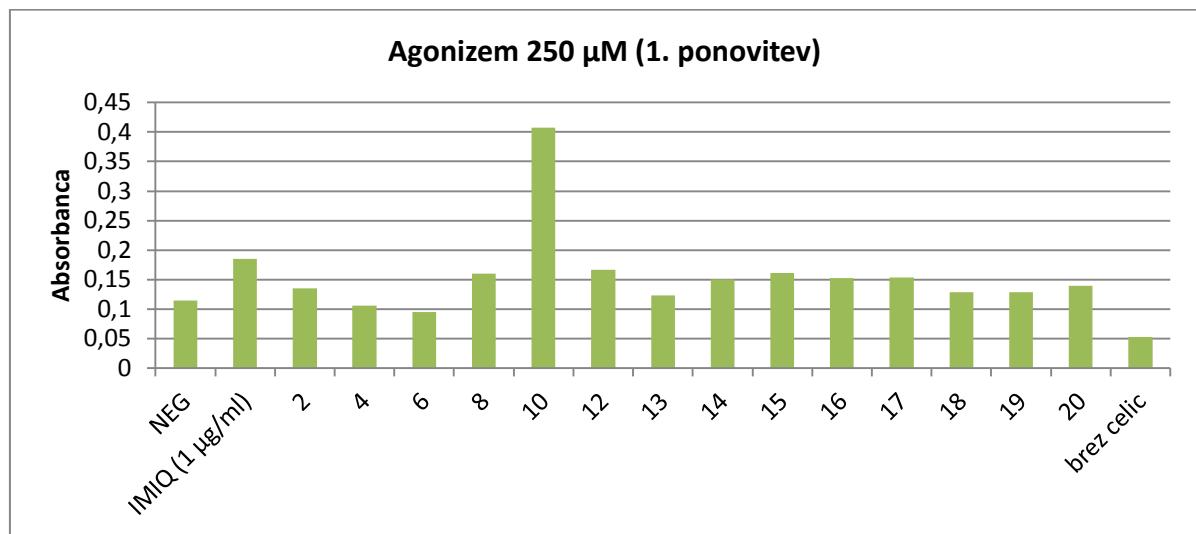
Citotoksičnost smo testirali v dveh ponovitvah, najprej pri koncentraciji spojin 250 µM, nato ponovno pri koncentraciji 250 in 100 µM. Med ponovitvami je sicer opazna manjša razlika med rezultati, ki pa je posledica biološke variabilnosti. Iz podatkov lahko razberemo, da dodatek večine spojin rahlo zavira rast celic (delež preživelih celic je za 10 do 20 odstotkov nižji od slepe določitve). Izjema sta spojini **4** in **6**, ki delujeta citotoksično (delež preživelih celic se giblje med 50 – 70 % glede na slepo določitev). Nekoliko močneje je citotoksično delovanje izraženo tudi pri spojini **8**, vendar samo pri koncentraciji 250 µM, medtem ko je pri nižji koncentraciji spojine delež preživelih celic občutno višji. Kljub temu smo se odločili testiranje nadaljevati z vsemi spojinami, pri čemer smo dobljene rezultate citotoksičnosti upoštevali pri interpretaciji rezultatov.

2.3. Preliminarno testiranje agonistične in antagonistične aktivnosti

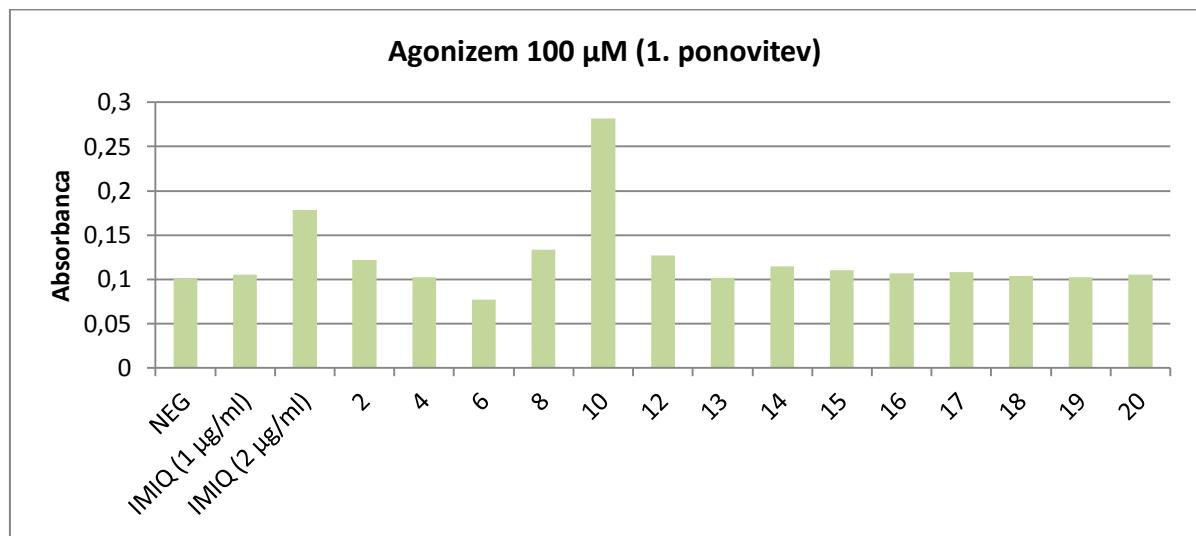
Pogosto se agonist in antagonist vežeta na isto vezavno mesto, način delovanja pa je odvisen od morebitne aktivacije receptorja, na kar vpliva struktura spojine. Razlike med molekulami, ki odločajo o načinu delovanja, so lahko zelo majhne. V primeru receptorja TLR7 so Shukla in sodelavci (46) ugotovili, da na delovanje vpliva že regioizomerija. Gardikvimod je znan agonist ($EC_{50} = 2 \mu M$ (47)), medtem ko njegov 3H-regioizomer te aktivnosti nima oziroma deluje celo rahlo antagonistično. Zanimivo, prekurzor 3H-regioizomera, 4-dezamino-3H-regioizomer, deluje močno antagonistično ($IC_{50} = 7,5 \mu M$). Strukture omenjenih spojin so prikazane na sliki **24**. Zaradi navedenih dejstev smo se odločili testirati tako agonistično kot antagonistično delovanje.



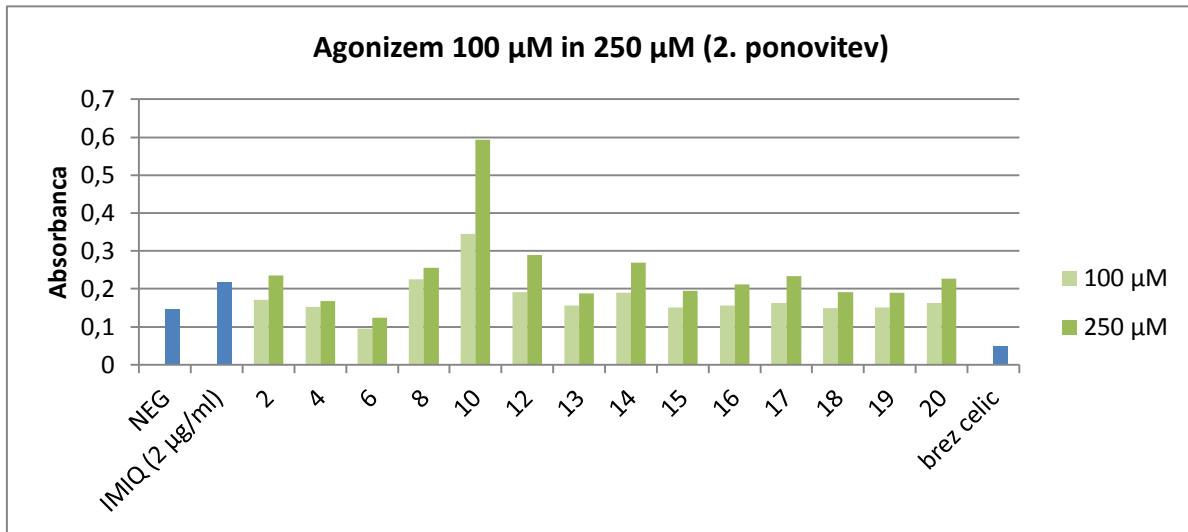
Slika 24: Strukture gardikvima, 3H-regioizomera in 4-dezamino-3H-regioizomera, povzeto po (46)



Slika 25: Preliminarno testiranje agonistične aktivnosti (250 µM, 1. ponovitev)

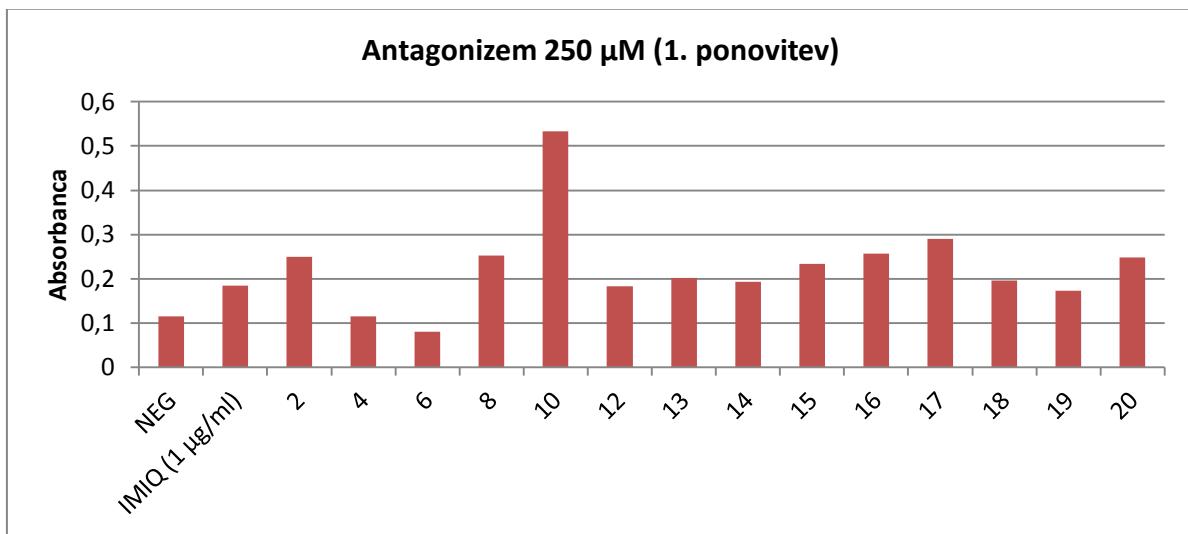


Slika 26: Preliminarno testiranje agonistične aktivnosti (100 µM, 1. ponovitev)

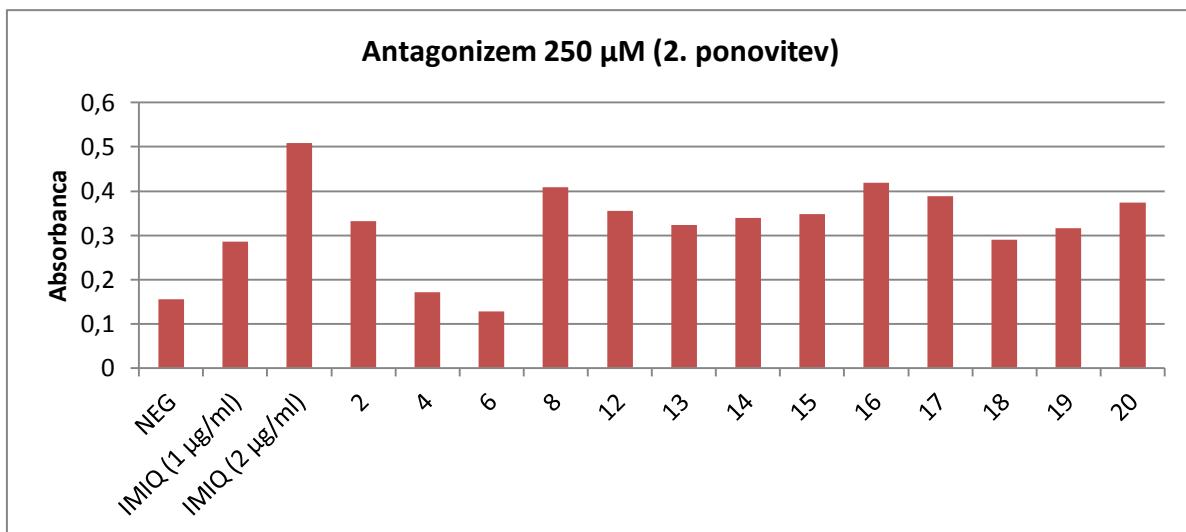


Slika 27: Preliminarno testiranje agonistične aktivnosti (100, 250 µM, 2. ponovitev)

Vse spojine razen **4** in **6** so izkazovale šibko agonistično aktivnost (slike **25**, **26** in **27**). Najboljši rezultati so bili pri spojini **10**, vendar je ob tem potrebno opozoriti, da je testirana koncentracija spojin (100 oziroma 250 µM) precej višja od koncentracije pozitivne kontrole, imikvimoda (v obliki soli s HCl; $c = 3,61 \mu\text{M} = 1 \mu\text{g/ml}$ oziroma $c = 7,23 \mu\text{M} = 2 \mu\text{g/ml}$). Iz niza spojin smo izbrali najbolj aktivne, to so **8**, **10**, **12** in **14**, ter jim z dodatnimi eksperimenti določili vrednosti EC₅₀.



Slika 28: Preliminarno testiranje antagonistične aktivnosti (250 µM, 1. ponovitev)



Slika 29: Preliminarno testiranje antagonistične aktivnosti (250 µM, 2. ponovitev)

Nobena od testiranih spojin ni izkazovala antagonistične aktivnosti, z izjemo spojin **4** in **6**, vendar gre v tem primeru za lažno pozitiven rezultat, saj sta spojini citotoksični. Zaradi slabših rezultatov testov pri 100 µM nismo izvajali. Rezultati so grafično prikazani na slikah **28** in **29**.

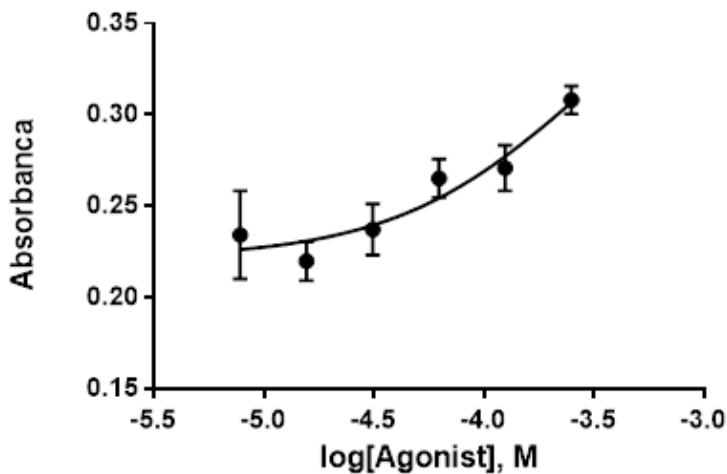
2.4. Določitev EC₅₀

Spojina 8

Tabela III: Tabela vrednosti absorbanc za spojino **8** (prva ponovitev)

Koncentracija spojine 8 [µM]	125	62,5	31,3	15,6	7,81
Absorbanca	0,224	0,184	0,171	0,157	0,153

Najprej smo dobljene podatke analizirali v programu GraphPad Prism, kjer smo zaradi prevelike razpršenosti rezultatov dobili samo približno izračunano vrednost EC₅₀, ki je znašala 6152 µM z izjemno širokim intervalom zaupanja in vrednostjo R² = 0,89 (slika **30**).

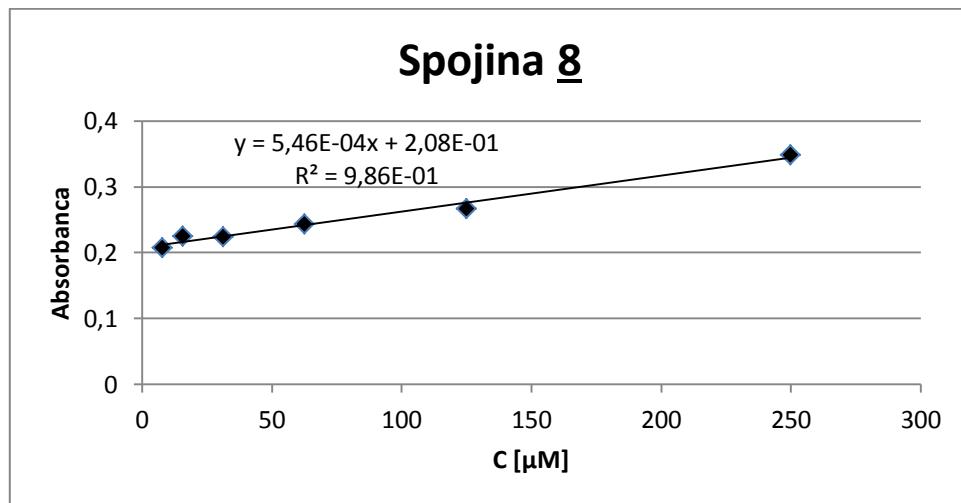


Slika 30: Graf odvisnosti odziva od logaritma koncentracije spojine 8

Zaradi ne preveč zanesljivih rezultatov iz programa GraphPad Prism smo se odločili meritve ponoviti. Novo pridobljene rezultate smo vnesli v program GraphPad Prism in dobili podobne rezultate kot prvič, zato smo tokrat vrednost EC₅₀ izračunali še preko linearne regresije v programu Excel (slika 31). Dobili smo nekoliko nižjo srednjo efektivno koncentracijo (EC₅₀ = 535 μM; R² = 0,98), pri čemer je potrebno opozoriti, da so izračuni z linearno regresijo manj zanesljivi, saj imajo vrednosti pri visokih koncentracijah liganda večji vpliv na rezultat kot tiste pri nizkih.

Tabela IV: Tabela vrednosti absorbanc za spojino 8 (druga ponovitev)

Koncentracija spojine 8 [μM]	250	125	62,5	31,3	15,6	7,81
Absorbanca	0,348	0,267	0,244	0,224	0,225	0,208



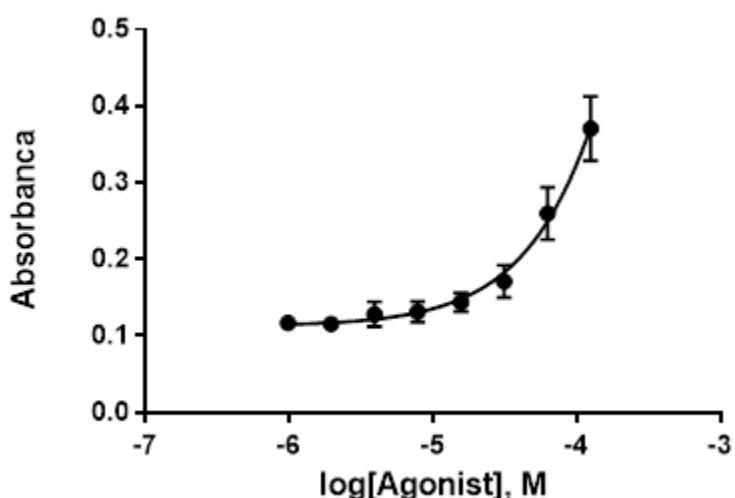
Slika 31: Graf odvisnosti odziva od koncentracije spojine 8

Spojina 10

Tabela V: Tabela vrednosti absorbanc za spojino 10

Koncentracija spojine <u>10</u> [μM]	250	125	62,5	31,3	15,6	7,81	3,91	1,95
Absorbanca	0,371	0,260	0,171	0,144	0,131	0,128	0,116	0,117

Spojina 10, ki je kazala najboljšo agonistično aktivnost že pri preliminarnem testu, je tudi v nadaljevanju dala najboljše rezultate; vrednost $\text{EC}_{50} = 114 \mu\text{M}$ ($R^2 = 0,95$). Na dobro zanesljivost rezultatov kaže tudi pravilna oblika krivulje na grafu odvisnosti absorbance od logaritma koncentracije testirane spojine (slika 32).



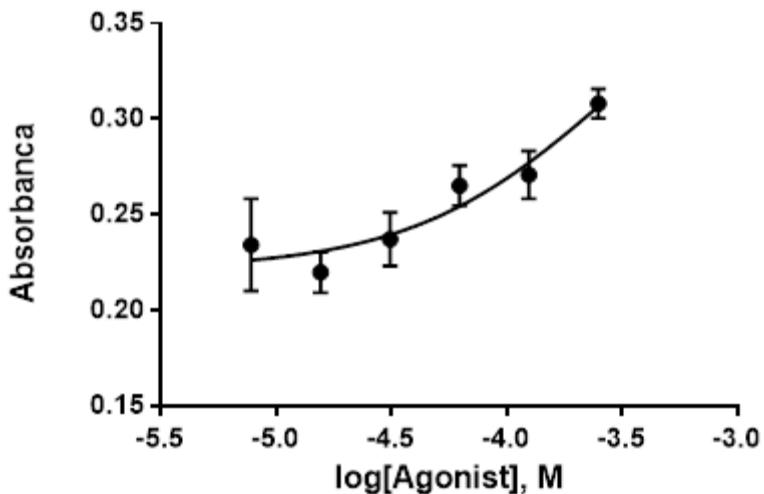
Slika 32: Graf odvisnosti odziva od koncentracije spojine 10

Spojina 12

Tabela VI: Tabela vrednosti absorbanc za spojino 12

Koncentracija spojine <u>12</u> [μM]	250	125	62,5	31,3	15,6	7,81
Absorbanca	0,308	0,271	0,265	0,237	0,220	0,234

Izračunana vrednost srednje efektivne koncentracije za spojino 12 je $279 \mu\text{M}$ ($R^2 = 0,80$), vendar gre v tem primeru za manj zanesljive rezultate, kar je razvidno tako iz vrednosti R^2 kot tudi iz same oblike krivulje (slika 33).



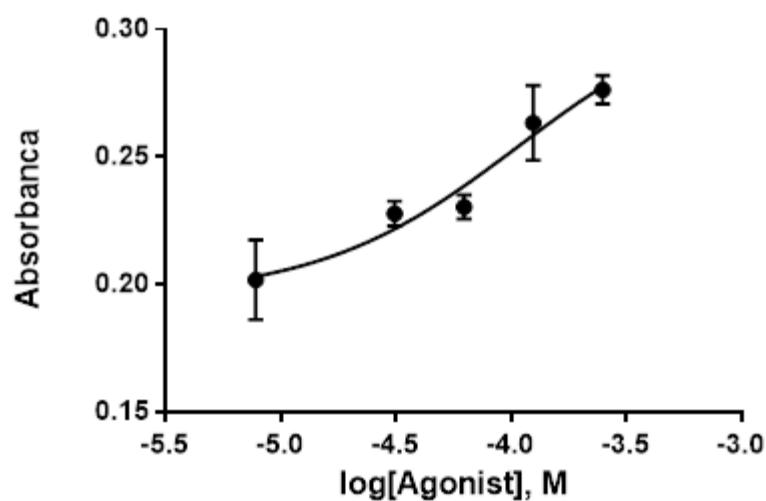
Slika 33: Graf odvisnosti odziva od koncentracije spojine 12

Spojina 14

Tabela VII: Tabela vrednosti absorbanc za spojino 14

Koncentracija spojine <u>14</u> [μM]	250	125	62,5	31,3	15,6	7,81
Absorbanca	0,276	0,263	0,230	0,228	0,239	0,201

Pri spojini 14 smo dobili izračunano vrednost $\text{EC}_{50} = 107 \mu\text{M}$ ($R^2 = 0,88$), pri čemer nismo upoštevali meritev pri koncentraciji spojine $15,6 \mu\text{M}$, saj smo pri tej koncentraciji pod mikroskopom opazili večje skupke celic, ki so dajali lažno previsoke odzive. Tudi v tem primeru so točke na grafu odvisnosti absorbance od logaritma koncentracije testirane spojine precej razpršene, kar nakazuje manjšo netočnost rezultatov (slika 34).



Slika 34: Graf odvisnosti odziva od koncentracije spojine 14

Primerjava rezultatov

Kot najbolj aktivno spojino na biološkem testiranju lahko izpostavimo spojino **10**, to je derivat s hidroksi substituentom na mestu 8, z izračunanim $EC_{50} = 114 \mu M$ ($R^2 = 0,95$). Precej primerljivi vrednosti EC_{50} sta bili izračunani tudi za spojini **12** ($EC_{50} = 279 \mu M$; $R^2 = 0,80$) in **14** ($EC_{50} = 107 \mu M$; $R^2 = 0,88$), vendar gre v obeh primerih za manj zanesljive rezultate z nižjimi vrednostmi R^2 in bolj razpršenimi točkami na grafu absorbance v odvisnosti od logaritma koncentracije liganda. Podobno je tudi pri rezultatih za spojino **8**, kjer pa je poleg naštetega že sama izračunana vrednost $EC_{50} = 6152 \mu M$ ($R^2 = 0,89$) precej višja kot pri ostalih testiranih spojinah. Pomembno je omeniti, da kljub primerljivim vrednostim EC_{50} za spojine **10**, **12** in **14**, to še ne pomeni enake aktivnosti teh spojin. Odziv, sprožen pri maksimalni koncentraciji testiranih spojin ($250 \mu M$), je namreč pri spojini **10** približno 2,5x višji kot pri spojinah **8**, **12** in **14**. Ena izmed možnih razlag je, da spojini **12** in **14** delujeta kot delna agonista, kar pomeni, da ob vezavi na receptor sprožita odziv nižji od maksimalnega. Druga možnost je napačen izračun vrednosti EC_{50} zaradi pomanjkanja rezultatov pri višjih koncentracijah liganda. Teh meritev nismo mogli izvesti, saj bi to pomenilo previsoko koncentracijo DMSO v celičnem gojišču, kar bi zaviralo rast celic (že pri 1 % DMSO, kar ustreza koncentraciji spojin $250 \mu M$, smo z opazovanjem celic pod mikroskopom lahko opazili rahlo zaviranje rasti celic v primerjavi s celicami v celičnem gojišču brez DMSO).

3. Odnos med strukturo in delovanjem spojin

Iz dobljenih rezultatov smo pridobili nekaj novih informacij o odnosu med strukturo in delovanjem spojin (SAR), ki delujejo kot agonisti TLR7. Dolžina in razvejanost alifatske verige na mestu 1 bistveno ne vpliva na delovanje spojin, prav tako pa na delovanje ne vpliva vključitev kisikovega atoma v to stransko verigo. Na tem mestu bi potencialno lahko še preizkusili derive z dodanim bazičnim centrom ali pa donorjem vodikovih vezi. Kot najučinkovitejši se je sicer izkazal analog z nerazvejano alifatsko verigo s štirimi ogljikovimi atomi.

Preizkušali smo tudi derive z modifikacijami na kromenskem delu molekule. Večina modifikacij je bila na mestu 8, z izjemo spojine **12**, ki je imela na mestu 7 metoksi skupino. Najbolj je agonistično delovanje povečala vezava hidroksi skupine na mesto 8 kromenskega obroča (spojava **10**), kar je najbrž posledica tvorbe vodikove vezi med

hidroksi skupino in receptorjem (hidroksi skupina deluje kot donor ali akceptor H-vezi). Vezava ostalih substituentov (fluoro, nitro, metoksi in metilna skupina) bistveno ne vpliva na agonistično delovanje spojine, ima pa vpliv na citotoksičnost. Spojina **6** z nitro substituentom na mestu 8 najbolj zavira rast celic in je tako neprimerna kot potencialna zdravilna učinkovina. Zanimiva je vpeljava metoksi skupine na mesto 8, ki povzroči citotoksično delovanje (spojina **4**), medtem ko na mestu 7 (spojina **12**) kaže le šibke citotoksične lastnosti.

V nadalnjih raziskavah bi bilo tako zanimivo testirati tudi derivate s hidroksi skupino na mestu 7 oziroma derivat z dvema hidroksi skupinama. Potencialno bi lahko vpeljali tudi druge funkcionalne skupine, ki so sposobne tvorbe vodikove vezi. Na tem mestu bi bil zanimiv derivat z aminsko skupino, ki deluje bazično, kar je tudi zaželena lastnost potencialnih ligandov TLR7, saj se receptor nahaja v kislem okolju endosoma.

SKLEP

V sklopu magistrske naloge smo uspešno sintetizirali derivate 1-izobutilkromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-ona, pri čemer smo delno optimizirali drugo stopnjo sinteze. V drugem delu smo biološko ovrednotili delovanje derivatov kromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-ona na Toll-u podobnem receptorju 7 in tako pridobili nekaj novih pomembnih informacij o odnosu med strukturo in delovanjem.

1. Sintetizirali smo šest derivatov 1-izobutilkromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-ona z vpeljavo naslednjih substituentov na mesto 8: fluor (spojina **2**), metoksi skupina (spojina **4**), nitro skupina (spojina **6**), metilna skupina (spojina **8**) in hidroksi skupina (spojina **10**). Poleg tega smo pripravili tudi 7-metoksi derivat (spojina **12**).
2. Uspeli smo optimizirati drugo stopnje sinteze končnih spojin. Z uporabo mikrovalovnega reaktorja smo občutno skrajšali čas reakcije, povečali izkoristke in zmanjšali porabo nevarnih topil.
3. Sintetiziranim spojinam in derivatom kromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-ona z modifikacijami na imidazolskem delu smo preverili topnost in citotoksičnost. Vse spojine so bile primerne za nadaljnje testiranje antagonističnega in agonističnega delovanja (spojini **4** in **6** sta sicer izkazovali citotoksično delovanje).
4. Derivatom z najbolj izraženo agonistično aktivnostjo (spojine **8**, **10**, **12** in **14**) smo z dodatnimi eksperimenti določili vrednosti EC₅₀, pri čemer je najboljše in najbolj zanesljive rezultate dala spojina **10** z EC₅₀ = 114 µM ($R^2 = 0,95$). Tudi za spojini **12** in **14** smo izračunali podobne vrednosti EC₅₀, vendar odziv receptorja ni tako visok, poleg tega so rezultati manj zanesljivi (nižje vrednosti R²).
5. Iz dobljenih rezultatov biološkega testiranja lahko sklepamo, da je vpeljava hidroksi skupine na mesto 8 (spojina **10**) najbolj povečala agonistično delovanje, medtem ko ostale modifikacije kromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-ona niso bistveno vplivale na aktivnost.

Na koncu lahko zaključimo, da 8-hidroksi-1-izobutilkromeno[3,4-*d*]imidazol-4(1*H*)-on (spojina **10**, EC₅₀ = 114 µM) predstavlja pomembno izhodišče za nadaljnje iskanje novih nizkomolekularnih agonistov receptorja TLR7 kot potencialnih zdravilnih učinkovin.

VIRI

1. Doan T., Melvold R., Viselli S., Waltenbaugh C.: Lippincott's Illustrated Reviews: Immunology Second Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2012: 1-42
2. Hall J. E.: Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology 12th edition, Saunders, Philadelphia, 2010: 800-39
3. Owen J. A., Punt J., Stranford S. A., Jones P. P.: Kuby Immunology 7th editon, W.H. Freeman and Company, New York: 141-85
4. O'Neill L. A. J., Golenbock D., Bowie A. G.: The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity, *Nature Reviews Immunology* 2013, 13: 453-60
5. Dale M. M., Haylett D. G.: Pharmacology Condensed 2nd editon, Churchill Livingstone, Edinburgh, 2009: 42-5
6. Gay N. J., Gangloff M.: Structure and Function of Toll Receptors and Their Ligands, *Annual Review of Biochemistry* 2007, 76: 141-65
7. Kumar H., Kiyoshi T., Akira S.: Toll-Like Receptors, *Encyclopedia of Biological Chemistry* 2004, 4: 190-5
8. Lawton J. A., Ghosh P.: Novel therapeutic strategies based on toll-like receptor strategies, *Current Opinion in Chemical Biology* 2003, 7: 446-51
9. Wang X., Smith C., Yin H.: Targeting Toll-like receptors with small molecule agents, *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42: 4859-66
10. Földes G., von Haehling S., Jankowska E. A., Anker S. D.: Targeting the Toll-System in Cardiovascular Sciences, *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery* 2007, 1: 57-67
11. Zaremba K. A., Godowski P. J.: Tissue Expression of Human Toll-Like Receptors and Differential Regulation of Toll-Like Receptor mRNAs in Leukocytes in Response to Microbes, Their Products, and Cytokines, *The Journal of Immunology* 2002, 169: 554-61
12. Casella C. R., Mitchell T. C.: Putting endotoxin to work for us: monophosphoryl lipid A as a safe and effective vaccine adjuvant, *Cell Mol Life Sci* 2008, 65: 3231-40
13. Akira S., Takeda K.: Toll-like receptor signaling, *Nature Reviews Immunology* 2004, 4: 499-511
14. Takeda K., Akira S.: TLR signaling pathways, *Seminars in Immunology* 2004, 16: 3-9

15. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Aldara, dostopno na:
http://www.ema.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000179/WC500023122.pdf (15. 12. 2014, 18:36)
16. Nazmi A., Murherjee S., Kundu K., Dutta K., Mahadevan A., Shankar S. K., Basu A.: TLR7 is a key regulator of innate immunity againts Japanese encephalitis virus infection, *Neurobiology od Disease* 2014, 69: 235-47
17. O'Neill 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
18. Hennessy J. E., Parker A. E., O'Neill L. A. J.: Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics?, *Nature Reviews Drug Discovery* 2010, 9: 293-307
19. Guiducci C., Gong M., Xu Z., Gill M., Chaussabel D., Meeker T., Chan J. H., Wright T., Punaro M., Bolland S., Soumelis V., Banchereau J., Coffman R. L., Pascual V., Barrat F. J.: TLR recognition of self nucleic acids hampers glucocorticiod activity in lupus, *Nature letters* 2010, 465: 937-41
20. Shodell M., Shah K., Siegal F. P.: Circulating human plasmacytoid dendritic cells are highly sensitive to corticosteroid administration, *Lupus* 2003, 12: 222-30
21. Brunner R., Jensen-Jarolim E., Pali-Schöll I.: The ABC od clincal and experimental adjuvants – A brief overview, *Immunology Letters* 2010, 128: 29-35
22. Krishnan J., Lee G., Choi S.: Drugs Targeting Toll-like Receptors, *Archives od Pharmacal Research* 2009, 32: 1485-502
23. Kaufman E. H., Fryer A. D., Jacoby D. B.: Toll-like receptor 7 agonists are potent and rapid bronchodilators in guinea pigs, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2011, 127: 462-9
24. Drake M. G., Kaufman E. H., Fryer A. D., Jacoby D. B., The therapeutic Potential of Toll-like Receptor 7 Stimulation in Asthma, *Inflammation & Allergy-Drug Targets* 2012, 11: 484-91
25. Connolly D. J., O'Neill L. A. J.: New developments in Toll-like receptor targeted therapeutics, *Curent Opinion in Pharmacology* 2012, 12: 510-8
26. Hwang H., Min H., Kim D., Yu S. W., Jung S. J., Choi S. Y., Lee S. J.:Imiquimod induces a Toll-like receptor 7-independent increase in intracellular calcium via IP₃ receptor activation, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2014, 450: 875-9

27. Sauder D. N.: Immunomodulatory and pharmacologic properties of imiquimod, Journal of American Academy of Dermatology 2000, 43: 6-11
28. PubChem BioAssay: BioActivity Data for Compound imiquimod (CID 57469), dostopno na: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/assay/assay.cgi?cid=57469> (12. 3. 2015; 19:09)
29. GSK Clincal Study Register – study 116392, dostopno na: <http://www.gsk-clinicalstudyregister.com/study/116392#ps> (18. 1. 2015, 17:50)
30. To Investigate the Safety, Pharmacodynamics and Effect on Allergic Reactivity of the Toll-like Receptor 7 (TLR7) Agonist GSK2245035 in Subjects With Respiratory Allergies, dostopno na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study?term=gsk2245035&rank=2> (18. 1. 2015, 18:00)
31. Highlights from Society of Medicines Research Meeting 4th December 2014, dostopno na: <https://sussexdrugdiscovery.wordpress.com/2014/12/16/highlights-from-society-of-medicines-research-meeting-4th-december-2014/> (18. 1. 2015. 18:15)
32. Dose Escalation Study in Patients With Relapsed or Refractory DLBCL and MyD88L265P Mutation, dostopno na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show?term=imo8400&rank=1> (18. 1. 2015, 20:07)
33. Phase 1/2 Dose Escalation Study in Patients With Relapsed or Refractory Waldenstrom's Macroglobulinemia (8400-401), dostopno na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02092909> (5. 3. 2015, 18:20)
34. A 12-week Dose-Ranging Trial in Patients With Moderate to Sever Plaque Psoriasis (8400-201), dostopno na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show?term=imo8400&rank=3> (18. 1. 2015, 20:09)
35. Švajger U., Horvat Ž., Knez D., Rožman P., Turk S., Gobec S.: New antagonist of toll-like receptor 7 discovered through 3D ligand-based virtual screening, Medicinal Chemistry Research 2015, 24: 362-71
36. Čujež T.: Sinteza in vrednotenje derivatov kromeno[3,4-*d*]imidazol-4-ona kot ligandov Toll-u podobnega receptorja 7. Magistrska naloga. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, 2015.
37. Technical Data Sheet for HEK-Blue™ hTLR7 Cells (InvivoGen), dostopno na: http://www.invivogen.com/PDF/HEK_Blue_hTLR7_TDS.pdf (6. 3. 2015; 19:38)

38. Counting Chambers (Brand), dostopno na:
http://www.brand.de/fileadmin/user/pdf/GK900/Zaehlkammern/GK900_05_Clinical_Lab_Zaehlkammern_e.pdf (6. 3. 2015; 19:45)
39. Riss T. L., Moravec R. A., Niles A. L., Benink H. A., Worzella T. J., Minor L.: Cell Viability Assays, 2013 in Sittampalam G. S., Coussenes N. P. Nelson H., et al.: Assay Guidance Manual [Internet], Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004 –
40. Technical Data Sheet for QUNATI-BlueTM (InvivoGen), dostopno na:
http://www.invivogen.com/PDF/QUANTI-Blue_TDS.pdf (7. 3. 2015; 16:15)
41. GraphPad Curve Fitting Guide, GraphPad Software, Inc; 138-45
42. Meng T., Zou Y., Khorec O., Jin Y., Zhou H., Zhang, Y., Hu D., Ma L., Wang X., Shen J.: Simple and Efficient Copper(I)-Catalyzed Access to Three Versatile Aminocoumarine-Based Scaffolds using Isocyanoacetate, Advanced Synthesis & Catalysis 2011, 353: 918-24
43. Ruijter E., Orru R. V. A.: Multicomponent reactions – opportunities for the pharmaceutical industry, Drug Discovery Today: Technologies 2013, 10: e15-20
44. Solomons T. W. G., Fryhle C. B., Snyder S. A.: Organic Chemistry 11E, John Wiley & Sons, Hoboken, 2014
45. Fisher Esterification, dostopno na: <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/fischer-esterification.shtm> (14. 2. 2015; 22:09)
46. Shukla N. M., Kimbrell M. R., Malladi S. S., David S. A.: Regioizomerism-dependent TLR7 agonism and antagonism in an imidazoquinoline, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2009, 19: 2211-4
47. BioActivity Data for Compound gardiquimod (CID 44592366), dostopno na:
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/assay/assay.cgi?cid=44592366> (19. 2. 2015; 18:59)