

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



MIHA MIHIČINAC

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA N-BENZILIRANIH 2-
IMINOINDOLINOV KOT POTENCIALNIH
ANTAGONISTOV RECEPTORJA NOD1**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF N-BENZYLATED 2-
IMINOINDOLINES AS POTENTIAL NOD1 RECEPTOR
ANTAGONISTS**

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2015

Magistrsko naložko sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Žige Jakopina, mag. farm. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo, Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo ter na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

ZAHVALA

Iskreno bi se rad zahvalil svojemu mentorju doc. dr. Žigi Jakopinu, mag. farm., za zelo korekten odnos tekom celotnega opravljanja magistrskega dela, kjer sem lahko vedno in hitro dobil odgovore na vprašanja in nasvete. Ja bili ste mentor v polnem pomenu besede. Zahvala gre tudi vsemu osebju Katedre za farmacevtsko kemijo, še posebej ob opravljanju laboratorijskega dela ter osebju Katedre za klinično biokemijo, kjer so bili pod vodstvom asist. dr. Martine Gobec, mag. farm opravljena biološka testiranja spojin.

Te magistrske naloge ne bi bilo brez nenehne podpore moje družine, še posebej stare mame in mame ter sestre, ki niso nikoli dvomili tudi, ko je bilo težko. In ne nazadnje hvala prav vsakomur kateri mi je skozi moje študentsko obdobje stal ob strani.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelal pod mentorstvom doc. dr. Žige Jakopina, mag. farm.

Ljubljana, 2015

Miha Mihičinac

Predsednik komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm.,
Član komisije: asist. dr. Irena Prodan Žitnik, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	I
POVZETEK.....	IV
ABSTRACT	V
KLJUČNE BESEDE	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
1. UVOD.....	1
1.1. IMUNSKI SISTEM.....	1
1.2. RECEPTORJI ZA PREPOZNAVO MOLEKULSKIH VZORCEV	1
1.3. NOD-U PODOBNI RECEPTORJI (NLR).....	2
1.3.1. VLOGA NOD1 IN NOD2 V GOSTITELJEVI OBRAMBI	3
1.3.2. ZGRADA RECEPTORJEV NOD1 IN NOD2	4
1.3.3. LIGANDI ZA NOD1 IN NOD2	4
1.3.4. POTEK ZAZNAVNE IN PRENOS SIGNALA	5
1.3.5. PROTEINI NOD IN BOLEZNI	7
1.3.6. REGULACIJA NOD	8
1.3.7. ZAVIRALCI PRENOSA SIGNALA PRI NOD1 IN NOD2	9
1.4. SKELETNI PRESKOK	10
1.4.1. SKELETNI PRESKOK Z BENZIMIDAZOLNEGA NA INDOLNI SKELET	12
1.5. BIOIZOSTERNE ZAMENJAVE	14
2. NAMEN IN NAČRT ZA DELO	16
2.1. REAKCIJSKA SHEMA	17
3. MATERIALI IN METODE.....	18
3.1. MATERIALI.....	18
3.2. METODE	19
3.2.1. KROMATOGRAFSKE METODE	19
3.2.2. SPEKTROSKOPSKE METODE	20
3.2.3. DOLOČANJE TALIŠČA.....	21
3.2.4. BIOLOŠKO TESTIRANJE SPOJIN.....	21
4. EKSPERIMENTALNI DEL	22
4.1. SINTEZA 1-(4-IZOPROPILBENZIL)-1H-INDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (5)	23
4.1.1. Sinteza etil 1-(4-izopropilbenzil)-1H-indol-2-karboksilata (2)	23
4.1.2. Sinteza 1-(4-izopropilbenzil)-1H-indol-2-karboksilne kisline (3).....	24
4.1.3. Sinteza <i>terc</i> -butil (1-(4-izopropilbenzil)-1H-indol-2-il)karbamata (4)	25

4.1.4. Sinteza 1-(4-izopropilbenzil)-1H-indolin-2-iminijevega klorida (5).....	26
4.2. SINTEZA 1-(4-METILBENZIL)-1H-INDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (9).....	28
4.2.1. Sinteza etil 1-(4-metilbenzil)-1H-indol-2-karboksilata (6).....	28
4.2.2. Sinteza 1-(4-metilbenzil)-1H-indol-2-karboksilne kisline (7)	29
4.2.3. Sinteza <i>terc</i> -butil (1-(4-metilbenzil)-1H-indol-2-il)karbamata (8)	30
4.2.4. Sinteza 1-(4-metilbenzil)-1H-indolin-2-iminijevega klorida (9)	31
4.3. SINTEZA 1-(4-TRIFLUOROMETILBENZIL)-1H-INDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (13)	33
4.3.1. Sinteza etil 1-(4-trifluorometilbenzil)-1H-indol-2-karboksilata (10)	33
4.3.2. Sinteza 1-(4-trifluorometilbenzil)-1H-indol-2-karboksilne kisline (11).....	34
4.3.3. Sinteza <i>terc</i> -butil (1-(4-trifluorometilbenzil)-1H-indol-2-il)karbamata (12)	35
4.3.4. Sinteza 1-(4-trifluorometilbenzil)-1H-indolin-2-iminijevega klorida (13).....	36
4.4. SINTEZA 1-(4-CIANOBENZIL)-1H-INDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (17).....	38
4.4.1. Sinteza etil 1-(4-cianobenzil)-1H-indol-2-karboksilata (14).....	38
4.4.2. Sinteza 1-(4-cianobenzil)-1H-indol-2-karboksilne kisline (15).....	39
4.4.3. Sinteza <i>terc</i> -butil (1-(4-cianobenzil)-1H-indol-2-il)karbamata (16)	40
4.4.4. Sinteza 1-(4-cianobenzil)-1H-indolin-2-iminijevega klorida (17)	41
4.5. SINTEZA 1-(4-FLUOROBENZIL)-1H-INDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (21)	42
4.5.1. Sinteza etil 1-(4-fluorobenzil)-1H-indol-2-karboksilata (18)	42
4.5.2. Sinteza 1-(4-fluorobenzil)-1H-indol-2-karboksilne kisline (19)	44
4.5.3. Sinteza <i>terc</i> -butil 1-(4-fluorobenzil)-1H-indol-2-il)karbamata (20)	45
4.5.4. Sinteza 1-(4-fluorobenzil)-1H-indolin-2-iminijevega klorida (21)	46
4.6. SINTEZA 1-(4-BROMOBENZIL)-1H-INDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (25).....	47
4.6.1. Sinteza etil 1-(4-bromobenzil)-1H-indol-2-karboksilata (22)	47
4.6.2. Sinteza 1-(4-bromobenzil)-1H-indol-2-karboksilne kisline (23)	48
4.6.3. Sinteza <i>terc</i> -butil (1-(4-bromobenzil)-1H-indol-2-il)karbamata (24)	49
4.6.4. Sinteza 1-(4-bromobenzil)-1H-indolin-2-iminijevega klorida (25)	51
4.7. SINTEZA 1-(4-CIKLOPROPILBENZIL)-1H-INDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (29)	52
4.7.1. Sinteza etil 1-(4-bromobenzil)-1H-indol-2-karboksilata (22)	52
4.7.2. Sinteza etil 1-(4-ciklopropilbenzil)-1H-indol-2-karboksilata (26) s Suzukijevo cross-coupling reakcijo.....	52
4.7.3. Sinteza 1-(4-ciklopropilbenzil)-1H-indol-2-karboksilne kisline (27)	54
4.7.4. Sinteza <i>terc</i> -butil (1-(4-ciklopropilbenzil)-1H-indol-2-il)karbamata (28)	55
4.7.5. Sinteza 1-(4-ciklopropilbenzil)-1H-indolin-2-iminijevega klorida (29)	56
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	58

5.1. SINTEZNI POSTOPKI	58
5.1.1. N-ALKILIRANJE INDOLNEGA DUŠIKA	58
5.1.2. SUZUKIJEVA »CROSS-COUPING« REAKCIJA	59
5.1.3. ALKALNA HIDROLIZA ESTROV	60
5.1.4. CURTIUSOVA PREMESTITEV	60
5.1.5. ODSTRANITEV BOC ZAŠČITE	61
5.2. TESTIRANJE SINTETIZIRANIH SPOJIN.....	62
5.2.1. PREIZKUS CITOTOKSIČNOSTI.....	62
5.2.2. PREIZKUS ANTAGONISTIČNE AKTIVNOSTI NA RECEPTORJU NOD1.....	63
6. SKLEP.....	66
7. VIRI IN LITERATURA.....	67

POVZETEK

Imunski sistem je eden od ključnih delov vsakega organizma. Pri človeku ga lahko na grobo delimo na prirojeni in pridobljeni imunski sistem, pri čemer prvi igra prvo linijo obrambe, drugi pa se skozi življenje nadgrajuje in specializira za vsak specifičen patogen.

Zelo pomemben del pridobljenega imunskega sistema predstavljajo receptorji za prepoznavo molekulskeih vzorcev (PRR), ki so ključni za sprožitev imunskega odgovora. Izmed mnogih skupin receptorjev, ki tvorijo ta kompleksni sistem, sodijo v to družino tudi NOD-u podobni receptorji (NLR-ji), izmed katerih smo se mi osredotočili na receptor NOD1.

NOD1 je preko zelo kompleksnih signalnih poti pomemben člen različnih procesov, kot aktivator vnetja, prožilec apoptoze in tvorbe reaktivnih kisikovih in dušikovih zvrsti. Prekomerna aktivacija ali nepravilno delovanje zaradi mutacij na genih za NOD1 je povezano s številnimi vnetnimi nepravilnostmi (npr. multiplo sklerozo, vnetjem adipoznega tkiva, vnetju žilnega endotelija idr.). Mnoga kronična vnetja pa med drugim povzročajo tudi povečano tveganje za nastanek raka, zato se zdijo antagonisti receptorjev NOD1 možna rešitev za zdravljenje teh patoloških procesov.

Kot prvi selektiven antagonist NOD1 so odkrili noditinib-1, z benzimidazolnim osrednjim skeletom. Pri nadaljnjih raziskavah so benzimidazolni skelet zamenjali z indolom in dobili aktivno spojino, 1-(4-klorobenzil)indolin-2-iminijev klorid, a se je le-ta izkazala za citotoksično.

S klasičnimi in neklasičnimi bioizosternimi zamenjavami za klor, za katerega smo menili, da je vzrok za citotoksičnost naše spojine vodnica, smo hoteli odpraviti citotoksične lastnosti, obenem pa ohraniti ali še celo znižati rezidualno aktivnost.

V ta namen smo sintetizirali sedem novih spojin, pri katerih je testiranje na citotoksičnost potrdilo, da je citotoksičnost naše spojine vodnica res bila posledica klora na mestu 4 fenilnega obroča, saj se je vseh sedem naših spojin izkazalo kot necitotoksičnih. Z bioizosternimi zamenjavami za klor smo pri večini spojin izgubili tudi antagonističen učinek na NOD1. Le dve spojini sta namreč izkazovali antagonistične učinke na receptorju NOD1. Na osnovi naših rezultatov lahko z veliko verjetnostjo domnevamo, da je naša spojina vodnica prav zaradi citotoksičnosti kazala tudi tako dobre antagonistične učinke.

ABSTRACT

The immune system is one of the key components of every organism. In humans, we can roughly divide it into the innate and adaptive arm of the immune system in which the former is the first line of defence while the latter is continuously being upgraded throughout life and specializes for each specific pathogen.

Pattern recognition receptors (PRR) represent a very important part of the innate immune system and they are vital to the activation of an immune response. Out of many groups of receptors that build this complex system, a part of this family are also NOD-like receptors (NLRs), among which we focused on NOD1 receptors.

NOD1 plays an important part of many processes as activator of inflammation, the trigger of apoptosis and the formation of reactive oxygen and nitrogen species via very complex signal pathways. Excessive activation or incorrect action due to mutations on genes for NOD1 is associated with numerous inflammatory irregularities (e.g. multiple sclerosis, adipose tissue inflammation, inflammation of the vascular endothelium, etc.). Many chronic inflammations among other things also cause an increased risk of cancer. Thus NOD1 receptor antagonists represent possible solution for treatment of these pathological processes.

Noditinib-1, a benzimidazole scaffold-based compound was discovered as the first selective NOD1 antagonist. In further research, the benzimidazole scaffold was replaced with the indole moiety affording an active compound, 1-(4-chlorobenzyl)indoline-2-imino chloride, however, the compound turned out to be cytotoxic.

We intended to eliminate the cytotoxic characteristics and at the same time retain or even improve the antagonistic activity by introducing classical and nonclassical bioisosteric replacements of chlorine atom, for which we believed was the cause for the cytotoxicity of our lead compound.

With this in mind, we synthesized seven new compounds and tested them for cytotoxicity which has confirmed that the chlorine atom indeed was the cause for the cytotoxicity of our lead compound since all newly synthesized compounds lost this characteristic. Unfortunately, the bioisosteric replacements of chlorine also led to diminished antagonistic activity of most compounds. Only two compounds exhibited antagonistic properties on the NOD1 receptor. From our research we can conclude that our lead compound has probably exhibited such good antagonistic activity mostly due to its cytotoxicity.

KLJUČNE BESEDE

Receptorji NOD1, antagonist, aktivacija NF-κB, 2-aminoindol, bioizosterija

SEZNAM OKRAJŠAV

APAF1 : angl. apoptotic protease activating factor 1 ; apoptotični proteazni aktivirajoči faktor 1

BIR : angl. Baculovirus inhibitory repeats, bakulovirusna inhibitorna domena

BOC : angl. N-tert-Butoxycarbonyl, *terc*-butiloksikarbonil

CARD : angl. Caspase recruitment domain ; domena, ki rekrutira kaspaze

CDCl₃ : devteriran kloroform

cIAP : angl. cellular inhibitors of apoptosis ; celični apoptozni inhibitor

DAMP : angl. damage associated molecular pattern ; molekulski vzorci povezani s poškodbami

DAP : angl. diaminopimelic acid ; daiamino pimelinska kislina

DMF : dimetilformamid

DMSO – d₆ : devteriran dimetilsulfoksid

DMPU : angl. 1,3-Dimethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2(1H)-pyrimidinone ; 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2-pirimidinon

DPPA : angl. Diphenylphosphoryl azide ; difenilfosforil azid

IC₅₀ : srednja zaviralna koncentracija, pri kateri je aktivnost encima znižana za 50 %

IKK : angl. IkB kinase ; IkB kinaza

IL : angl. interleukin ; interlevkin

IR : infrardeča spektroskopija

LPS : angl. Lipopolysacharides ; lipopolisaharidi

LRR : angl. Leucine-rich repeat ; z levcinom bogato zaporedje

m : multiplet

meso-DAP : angl. meso-Diaminopimelic acid ; mezo-diaminopimelinska kislina

MF : mobilna faza

Mr : molekulska masa

MS : masna spektroskopija

NF-κB : angl. Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells ; jedrni faktor κB

NLR : angl. NOD-like receptors ; NOD-u podoben receptor

NLRA : angl. NOD-like receptors, A for acidic transactivating domain ; skupina NOD receptorjev s kislo N-terminalno domeno

SEAP : angl. secreted embryonic alkaline phosphate ; izločena zarodna alkalna fosfataza

NLRB : angl. NOD-like receptors, B for BIRs ; skupina NOD receptorjev z domeno zaviralnih proteinov apoptoze

NLRC : angl. NOD-like receptors, C for CARD ; skupina NOD receptorjev s kaspazno dopolnilno domeno

NLRP : angl. NOD-like receptors, P for pyridine ; skupina NOD receptorjev s pirinsko domeno

NMR : angl. Nuclear magnetic resonance ; jedrska magnetna resonanca

NOD : angl. Nucleotide-binding oligomerization domain ; nukleotid vezavna domena oligomerizacije

MDP : angl. muramyl dipeptide ; muramil dipeptid

PAMP : angl. Pathogen associated molecular patterns ; molekulski vzorci povezani z mikrobi

PGN : angl. Peptidoglycan ; peptidoglikan

PRR : angl. Pattern recognition receptor ; receptorji za prepoznavo molekulskeih vzorcev

Rf : retencijski faktor

RIP2 : angl. Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2 ; receptor, ki interagira s serin in treonin protein kinazo 2

s : singlet

SAR : angl. Structure–activity relationship ; odnos med strukturo in delovanjem

T : temperatura

t : triplet

TAB1 : angl. TGF- β (transforming growth factor β) – activated kinase 1 binding protein ; TGF- β (transformirajoči rastni faktor β) – aktivirana kinaza 1 povezovalni protein

TAK1 : angl. TGF- β (transforming growth factor β) – activated kinase 1 ; TGF- β (transformirajoči rastni faktor β) – aktivirana kinaza 1

THF : tetrahidrofuran

TLC : angl. Thin layer chromatography; tankoplastna kromatografija

TLR : angl. Toll-like receptor ; Toll-u podoben receptor

TMS : tetrametilsilan

TNF- α : angl. Tumor necrosis factor-alpha ; tumor nekrotizirajoči faktor alfa

TRAF6 : angl. Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor 6 ; faktor tumorske nekroze

1. UVOD

V naravi nenehno poteka boj za hrano, preživetje in s tem nadaljevanje, krepitev ter razvoj vrste. V ta boj je udeležen prav vsak mnogocelični kot tudi enocelični organizem in na podlagi uspešne prilagoditve na dane pogoje okolja, se nato odloči, katera vrsta bo svojo pot nadaljevala in katera bo za vedno pristala v svetu pozabe.

1.1. IMUNSKI SISTEM

Pri tem boju ima eno od ključnih vlog tudi imunski sistem. Vsak imunski odgovor je sestavljen iz prepozname patogena ali telesu tuje snovi, ki vdre v tkiva ter reakcije s ciljem nevtralizacije patogena. Mikrobe (bakterije, zajedavce, virusi, glice), rakave celice in presajena tkiva ali organe imunski sistem prepozna kot tujke, pred katerimi je treba telo obraniti. Čeprav je delo tega sistema zapleteno, je njegova osnovna strategija preprosta: prepoznati sovražnika (tujek), mobilizirati obrambne celice in napasti tujek (1, 2).

Sesalski imunski sistem sestavlja zapleteno omrežje nadzora in možnosti uravnovešanja, ki ga lahko razdelimo na prirojeno in pridobljeno imunost. S prirojeno imunostjo se že rodimo in predstavlja prvo linijo obrambe. Sestavine prirojene imunosti, med katerimi so makrofagi, nevtrofilci in komplement, se vsakokrat podobno odzivajo na vse tujke, zato se takšno prepoznavanje od človeka do človeka ne razlikuje veliko (1,3). Pridobljeno imunost pa na drugi strani pridobivamo skozi vse življenje. Ob rojstvu namreč imunski sistem še nima izkušenj zunanjega sveta, zato so njegova spominska skladišča o tujkih še prazna, sčasoma pa se nauči odzivati na nov tujek, ki pride v telo. Pridobljena imunost je specifičen imunski odziv na vsak posamezen antigen, ki ga je organizem srečal v svojem življenju. Poglavitne lastnosti specifične imunosti so zmožnost učenja, prilagajanja in spomina. Prirojeni in pridobljeni imunski sistem ne delujeta ločeno ampak v tandemu, saj med drugim celične in necelične komponente nespecifičnega imunskega sistema pridobijo informacije, ki omogočijo specifičnemu imunskemu sistemu izbiro tarče, napad in eliminacijo (1,4).

1.2. RECEPTORJI ZA PREPOZNAVO MOLEKULSKIH VZORCEV

Čeprav so mehanizmi, ki omogočajo simbiozo s komenzalnimi bakterijami še slabo raziskani, se je razumevanje, kako prirojeni imunski sistem zazna patogene in potencialno škodljive mikroorganizme, močno povečalo. Prirojeni imunski sistem se v svojem delovanju zanaša na zaznavanje, ki ga opravljajo receptorji za prepoznavo molekulskih vzorcev (PRR (angl.

pattern recognition receptors)), ki so prisotni v celicah prirojenega imunskega sistema, kot so makrofagi in dendritične celice, pa tudi v epitelijskih celicah in fibroblastih. Nahajajo se v membranah celic ali v citosolu in zaznavajo specifične molekulske vzorce povezane s patogeni (PAMP (angl. pathogen associated molecular patterns), kot so lipopolisaharidi (LPS), peptidoglikan (PGN), nukleinske kisline in flagelin. Vse naštete molekule so ponavadi prisotne v patogenih in niso značilne za gostitelja. Obenem pa se lahko odzovejo tudi na molekulske vzorce, ki so povezani s poškodbami in nevarnostmi (DAMP (angl. damage associated molecular pattern)), ki so sicer telesu lastne snovi, a njihovo sproščanje iz celic in tkiv kaže na prisotno poškodbo oziroma nevarnost. Mednje sodijo na primer urat, DNK in ATP (3, 5, 6).

PRR-ji obsegajo mnoge družine receptorjev, kot so Tollu podobni receptorji (TLRs (angl. Toll like receptors)) in C-tip lektinskih receptorjev, ki so večinoma prisotni na membrani, NOD-u (nukleotid vezavna domena oligomerizacije oz. angl. nucleotide-binding oligomerization domain) podobni receptorji (NLRs (angl. NOD like receptors)) in RIG-I-u podobni receptorji (RLRs (angl. RIG-I like receptors)) pa se nahajajo le znotrajcelično (6, 7).

1.3. NOD-U PODOBNI RECEPTORJI (NLR)

Danes se zdi skoraj neverjetno, da se je skozi dvajseto stoletje, daleč pred odkritjem NOD-u podobnih receptorjev, že množično uporabljalo cepiva na osnovi molekul, ki danes veljajo za ligande NLR. Izmed vseh sta se največkrat uporabljala prav fragment peptidoglikana (gradnik bakterijske celične stene), za katerega danes vemo, da sproži odziv z aktivacijo receptorjev NOD1 in NOD2 ter anorganski kristali (na primer aluminijev hidroksid), ki sprožijo odziv z aktivacijo receptorjev NLRP3 (8). Začetna razumevanja, kako PAMP reagirajo s PRR in tako sprožijo imunski odziv, pa so temeljila predvsem na raziskavah receptorjev TLR. V zadnjih nekaj letih pa so raziskave pripisale pomembno vlogo NLR pri proženju imunskega odgovora kot tudi v sinergističnem delovanju NLR s TLR v prirojeni imunosti. Zanimivo je tudi, da NLR najdemo tudi v rastlinah, kjer opravlja podobno vlogo (7, 9).

Domeno NOD so prvič odkrili na apoptotičnem proteaznem aktivirajočem faktorju 1 (APAF1) in njegovemu nematodnemu homologu CED-4, ki sta pomembna pri programirani celični smrti – apoptozi. Skozi iskanje nadaljnjih homologov APAF1/CED-4 so odkrili NOD1 in NOD2. Do sedaj je bilo v miškah odkritih 34 genov, ki kodirajo NLR, v človeku pa so do sedaj odkrili 23 NLR. Čeprav so NLR primarno prisotni v celicah imunskega sistema, jih lahko najdemo tudi drugje (na primer v epitelijskih celicah) (7, 9).

NLR definira značilna tripartitna zgradba, ki vsebuje:

- a) variabilno N – terminalno (efektorsko) domeno (bodisi kaspazno dopolnilno domeno – CARD, pirinsko domeno – PYD ali bakulovirus inhibitorno domeno (BIR)),
- b) centralno povezovalno domeno NOD (NACHT), ki ob aktivaciji sproži samo-oligomerizacijo in
- c) C – terminalno senzorično domeno, bogato z levcinom (LRR (angl. leucine rich repeat)), odgovorno za pripenjanje in detektiranje PAMP (9, 10).

1.3.1. VLOGA NOD1 IN NOD2 V GOSTITELJEVI OBRAMBI

NOD1 in NOD2 sta najbolje raziskana receptorja iz skupine receptorjev NLR. NOD1 se pojavlja v epitelijskih, imunskih in mnogih drugih vrstah celic (npr. jetrnih, mišičnih in maščobnih). Tako na primer v črevesnih celicah, ki vsebujejo majhno število receptorjev TLR, nadomešča njihovo vlogo in tako predstavlja neke vrste rezervni mehanizem za sproženje obrambnega odgovora. Študije kažejo, da je NOD1 v nekaterih primerih prav tako rezervni mehanizem pri pomanjkanju NOD2, čeprav raziskava van Heel-a in sodelavcev kaže nasprotno (11). NOD1 je ključen tudi pri obrambi želodca pred *Helicobacter pylori* (12). Za razliko od NOD1 pa je prisotnost NOD2 bistveno bolj omejena na imunske celice (npr. makrofage, dendritične celice in Panethove celice), a ga najdemo tudi v epitelijskih celicah črevesja in pljuč, kjer igra pomembno vlogo skupaj z NOD1. Oba spadata v skupino receptorjev, ki tvorijo nodosom ter sta edina receptorja NLR, ki lahko zaznata bakterijske peptidoglikanske ostanke, kar nato vodi v aktivacijo NF- κ B (jedrni faktor κ B, angl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), stresnih kinaz, interferon regulatornih faktorjev in avtofagijo. Sta pomembna aktivatorja procesa vnetja, s tem da je vnetni odgovor kontroliran s strani mnogih regulatorjev, ki ga ohranjajo pod nadzorom (13).

Rezultati raziskav kažejo, da imata NOD1 in NOD2 stransko vlogo tudi pri receptorjih TLR v prepoznavi bakterij in prispevanju k proizvodnji vnetnih in protimikrobnih molekul. Tako bi lahko bila NOD1 in NOD2 še posebej pomembna, kadar je delovanje receptorjev TLR odsotno ali oslabljeno (3). Prav tako so mnoge raziskave tudi pokazale, da je zaznava NOD1 specifičnih patogenov še posebej pomembna v celicah, kjer so receptorji TLR prisotni v manjšem obsegu (npr. v celicah prebavnega trakta) (3).

Prekomerna aktivacija ali nepravilno delovanje zaradi mutacij na genih za NOD1 ali NOD2 je povezano s številnimi vnetnimi nepravilnostmi. Mnoga kronična vnetja pa med drugim povzročajo tudi povečano tveganje za nastanek raka (6).

1.3.2. ZGRADA RECEPTORJEV NOD1 IN NOD2

Glede na variabilno N-domeno spadata NOD1 in NOD2 v NLRC skupino, torej v skupino, za katero je značilna na N-mesto pripeta domena CARD, pri čemer ima NOD2 dve domeni CARD (vezani eno za drugo), NOD1 pa le eno. Pri obeh je v osrednjem delu nato domena NACHT in na C-terminalnem koncu domena LRR (6, 8).

Kot vsi NLR spadata tudi NOD1 in NOD2 v skupino AAA+ (podaljšana ATPaza povezana z različnimi celičnimi aktivnostmi) ATP-azno družino proteinov, in sicer v skupino transdukcijskih ATP-az z mnogimi domenami (STAND (angl. signal transduction ATP-ases with numerous domains)). Skupna značilnost AAA+ proteinov je strukturno specifična ATP-azna domena, sestavljena iz oligoproteinskih ciklov, ki pretvori kemično energijo, pridobljeno z vezavo nukleotida in njegovo hidrolizo, v konformacijsko spremembo (14).

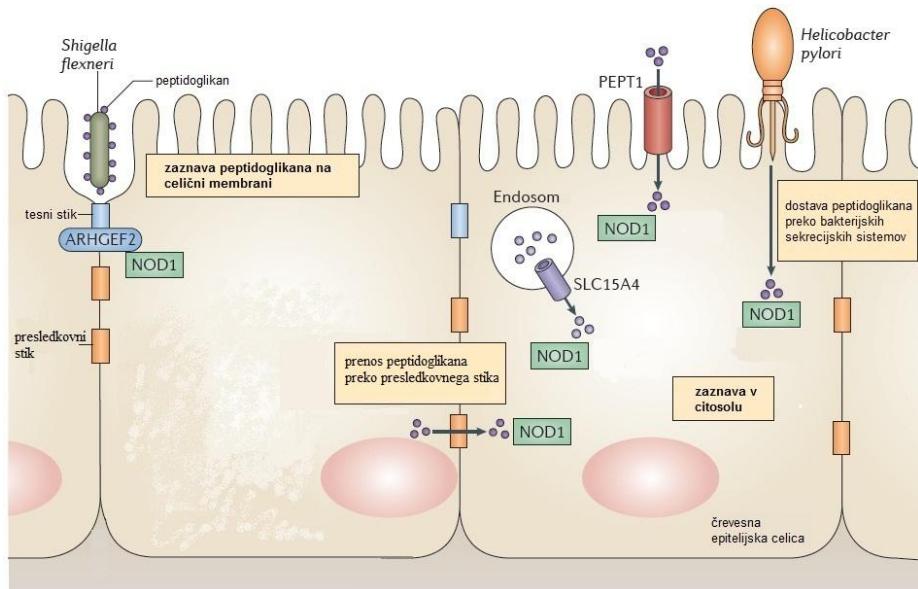
1.3.3. LIGANDI ZA NOD1 IN NOD2

PRR reagirajo na specifične DAMP in PAMP. Pri NOD1 in NOD2 so ugotovili, da prepoznata v celici prisotne ostanke peptidoglikana, ki je heterogeni polimer in ga najdemo v celični steni bakterij. NOD1 in NOD2 zaznata specifične peptidoglikanske ostanke, saj NOD2 prepozna muramil dipeptid (MDP – muramyl dipeptide), ki je značilen tako za peptidoglikan Gram-pozitivnih (npr. *Streptococcus pneumoniae* in *Listeria monocytogenes*) kot tudi Gram-negativnih bakterij (npr. *Salmonella typhimurium*) ter mikobakterij (npr. *Mycobacterium tuberculosis*), medtem ko je NOD1 v primerjavi z NOD2 veliko bolj specifičen, saj prepozna fragmente, ki vsebujejo diaminopimelinsko kislino (DAP (angl. diaminopimelic acid)), ki je skoraj izključno značilna za peptidoglikan Gram-negativnih bakterij npr. *Shigella flexneri* (3), *Pseudomonas aeruginosa* (3), *Campylobacter jejuni* (3), *Escherichia coli*, *Chlamydia spp*, *Propionibacterium acnes* (15), *Haemophilus influenzae* (15), *Neisseria gonorrhoeae* (16) in *Helicobacter pylori* (8, 17).

Ligand za NOD1, dipeptid D-Glu-mezo-DAP (iE-DAP), sicer primarno najdemo v Gram-negativnih bakterijah, a ga je vseeno nekaj tudi v Gram-pozitivnih (na primer *Listeria monocytogenes* in bakterijah vrste *Bacillus*). Čeprav so *in vitro* nesporno dokazali povezanost NOD1 v reguliranju zaznave določenih bakterij, je bil v *in vivo* raziskavah pomen NOD1 v gostiteljski obrambi manj očiten. Tako je NOD1 *in vitro* zaznal bakterije vrste *Chlamydia*, a se je v raziskavah pri okuženih miših pokazalo, da NOD1 ni izkazal prav nobene vidne vloge *in vivo* (3, 18).

Mehanizmi, s katerimi peptidoglikanski fragmenti vstopijo v gostiteljsko celico in tako aktivirajo NOD1 in NOD2, so še nepojasnjeni. Obstajajo sicer dokazi, da NOD1 agonisti

lahko vstopijo v citosol epitelijskih celic s pomočjo določenih bakterijskih toksinov, ki povzročajo v celicah gostiteljev pore. Dokazali so tudi, da lahko ligandi za NOD1 in NOD2 vstopajo v gostiteljsko celico tudi z endocitozo (preko membranskih veziklov) in epitelijskimi transporterji (npr. skozi oligopeptidni transporter PEPT1) (Slika 1). Povezava NOD1 s proteinom ARHGEF2 naj bi prenesla signal okužbe s patogeni, ki naj bi ciljali tesne stike npr. *Shigella flexneri*. Drug način je dostava peptidoglikana preko bakterijskih sekrecijskih sistemov kot ga ima npr. *Helicobacter pylori*. Izvor ligandov za NOD1 je lahko tudi endosom, od koder skozi prenašalec SLC12A4 pridejo v citosol (16).



Slika 1: Možna mesta vstopa ligandov NOD1: prizadeleno po (16)

1.3.4. POTEK ZAZNAVE IN PRENOS SIGNALA

Signalna pot, ki sledi zaznavi specifičnih ligandov za NOD1 in NOD2, je izjemno kompleksna in še vedno ne popolnoma razjasnjena, po drugi strani pa zelo pomembna za razumevanje delovanja receptorjev in za kasnejše iskanje primernih tarč za njihovo modulacijo. Po zadnjih raziskavah naj bi bila domena LRR na C-terminalnem koncu zadolžena za zaznavo specifičnih peptidoglikanskih ostankov, a za zdaj še niso uspeli pridobiti nobenih strukturnih podatkov, ki bi to nedvoumno potrdili. Dokazali so, da se na NOD1 in NOD2 domeno NACHT vežeta nukleotida (ATP in ADP), ki imata ATP-azno aktivnost, kar naj bi bilo ključno za aktivacijo in sledečo oligomerizacijo. NOD1 in NOD2 se po navadi nahajata v neaktivni obliki z vezanim ADP ali pa brez njega, pri čemer zavita domena LRR prekrije domeno NACHT in jo s tem deaktivira (14, 19).

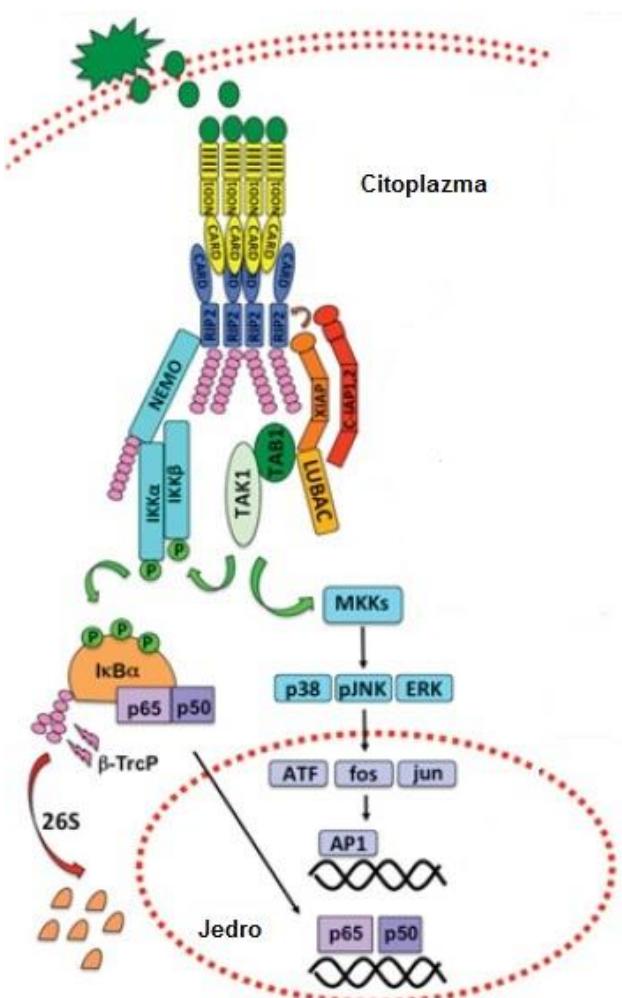
Ob prepoznavi specifičnega liganda ADP zamenja ATP, kar povzroči konformacijsko spremembo, ki ji sledi odkritje domene NACHT. Vezava ATP in njegova sledeča hidroliza

poganja proces samo-oligomerizacije, ki vodi v aktivno stanje NOD1/NOD2, pri čemer se zmanjša afiniteta do spremljevalnih proteinov (Hsp90 (protein toplotnega šoka 90, angl. heat shock protein 90)), ki kadar so vezani nanje, preprečujejo aktivacijo (14).

Ugotovili so, da se ob aktivaciji NOD1 in NOD2 pomakneta k membranskim predelom bogatim z aktinom (mesta bakterijskega vstopa), kar je zelo pomembno za aktivacijo NF-κB. Ta dognanja je še podkrepilo odkritje, da receptor interagirajoči protein 2 (RIP2 (angl. receptor interacting protein 2) tudi serin-treoninska/tirozinska kinaza), ena od komponent NOD signalne poti (nodosoma), prav tako potuje k plazemski membrani, in da je njegova aktivnost odvisna od njegove lokacije v celici. Čeprav je lokalizacija ob celični membrani pomembna in lahko pripomore do najmočnejšega odgovora, pa ni nepogrešljiva, saj se signaliziranje lahko vrši tudi z drugih regij (18, 20).

Strukturne spremembe na NOD1 in NOD2 omogočijo tvorbo poliubikvitinacijskega signalnega kompleksa ali nodosoma in sicer preko CARD-CARD interakcije z RIP2, kjer se

na molekulske nivoje stekata signalni poti NOD1 in NOD2. To sproži proces ubikvitinacije in tako omogoči tvorbo linearne ubikvitinskega kompleksa (LUBAC). Poliubikvitinacija RIP2 je pomembna, saj pritegne povezovalne proteine TAB1/2/3 in njim pripadajoče kinaze, kot je na primer β aktivirana kinaza 1 (TAK1), ki skupaj s TAB1 tvori TAB1/TAK1 kompleks. RIP2 se nato direktno veže na NF-κB esencialni modulator (NEMO) (ali esencialni modulator NFκB kinaze γ (IKK γ)), ki je regulatorni protein IKK kompleksa. Domnevajo, da se TAK1 aktivira z avtofosphorilacijo in nato stimulira IKK kompleks, vključujuč poli-ubikvitinacijo na NEMO in ga tem aktivira. IKK kompleks sestoji še iz IKK α in IKK β . Aktivaciji IKK γ sledi fosforilacija IKK β , kar vodi v fosforilacijo NF-κB inhibitorja I κ B α . Nato sledi ubikvitinacija NF-κB inhibitorja I κ B α , kar vodi v razpad proteina s proteasomom, to pa sprosti NF-κB. NF-κB nato odpotuje v jedro, kjer



Slika 2: Prenos signala preko NOD1: prizrejeno po (13)

aktivira tarčne gene in s tem vnetni odgovor (Slika 2) (3, 14, 18, 21, 22).

Podobno kot za NF-κB sta TAK1 in RIP2 potrebna tudi za aktivacijo MAPK, a tu potek še ni dovolj raziskan. Preko NF-κB in MAPK je sprožen močan vnetni odziv, saj aktivacija NOD1 in NOD2 povzroči sproščanje vnetnih citokinov in kemokinov ter produkcijo protimikrobnih peptidov (3).

Poleg aktivacije NF-κB in MAPK naj bi NOD1 in NOD2 aktivirala še nekatere druge mehanizme, npr. apoptozo. Prav tako so ugotovili, da NOD1 in NOD2 sodelujeta tudi pri tvorbi inflamasomov, kar je sicer v domeni inflamasomske skupine NLR (23).

NOD1 in NOD2 lahko z aktivacijo NO sintaze in NADPH oksidaze sprožita tvorbo protimikrobnih reaktivnih kisikovih in dušikovih zvrsti. Čeprav so ligandi NLR zmožni povzročiti vnetni odziv, v katerem se sproščajo vnetni citokini in kemokini, protimikrobni peptidi ter reaktivne kisikove in dušikove zvrsti, pa mnoge raziskave kažejo, da to ni dovolj za zadosten imunski odgovor (14).

1.3.5. PROTEINI NOD IN BOLEZNI

Nepravilno delovanje NLR je povezano z mnogimi tveganji za bolezni. Človeški NOD1 in NOD2 kodirata gena *CARD4* in *CARD15*. Mutacije na teh dveh genih povzročijo nepravilno funkcijo oba proteinov, kar je povezano s številnimi boleznimi, od kroničnih vnetnih nepravilnosti, avtoimunskeih bolezni pa vse do raka. Glede na aktivnost NF-κB lahko delovanje NOD1 in NOD2 opredelimo kot prekomerno ali oslabljeno. Tako lahko na primer ob oslabljenem delovanju receptorjev NLR ostanejo nezaznani specifični ligandi, zaradi česar ne pride do imunskega odgovora, ali pa ob prekomernem delovanju ustvarijo vnetno mikrookolje, ki spodbuja k nastanku raka (15). Prav tako ne sme biti spregledan nivo ubikvitinacije in fosforilacije, saj ni nujno, da nepravilno delovanje proteinov izhaja le iz mutacij njihovih genov ampak tudi zaradi nepravilnosti ostalih molekul v signalni poti (12, 14, 21).

1.3.5.1. Bolezni povezane z NOD1

Kljub podobnosti med NOD1 in NOD2 pa mutacije na NOD2 veliko pogosteje vodijo v razvoj bolezni, zato domnevajo, da imata različen način aktivacije. Ugotovili so tudi, da ima NOD1 zaščitno vlogo pri razvoju raka, saj naj bi imel tudi tumor-supresorsko funkcijo (24). Veliko polimorfizmov pri NOD1 naj bi bilo povezanih z mnogimi tipi malignih obolenj, npr. rakom črevesja, jajčnikov, prsi (23, 25), prostate (26) in pljuč, pa tudi z limfomom (13).

Čeprav so mehanizmi, ki povezujejo polimorfizme NOD1 z boleznimi, za sedaj še neznani, pa so raziskave ugotovile, da napake v NOD1 povečajo dovzetnost za astmo, ekcem, sarkoidozo in vnetne črevesne bolezni ter vodijo do preobčutljivostnih bolezni (21). Pri boleznih, kot sta astma in vnetje črevesja, sklepajo, da naj bi zaradi polimorfizmov prišlo do spremenjene domene LRR na NOD1, ki naj bi preprečevala polno aktivnost NOD1 (12, 13, 27).

Za NOD1 je značilno, da je prisoten v bistveno več tipih celic kot ostali receptorji PRR. Zadnja dognanja med drugim tudi kažejo na sodelovanje NOD1 v vnetjih adipoznega tkiva pri diabetesu tipa 2, v vnetjih žilnega endotelija ob prisotnosti patogena, pa tudi pri vnetju oči in celo vnetju fetusa (13, 21). Ugotovili so tudi, da prekomerna aktivacija NOD1 vpliva na razvoj multiple skleroze ter da so agonisti NOD1 povzročili koronarni artritis, inzulinsko rezistenco in vnetje maščobnega tkiva, čeprav so odmerki agonista povzročili le majhno spremembo nivoja citokinov (13, 14). Prav tako je dajanje agonistov NOD1 miškam sprožilo vaskulitis, podobno kot pri Kawasakievi bolezni (13) ter vnetje očesa (27).

1.3.6. REGULACIJA NOD

Zavrta ali premočno aktivirana vnetna reakcija lahko vodi do potencialno škodljivih učinkov, zato mora biti signalna kaskadna pot, ki sledi aktivaciji receptorjev NOD1 natančno regulirana. Modulacija v katerokoli smer bi lahko porušila nežno ravnotesje in vodila do resnih infekcijskih bolezni ali na drugi strani do kroničnih vnetnih in avtoimunskih bolezni (14).

Ker receptorji NLR aktivirajo signalne poti, ki lahko vodijo v prekomeren vnetni odgovor, se negativni regulaciji (supresija) daje večji pomen.

1.3.6.1. Terapevtski potencial antagonistov NOD1

Znotraj prirojenega imunskega sistema obstaja več možnih tarč za zaviranje signalne poti NOD1, a jih je potrebno izkoristiti z veliko mero previdnosti, saj je ta del imunskega sistema izjemno pomemben pri obrambi, vnetju in apoptozi. Natančen in dobro nadzorovan vpliv na delovanje prirojenega imunskega sistema ima velik potencial pri zdravljenju kroničnih vnetnih in avtoimunskih bolezni, katerih vzrok leži v prekomerni aktivaciji NF- κ B. Če vemo, da prekomerno delovanje NLR trenutno zdravimo z jemanjem širokospikalnih protivnetnih učinkovin, ki imajo mnogokrat močne stranske učinke, bi bil razvoj specifičnih zaviralcev receptorjev NLR še kako dobrodošel. Pri tem bi bilo zaviranje NOD1 (in tudi NOD2) ključno, saj le-ta direktno aktivirata NF- κ B (14).

Zaviralci NOD1 bi bili uporabni v zdravljenju prekomernega vnetja povezanega s kardiovaskularnimi, črevesnimi in presnovnimi boleznimi. Nekaj tipov raka naj bi bilo povezanih z mutacijo na NOD1, a bi bilo potrebno k stvari pristopati z veliko previdnostjo, saj NOD1 sam deluje tudi protitumorno in če mu zraven še pripišemo vlogo pri zaznavi potencialnih kancerogenih povzročiteljev (*Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*), bi lahko antagonisti NOD1 le pospešili razvoj bolezni (14, 24).

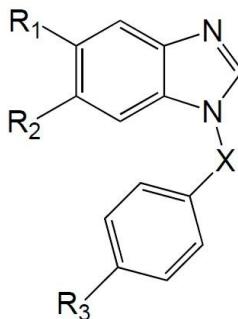
Po drugi strani pa bi zavrtje aktivnosti NOD1 lahko vodilo v oslabitev gostiteljeve obrambe, kar dviga največ pomislekov glede varnosti. Pričakuje se, da bolj kot bi učinkovina vplivala na tarčo locirano višje v signalni poti za NF- κ B, manj bi bilo vpliva na ostale mehanizme pripojenega imunskega sistema, kar bi bilo pomembno za bolezni, kjer je udeležena specifična tarča. Pri zaviranju receptorjev NLR je potrebno vzeti v obzir tudi medsebojno vplivanje receptorjev NLR in ostalih PRR-jev (npr. NLR in TLR). Nenazadnje pa bi specifični antagonisti predstavljalni tudi koristno orodje za pojasnitev vlog posameznih proteinov v akutnih in kroničnih vnetnih boleznih. (14, 27, 28).

1.3.7. ZAVIRALCI PRENOSA SIGNALA PRI NOD1 IN NOD2

Leta 2009 so se Magnuson in sodelavci lotili iskanja majhnih molekul, ki bi lahko vsebovale selektiven antagonističen učinek na NOD1. Glavni cilji so bili najti spojino z inhibitorno koncentracijo (IC_{50}) $< 1 \mu\text{M}$ ter petkratno selektivnostjo proti NOD2 in desetkratno proti TNF- α . Pri rešetanju banke z 290.000 spojinami so na koncu ugotovili, da nekateri predstavniki indolinov, tetrahidroizokinolinov, purin-2,6-dionov (ksantini) in benzimidazolov dosegajo zastavljene kriterije (14, 17, 28, 29). Analiza odnosa med strukturo in delovanjem (SAR (angl. Structure-Activity Relationship) analiza) serij spojin z benzimidazolnim skeletom je pokazala (Slika 3):

- prisotnost NH_2 skupine na poziciji je Y nujna, saj njena zamenjava (z SH, Me ali H) povzroči neaktivnost spojine,
- zamenjava vodika na mestih R_1 in R_2 z metilno skupino povzroči popolno izgubo učinka,
- ob uporabi različnih distančnikov na mestu X (npr. sulfonilnimi, karbonilnimi, metilenskimi) so ugotovili, da je prisotnost sulfonilne skupine najbolj ugodna za zaviralno aktivnost in je tudi ključna za selektivnost napram NOD2,
- stereoelektronska narava substituenta na mestu R_3 močno vpliva na aktivnost. Pri tem je na primer 4-kloro substituent na aromatskem obroču izkazoval šestkrat večjo

učinkovitost kot 4-metilni substituent na aromatskem obroču. Tudi ostali substituenti so napram klorovemu imeli manjšo učinkovitost (14, 17, 28).



Slika 3: Splošna struktturna formula 2-aminobenzimidazolov

Spojina noditinib-1 ($R_1=R_2=H$, $R_3=Me$; $Y=NH_2$; $X=SO_2$) se je izkazala za necitotoksično ter kot dober zaviralec aktivnosti od NOD1 aktivirane NF- κ B ($IC_{50}<1\mu M$). Izražala je 36-krat večjo selektivnost proti od NOD2 ali TNF- α posredovane aktivacije NF- κ B ter je tako zadostila vsem zahtevanim kriterijem. Poleg tega je izkazovala izjemno selektivnost proti več kot 400 različnim kinazam. Tako je noditinib-1 bil spoznan kot prvi selektivni antagonist NOD1, benzimidazoli pa prva generacija selektivnih antagonistov NOD1 (14, 27, 29).

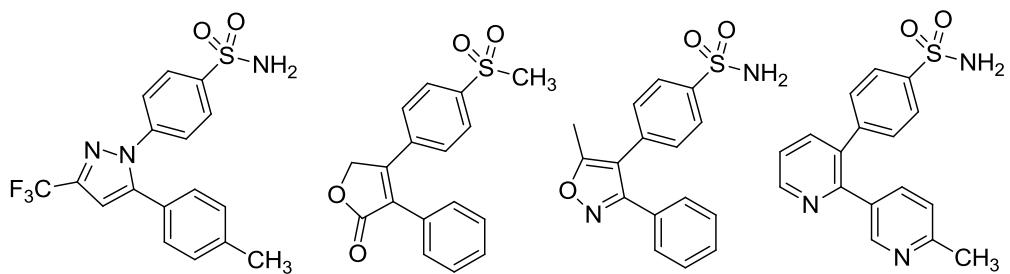
1.4. SKELETNI PRESKOK

Fizikalno-kemijske lastnosti, pa tudi aktivnost spojine niso odvisne le od prisotnih funkcionalnih skupin, ampak tudi od trga, kako so le-te razporejene v prostoru. To je še posebno pomembno, kadar je molekula predmet prileganja v asimetričnem prostoru, kakor so to proteini ali mnoge druge biološke makromolekule v naravi. Če ključne funkcionalne skupine ne zasedajo primarnih regij na vezavnem mestu določene makromolekule, potem vezava nanjo ni možna (30).

Ko odkrijejo prvi zadetek za določeno tarčo, ji mnogokrat manjka dobra učinkovitost in boljše farmakokinetične ter farmakodinamične lastnosti, ki bi omogočile nadaljnja testiranja. Mednje bi med drugim šteli neželene učinke, fizikalno-kemijske lastnosti, druge faktorje, ki vplivajo na biorazpoložljivost. Te neželene značilnosti so lahko rezultat prisotnosti specifičnih funkcionalnih skupin v molekuli. Z namenom zmanjšanja ali odprave neželenih značilnosti je potrebno spremeniti spojino tako, da le-ta pri tem ne bi izgubila želenega biološkega učinka. Zamenjava (ali poprava) funkcionalnih skupin z drugimi skupinami, ki imajo podobne značilnosti, se imenuje izosterna zamenjava ozziroma bioizosterna zamenjava (30).

Široko gledano bioizosterija vključuje tudi zamenjavo začetnega osnovnega molekulskega skeleta že znane aktivne učinkovine z nekim drugim, pri čemer se biološka aktivnost ne spremeni, ohrani se vezava na isto tarčo, lahko pa se izboljšajo nekatere njene značilnosti (npr. topnost, toksičnost, metabolizem). Ta pristop imenujemo skeletni preskok (angl. scaffold hopping). Lep primer za to so molekule celekoksiba (**I**), rofekoksiba (**II**), valdekokksiba (**III**) in etorikoksiba (**IV**) (Slika 4), ki vse, čeprav vsaka vsebuje drugačen centralni 5/6-členski

obroč, kažejo enak biološki odgovor kot selektivni inhibitorji ciklooksigenaze 2 (COX-2) (30, 31, 32, 33).



Slika 4: Skeletni preskok na primeru celekoksiba (**I**), rofekoksiba (**II**), valdekoksiiba (**III**) in etorikoksiba (**IV**)

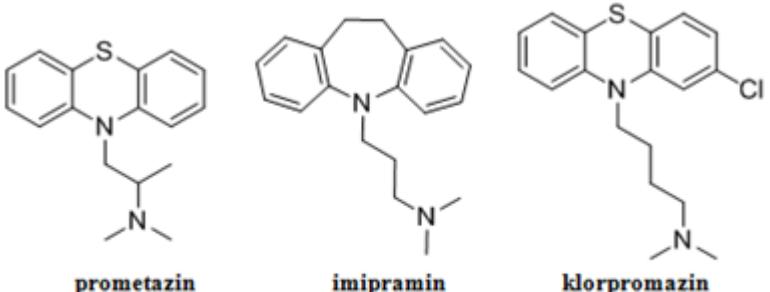
Zamenjava osrednjega dela molekule je lahko zaželena iz več razlogov:

- zamenjava lipofilnega ogrodja z bolj polarnim lahko poveča topnost substance,
- zamenjava metabolno labilnega ogrodja z bolj stabilnim ali manj toksičnim lahko izboljša farmakokinetične značilnosti. Izkušnje namreč kažejo, da toksičnost ali drugi neželeni učinki mnogokrat izvirajo iz samega ogrodja molekule, tako imajo na primer nekateri piridini in imidazoli lahko neželene učinke ob vezavi na citokrom P450, nekateri aminotiazoli pa so metabolno nestabilni,
- zamenjava zelo fleksibilnega ogrodja (kot je na primer peptidno) z bolj rigidnim lahko zelo poveča afiniteto vezave in na splošno izboljša metabolizem,
- včasih je osrednje ogrodje prav tako udeleženo v vezavo na tarčo, zato s spremembami lahko povečamo tudi afiniteto vezave,
- olajša se lahko sinteza,
- sprememba osrednjega ogrodja lahko privede do odkritja novih, še nepatentiranih učinkovin (34, 35).

Glavna poudarka skeletnega preskoka sta: drugačna osrednja struktura in podobna biološka aktivnost napram izhodni molekuli. A vprašanje, ki se postavlja je, kako zelo drugačna mora biti nova molekula od izhodne, da ji lahko pripišemo preobrazbo s skeletnim preskokom? Z drugimi besedami, kako zelo novo je že novo? Boehm in sodelavci so klasificirali dva osnovna skeleta kot različna, če je bila uporabljenova sintezna pot, pri čemer ni bilo pomembno, kako velika je bila sprememba. Sun in sodelavci so koncept skeletnega preskoka poenostavili, pri čemer so se osredotočili na stopnjo spremembe nove molekule napram izhodni. Majhne spremembe, kot je zamenjava ogljikovega atoma in heteroatoma, spadajo v 1° stopnjo, odpiranje in zapiranje obroča pa v 2° stopnjo. Zamenjava peptidnega skeleta z

nepeptidnim spada v 3° stopnjo in popolna sprememba molekule, ki vseeno ohrani podobno biološko aktivnost, v 4° stopnjo (31).

Eden od stebrov farmacevtske kemije je princip sorodnosti, ki govori, da strukturno sorodne substance kažejo podoben biološki odgovor, saj vplivajo na isto makromolekulsko tarčo. Potem takem bi pomenilo, da bolj kot sta si dve kemični strukturi različni, manj verjetno bosta imeli enak biološki odgovor. To sicer mnogokrat drži, a ne vedno. Tako prometazin, imipramin in klorpromazin, ki so strukturno sorodne snovi interagirajo s povsem drugimi receptorji in dajejo tako povsem drugačen biološki odgovor, kot H1-antagonist, inhibitor privzema serotonina in noradrenalina in dopaminski antagonist (Slika 5) (30, 34).

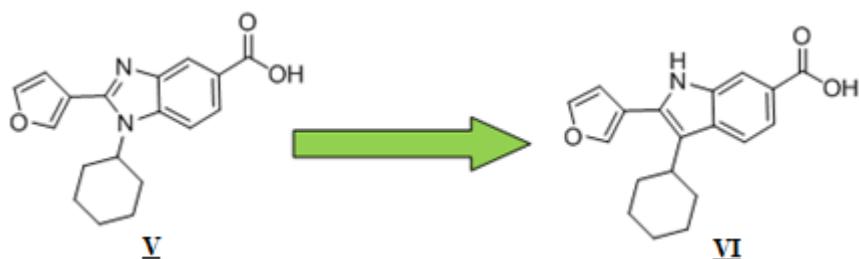


Slika 5: Strukturno podobne spojine, ki pa dajejo drugačen biološki odgovor

Pa vendar, ali to pomeni, da ni racionalnih temeljev za skeletni preskok? Strokovnjaki so s pomočjo molekulskega modeliranja in kemoinformatike poskušali rešiti to vprašanje tako, da so poskušali z matematičnimi algoritmi sestaviti računalniške programe in metode, s katerimi bi lahko pojasnili paradoks skeletnega preskoka in ga logično umestili v bioizosterni proces. Izmed vseh tehnik, ki jih uporabljajo računalniški programi, je mogoče opaziti štiri glavne: a) enakost oblike, b) iskanje farmakofora, c) zamenjava fragmenta in d) iskanje podobnosti. Večina programov pa ponuja kombinacije večih pristopov (34).

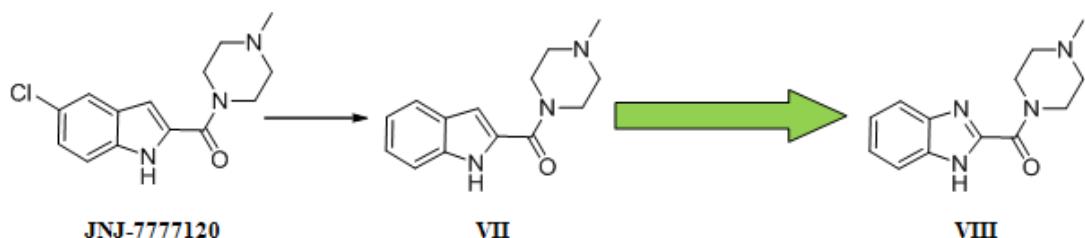
1.4.1. SKELETONI PRESKOK Z BENZIMIDAZOLNEGA NA INDOLNI SKELET

Zamenjava benzimidazolnega skeleta z indolnim (Slika 6) je bila že večkrat uporabljeni in preizkušena. Tako so Beaulieu in sodelavci želeli izboljšati (znižati) inhibitorno koncentracijo spojine vodnice (z benzimidazolnim osnovnim skeletom), ki je inhibirala RNA polimerazo NS5B (nestruktturni protein 5B (angl. nonstructural protein 5B) pri okužbi z hepatitisom C. Prišli so do zaključka, da je potrebno povečati lipofilnost učinkovine, zato so bolj hidrofilni benzimidazol v spojni **V** (Slika 10) ($\log P = 3,4$) zamenjali z bolj lipofilnim indolom, (Slika 10, **VI**) ($\log P = 4,4$), kar je opazno znižalo inhibitorno koncentracijo (z $1,1 \mu\text{M}$ na $0,03 \mu\text{M}$). Slednje so pripisali predvsem večji membranski permeabilnosti (36).



Slika 6: Zamenjava benzimidazolnega skeleta z indolnim je močno znižala inhibitorno koncentracijo

Podobno so naredili tudi Schneider in sodelavci, ki so iskali inverzne agoniste za histaminski receptor H₄, pri čemer so sintetizirali 25 novih spojin, ki so bile struktурno sorodne spojini vodnici, **JNJ-7777120** (1-((5-kloro-1H-indol-2-il)karbonil)-4-metil-piperazin) (Slika 7) tako, da so poleg različnih substituentov menjali tudi osnovni skelet, pri čemer so indolni skelet zamenjali z benzimidazolnim ali tienopirolnim ter primerjali spremembe afinitete na receptor. Indolni skelet je v primerjavi z benzimidazolnim ob enakih ligandih kazal večjo afiniteto pri večini razen pri enem primeru. Ob zamenjavi indolnega skeleta z benzimidazolnim pa se učinkovitost ni bistveno spremenila. Poudarili pa so, da oba uspešno stabilizirata neaktivno konformacijo triptofana na receptorju, zato imata obe spojini podoben učinek (37).



Slika 7: Na podlagi spojine vodnice (**JNJ-7777120**) sintetizirane nove spojine z indolnim skeletom (**VII**) so kazale večjo afiniteto kot z benzimidazolnim (**VIII**)

Včasih sta obe ogrodji prisotni pri učinkovinah, ki delujejo na isti receptor. Tako sta indolni in benzimidazolni skelet pomembni ogrodji pri agonistih kanabinoidnega receptorja 2 (CB2), saj njuni derivati kažejo veliko vezavno afiniteto in dobro selektivnost napram CB1 (38).

Indolni in benzimidazolni skelet sta večkrat nastopala vzporedno kot potencialni novi ogrodji za že znane učinkovine. Tako sta na primer Ohemeng in Roth poskušala na podlagi že znanih inhibitorjev dihidrofolat reduktaze (diaminopirimidinov) z uporabo indolnega ali benzimidazolnega skeleta pridobiti nove inhibitorje za dotični encim, kjer se je izkazalo, da je spojina vodnica še vedno bila dvakrat boljši inhibitor kakor najboljša na novo sintetizirana spojina (39). Takeuchi in sodelavci pa so iskali nove trombinske inhibitorje, pri čemer so spojini vodnici zamenjali benzotiofen z indolnim, azoindolnim in benzimidazolnim. Ugotovili so, da je bila pri 1,2-disubstituiranemu indolu inhibitorna aktivnost dvakrat višja, pri 1,2-disubstituiranem benzimidazolu pa desetkrat nižja kot pri kot pri spojini vodnici (2,3-disubstituiran benzotiofen) (40). Razlog naj bi bila večja hidrofobnost indola kot ostalih heteroaromatov, kar bolje ustreza mestu hidrofobnemu S₁ mestu na trombinu.

1.5. BIOIZOSTERNE ZAMENJAVE

Bioizosteri so substituenti ali skupine s podobnimi fizikalnimi ali kemijskimi značilnostmi, ki izražajo podobne biološke značilnosti. Koncept izosterije temelji na zamenjavi atoma ali skupine atomov, ki prinaša enake fizikalno-kemijske značilnosti v biološko aktivni molekuli (41, 42).

Pri razvoju učinkovin želimo z bioizosterijo:

- okrepliti želene biološke ali fizikalne značilnosti, brez velikih sprememb v kemijski strukturi,
- zmanjšati toksičnost,
- prilagoditi aktivnost učinkovine,
- in spremeniti metabolizem učinkovine (42).

Z bioizosteri sicer vplivamo na isto biološko tarčo, a kar deluje kot dobra bioizosterna skupina na enem biološkem sistemu (ali receptorju) ni nujno, da se bo izkazala kot dobra izbira tudi na drugem sistemu. Ne obstajajo nobena pravila in hitre poti, ki bi določale katera bioizosterna zamenjava bo delovala pri izbrani molekuli, a vseeno obstajajo določene tabele in primeri, ki kažejo, da je posplošitev do neke mere vseeno možna (41).

Leta 1919 je Langmuir prvič pisal o konceptu kemijske izosterije, s katerim je opisal podobnosti v fizikalnih značilnostih med atomi, funkcionalnimi skupinami, radikali in molekulami. Po Langmuirju imajo izosterne skupine enako število elektronov in enako število protonov. Leta 1925 je bil objavljen Grimmov zakon hidridnih zamenjav, ki pravi, da dodatek vodika k atomom dà nastalemu pseudoatomu značilnosti atoma, ki je v sosednji desni skupini. Dodani vodikovi atomi ohranjajo število valenčnih elektronov, ki je značilna za posamezno skupino. Znotraj stolpca pa so posamezni pseudoatomi izosterne zamenjave drug za drugega (41).

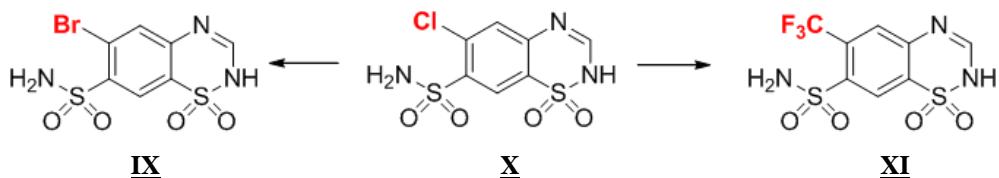
Bioizosterne skupine lahko delimo na dve kategoriji – klasični in neklasični bioizosteri. Funkcionalne skupine, ki ustrezajo osnovnim pogojem izosterov (Langmuir, Grimm) uvrščamo med klasične bioizostere. Za neklasične bioizostere pa ne veljajo sterične in elektronske definicije, saj nimajo nujno enakega števila atomov kot substituent. Nekatere skupine oponašajo prostorsko razporeditev, elektronske značilnosti ali kakšne druge fizikalno kemijske značilnosti molekule oziroma funkcionalne skupine, ki je ključna za biološko aktivnost (41, 42).

C	N	O	F	Ne	Na
	CH	NH	OH	FH	-
		CH ₂	NH ₂	OH ₂	FH ₂ ⁺
			CH ₃	NH ₃	OH ₃ ⁺
				CH ₄	NH ₄ ⁺

Preglednica I: prikaz Grimmovega zakona

Med klasične bioizosterne zamenjave za klor spadajo med drugim: fluor, brom, trifluorometil in ciano skupina. Čeprav ima elektronondonorske lastnosti je metilna skupina prav tako tipična zamenjava za klor vezan na aromatski obroč (41, 43, 44)

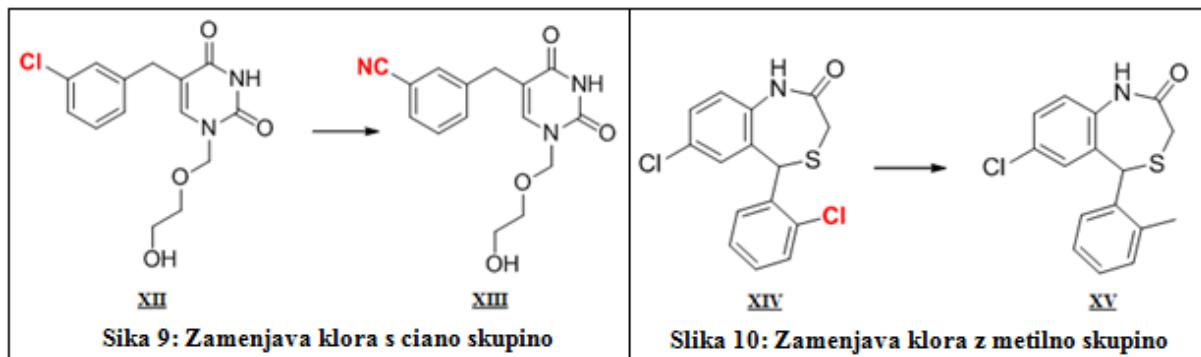
Primer zamenjave klorja z bromom ali s trifluorometilno skupino je klortiazid (Slika 8, spojina **X**). Za vsako od zamenjav ostajajo elektronske in hidrofobne značilnosti relativno konstantne, medtem ko se velikost vsake od skupin močno razlikuje.



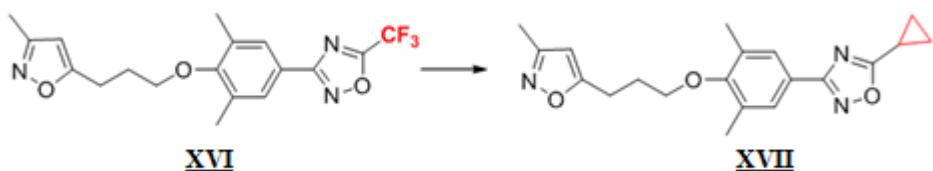
Slika 8: Zamenjava klorja z bromom (**IX**) in trifluorometilno skupino (**XI**)

Zamenjavo klorja s ciano skupino lahko zasledimo pri 1-[(2-hidroksietoksi) metil]-5-(2-klorobenzil)uracilu (Slika 9, **XII**), ki je inhibitor uridinske fosforilaze, kjer so poskušali dokazati, da zamenjava klorja z bolj močno elektronakceptorsko skupino na mestu 3 na benzenovem obroču, zmanjša učinkovitost spojine (42).

Zamenjava klorja z metilno skupino na benzenovem obroču 7-kloro-5-(2-klorofenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3H)-on-a (Slika 10, **XIV**) je pri nastali spojini **XV** še povečala nevroprotективno vlogo (45).



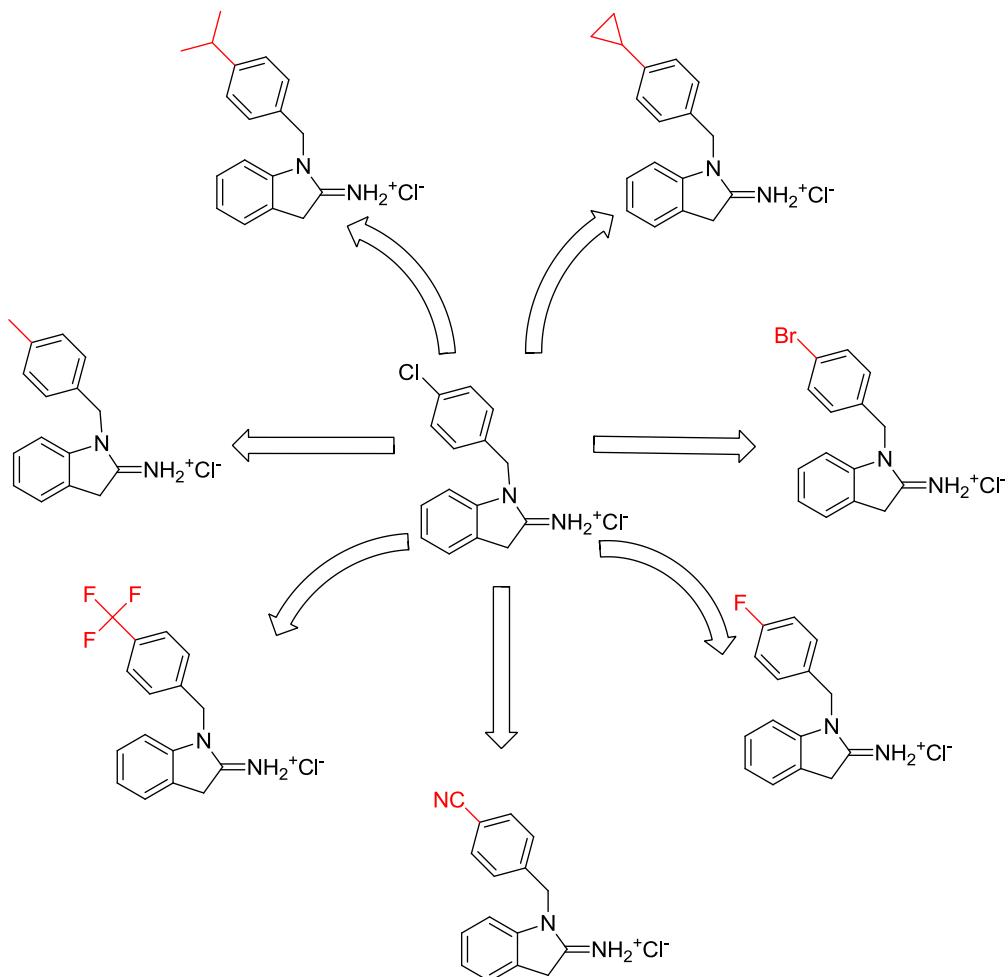
Med neklasične zamenjave spada izopropilni substituent, ki je ena izmed običajnih zamenjav za metilno skupino ter tako tudi posredno substituent za klor (44). Med neklasične susbsituente spada tudi ciklopropilni substituent, za katerega v literaturi direktne zamenjave s klorom nismo zasledili, smo pa našli zamenjavo CF₃ skupine na spojini XVI s ciklopropilno skupino (Slika 11, **XVII**). Diana in sodelavci so ugotovili, da zamenjava trifluorometilne skupine s ciklopropilno na mestu 5, izboljša metabolno stabilnost oksadiazola (46).



Slika 11: Zamenjava trifluorometilne skupine s ciklopropilno

2. NAMEN IN NAČRT ZA DELO

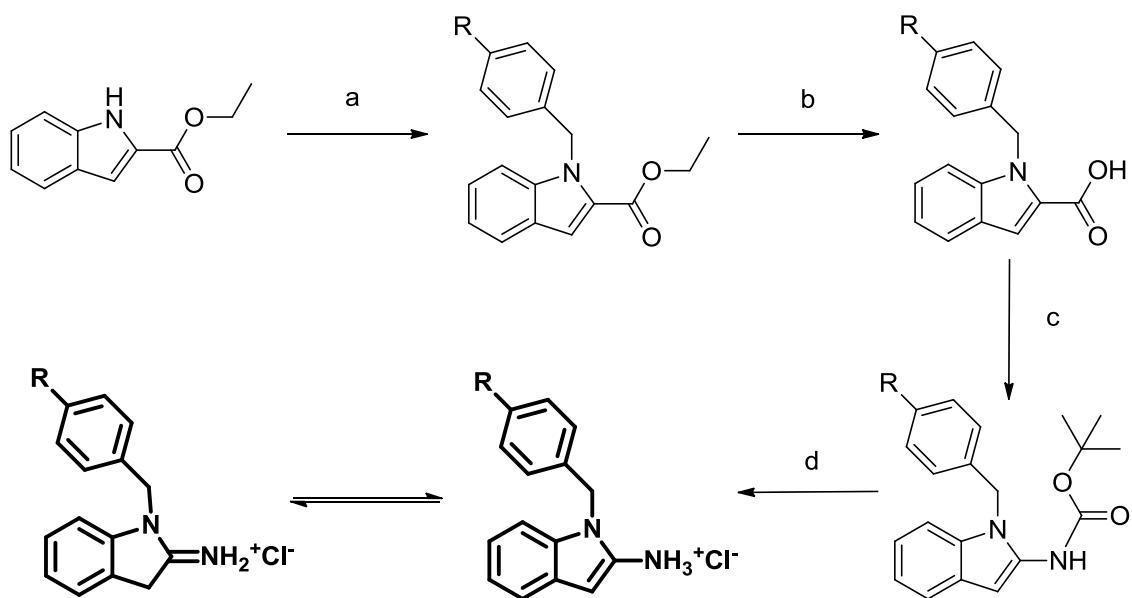
Na osnovi številnih primerov uspešne zamenjave benzimidazolnega skeleta z indolnim smo se tudi mi odločili za to zamenjavo, pri čemer smo se še oprli na rezultate iz diplomske naloge Aleksandre Pekošak in si za spojino vodnico izbrali 1-(4-klorobenzil)-1H-indolin-2-iminijev klorid, ki se je v njeni diplomski nalogi izkazal kot dober antagonist receptorja NOD1, kjer je v nižjih koncentracijah (5 in 10 μM) dosegel celo nižjo rezidualno aktivnost kot prvi selektiven NOD1 antagonist noditinib-1, a je žal bil pri standardnih izmerjenih koncentracijah (25 μM) citotoksičen. Naš namen v okviru te magistrske naloge bo s pomočjo bioizosternih zamenjav za klor (fluor, brom, izopropilna, metilna, trifluorometilna, ciano in ciklopropilna skupina) poskusiti sintetizirati 7 novih spojin (Slika 12) s katerimi bomo poskušali odpraviti citotoksične lastnosti in obenem ohraniti ali celo izboljšati antagonistični učinek. Spojinam bodo nato izmerili antagonistični učinek na celični liniji Ramos-BlueTM ter jim določili zaviralno aktivnost (47).



Slika 12: Spojina vodnica in naše načrtovane končne spojine

2.1. REAKCIJSKA SHEMA

Shema 1: Potek sinteznega postopka



a: K_2CO_3 ali Cs_2CO_3 , acetonitril, 4-R-benzil bromid ($\text{R} = \text{CH}_3, \text{CF}_3, \text{CN}, \text{Br}, \text{F}$ ali izopropilna skupina)

b: etanol, 1M KOH

c: *terc*-butanol, trietilamin, difenilfosforil azid (DPPA), molekulska sita (4 \AA)

d: dietileter, $\text{HCl}_{(\text{g})}$

R: $\text{CH}_3, \text{CF}_3, \text{CN}, \text{Br}, \text{F}$, izopropilna ali ciklopropilna* skupina

*pri sintezi ciklopropilnega derivata smo izhajali iz 1-(4-bromobenzil)-1H-indol-2-karboksilata

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

▪ Reagenti in topila

Pri eksperimentalnem delu v laboratoriju smo uporabljali kemikalije in topila naslednjih proizvajalcev: Acros Organics (Belgija), Carlo Erba (Italija), Gram-mol (Hrvaška), Fluka (Švica), Janssen (ZDA), Merck (Nemčija), Panreac (Španija) ter Sigma-Aldrich (ZDA). Reagenti, ki smo jih uporabili so bili sledeči: 1H-indol-2-karboksilat, K₃PO₄, ciklopropil boronsko kislina, tricikloheksilfosfin, 4-izopropilbenzil bromid, 4-metilbenzil bromid, 4-trifluorometilbenzil bromid, 4-cianobenzil bromid, 4-bromobenzil bromid, 4-fluorobenzil bromid, *terc*-butanol, kalijev hidroksid, DPPA, K₂CO₃, Cs₂CO₃, trietilamin, nasičena raztopina HCl, nasičena raztopina KOH, HCl_(g), Ar_(g), paladijev acetat (Pd(OAc)₂) ter acetonitril.

Pri sinteznem delu ter izolaciji pa smo potrebovali še naslednja topila: diklorometan, dietileter, etanol, etilacetat, heksan, metanol, nasičeno raztopino NaCl, toluen ter destilirano vodo.

▪ Laboratorijska oprema

- magnetno mešalo z grelnikom : IKA Labortechnik RCT basic
- rotavapor : Büchi Rotavapor R-114 ter Büchi Waterbath B-480, Švica
- tehnica : Mettler Toledo PG 803
- analitska tehnica : Mettler Toledo AG245
- UV svetilka : Lamag UV-CABINET II, Nemčija
- žarilna pištola : SKILL 1800 Watt
- sušilnik : Instrumentaria sterimatic ST-11

▪ Nomenklatura in risanje spojin

Za risanje in poimenovanje spojin smo uporabili računalniški program ChemBioDraw Ultra 12.0, proizvajalca CambridgeSoft.

3.2. METODE

3.2.1. KROMATOGRAFSKE METODE

▪ Tankoplastna kromatografija

Tankoplastno kromatografijo (TLC) smo izvajali na kromatografskih ploščicah Silica gel 60 F₂₄₅, z 0,22 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu velikosti 20 x 20 cm, proizvajalca Merck (Nemčija). Za mobilno fazo smo uporabili različna topila in v različnih razmerjih. S pomočjo tankoplastne kromatografije smo spremljali potek reakcij (zaznava konca reakcije) ter jo neposredno uporabljali pri kolonski kromatografiji, ko smo nastale produkte čistili. Pri detekciji spojin na kromatografskih ploščicah smo uporabili UV svetilko, z valovnima dolžinama $\lambda=254$ nm in $\lambda=366$ nm. Ob tem smo uporabili orostitvena reagenta ninhidrin ter bromkrezolno zeleno. Z ninhidrinom smo zaznali amine in karbamate, z bromkrezolno zelenim pa kisline.

▪ Kolonska kromatografija

Kolonsko kromatografijo smo izvajali s pomočjo steklene kolone. Stacionarna faza v postopku je bil Flash silikagel velikosti 0,04 – 0,063 mm, proizvajalca Merck (Nemčija). Mobilna faza pa bil heksan/etilacetat (He/EtAc) v razmerju 5:1. Pri ločbi smo uporabili še pesek.

Postopek: Glede na maso produkta smo natehtali vsaj 30-kratno maso silikagela (uporabili smo silikagel za flash kromatografijo). Produkt smo najprej raztopili v He/EtAc. V kolikor se je produkt težje topil smo dodali še nekaj kapljic etil acetata. Trudili smo se, da je bil volumen raztopine čim manjši. Uporabljeni mobilni faza je bila He/EtAc 5:1. Kolono smo vpeli in najprej vanjo vsuli 0,5 cm debelo plast peska, ki je preprečil, da silikagel ne bi zamašil filtra. Nato smo dolili mobilno fazo, tako da je tvorila okoli 3-4 cm visok stolpec. Nato smo vzeli natehtan silikagel ter ga omočili z mobilno fazo tako, da je nastala suspenzija, katero smo nato vlili v kolono. Počakali smo, da se je silikagel posedel, ter nato dolili mobilne faze do zgornjega roba silikagela v koloni. Nato smo s kapalko vlili še raztopino produkta, ki smo ga čistili. Počakali smo, da se je ves vzorec adsorbiral. Nato smo s kapalko previdno dodali mobilno fazo, tako da nismo premešali zgornje plasti silikagela. Ko je bil stolpec mobilne faze dovolj visoko nad silikagelom (4 cm), smo znova dodali plast peska, ki se je posedla na

plast silikagela in ga tako zaščitila. Zatem smo dolili mobilno fazo do vrha kolone in začeli dovajati nadtlak. Ko smo s TLC zaznali, da je skozi kolono začel prihajati produkt, smo ga začeli zbirati v ustrezno velike vsebnike (penicilinke), vse dokler je TLC kazal prisotnost produkta. Na podlagi TLC-ja vsake penicilinke smo izbrane frakcije nato združili v bučko in topilo odpareli.

3.2.2. SPEKTROSKOPSKE METODE

- **Jedrska magnetna resonanca (NMR)**

^1H NMR in ^{13}C spektri so bili posneti na spektrometru Bruker AVANCE III na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Spektri so bili posneti pri 400 MHz oziroma pri 100 MHz pri temperaturi 295 K. Pri delu smo uporabili devterirani topili DMSO-d_6 in CDCl_3 ter interni standard TMS ($\text{Si}(\text{CH}_3)_4$). Posnete spektre smo računalniško obdelali s programom MestRec 8.4.6. proizvajalca Mestrelab Research.

- **Infrardeča spektroskopija (IR)**

IR spektri so bili posneti na spektrometru Nexus FT-IR na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Posnete spektre smo računalniško obdelali s programom Omnic E.S.P. 5.2.

- **Masna spektrometrija (MS)**

Masni spektri ter HR-MS spektri so bili posneti na spektrometru Q-TOF Premier proizvajalca Waters-Micromass (Velika Britanija) z ESI tehniko na Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

- **Elementna analiza (CHN)**

Elementne analize oziroma vsebnosti elementov C, H in N so bile izmerjene z analizatorjem Perkin Elmer 2400 CHN na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani.

3.2.3. DOLOČANJE TALIŠČA

Določanje tališč je bilo opravljeno s pomočjo talilnega mikroskopa z ogrevalno mizico Wagner & Munz Polytherm A in termometrom 52 II Thermometer proizvajalca Fluke (ZDA) na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Tališča niso korigirana.

3.2.4. BIOLOŠKO TESTIRANJE SPOJIN

Spojine so biološko ovrednotili na Fakulteti za farmacijo, in sicer na Katedri za klinično biokemijo, pod vodstvom asist. dr. Martine Gobec, mag. farm. Za testiranje antagonistične aktivnosti so uporabili celice Ramos-BlueTM in reagent QUANTI-BlueTM proizvajalca InvivoGen (ZDA), za test celične viabilnosti oz test test citotoksičnosti pa so uporabili MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol).

3.2.4.1. Priprava celične linije Ramos-BlueTM

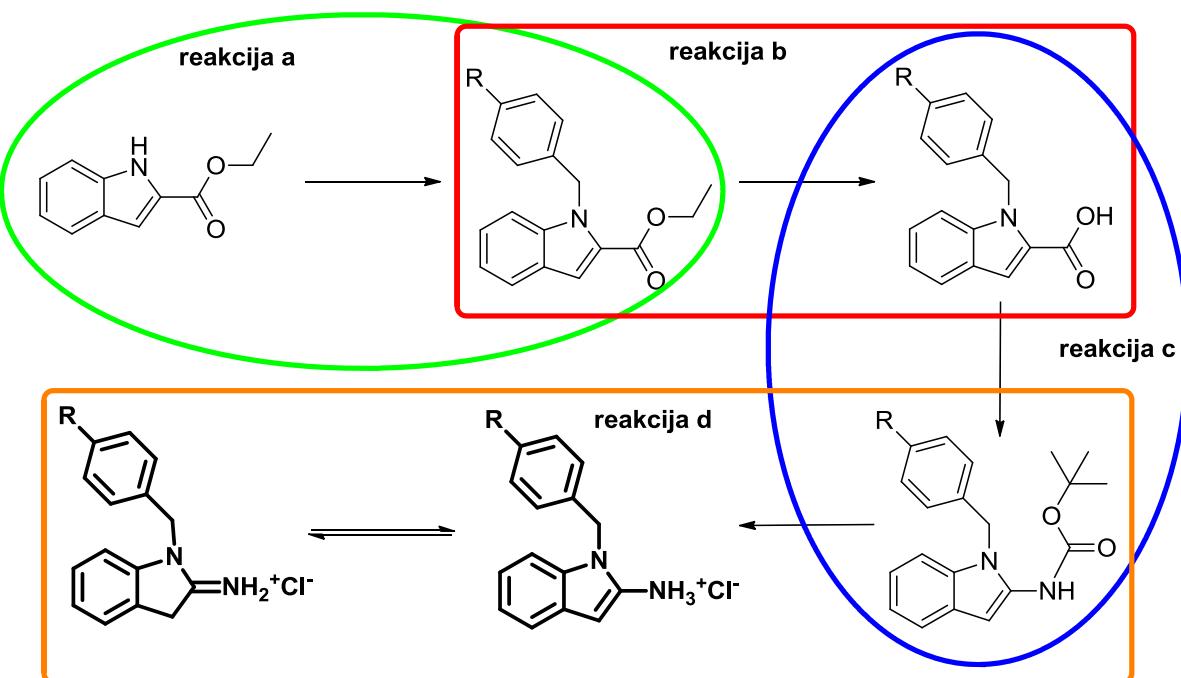
Celična linija Ramos-BlueTM je bila pripravljena iz 180 µL suspenzije celic (≈ 400000 celic), ki ji je bilo dodanih 20 µL 20 µM raztopine naših spojin in 5 µM raztopine C12-iE-DAP (agonist), kot gojitveni medij pa je bilo uporabljen topilo. Pri negativni kontroli (brez (NT)) je bil suspenziji celic dodan le gojitveni medij. Celice so bile po pripravi skupaj z ustreznimi vzorci 18 ur inkubirane pri 37 °C v 5 % atmosferi CO₂. Po končani inkubaciji je bila v supernatantu celic z reagentom QUANTI-BlueTM spektrofotometrično izmerjena količina izločene zarodne alkalne fosfataze (secreted embryonic alkaline phosphatase). Absorbanca vzorcev je bila izmerjena pri 655 nm po 30 minutni inkubaciji v mediju za analizo (48).

3.2.4.2. Izvedba MTS testa citotoksičnosti

200 µL suspenzije celic so 48 ur inkubirali pri 20 µM koncentraciji naših spojin. Za tem so dodali 20 µL MTS reagenta in inkubirali 4 ure pri 37 °C ter pri 490 nm izmerili absorbanco nastalega formazana (49).

4. EKSPERIMENTALNI DEL

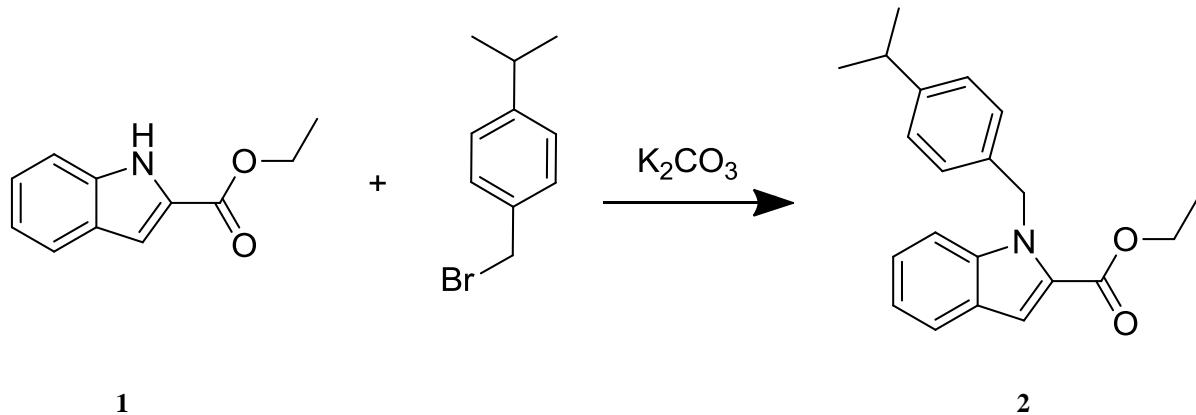
Shema 2: Shema reakcij načrtovane sintezne poti



Sintezni postopek je povsod potekal v štirih stopnjah. Izjema je le sinteza ciklopropilnega derivata, kjer smo med reakcijama a) in b) izvedli reakcijo x) Suzuki cross-coupling reakcijo. V reakciji a) smo na 1-*H*-indol-2-karboksilat uvajali različne substituente, zatem smo v reakciji b) izvedli odščito karboksilne kisline ter v reakciji c) pretvorili kisline do karbamata z vključujočo Curtiusovo prenestitvijo. Sintezo izbranih spojin smo zaključili z reakcijo d), kjer smo odstranili BOC zaščito.

4.1. SINTEZA 1-(4-IZOPROPILBENZIL)-1H-INDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (5)

4.1.1. SINTEZA ETIL 1-(4-IZOPROPILBENZIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILATA (2)



Postopek:

V 50 mL bučko smo natehtali 503 mg (2,658 mmol) etil 1H-indol-2-karboksilata (**1**) ter ga raztopili v 15 mL acetonitrila. Bučko smo nato vpeli v stojalo, ji dodali mešalni magnetek ter pustili, da se je spojina **1** raztopila. Medtem smo natehtali še 734 mg (2 eq; 5,316 mmol) kalijevega karbonata ter ga dodali v reakcijsko zmes. Nato smo mešali 15 minut, nakar smo s pipeto dodali v bučko še 0,407 mL (1,1 eq; 2,924 mmol, $\rho=1,274$ g/mL) 4-izopropilbenzilbromida. Bučko smo nato postavili nad oljno kopel in segrevali pri temperaturi refluksa. Po dveh dneh smo s TLC ugotovili, da je reakcija potekla do konca in da lahko začnemo s postopkom izolacije.

Topilo smo uparili do suhega ter dodali 15 mL diklorometana in 10 mL vode in mešali dokler se ni vse raztopilo. Vsebino bučke smo nato prelili v lij ločnik, ločili obe fazи in organsko fazо sušili z natrijevim sulfatom, nato pa smo topilo odparili do suhega. Surov produkt smo prekristalizirali iz etanola in dobili 0,704 g spojine **2**.

Rezultati:

Izgled: bež kristali

Izkoristek: 82,4 % (704 mg)

Rf: 0,74 (heksan/etilacetat : 5/1)

T_{tališča}: 56-60 °C

IR (cm^{-1}): 2956, 2929, 1699, 1514, 1477, 1459, 1441, 1414, 1351, 1319, 1276, 1261, 1246, 1189, 1164, 1138, 1122, 1098, 1050, 1026, 1010, 813, 766, 746

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm] = 1,12 (d, 6H, $J=6,8$ Hz, -CH-(CH₃)₂), 1,29 (t, 3H, $J=7,2$ Hz, -CH₂-CH₃), 2,76 – 2,83 (m, 1H, -CH-(CH₃)₂), 4,29 (k, 2H, $J=7,2$ Hz, -CH₂-CH₃), 5,81 (s, 2H, -CH₂-Ph), 6,95 (d, 2H, $J=8,0$ Hz, Ar-H), 7,11 – 7,16 (m, 3H, Ar-H), 7,28 – 7,32 (m, 1H, Ar-CH), 7,36 (s, 1H, Ar-H), 7,58 (d, 1H, $J=8,8$ Hz, Ar-H), 7,72 (d, 1H, $J=8,0$ Hz, Ar-H)

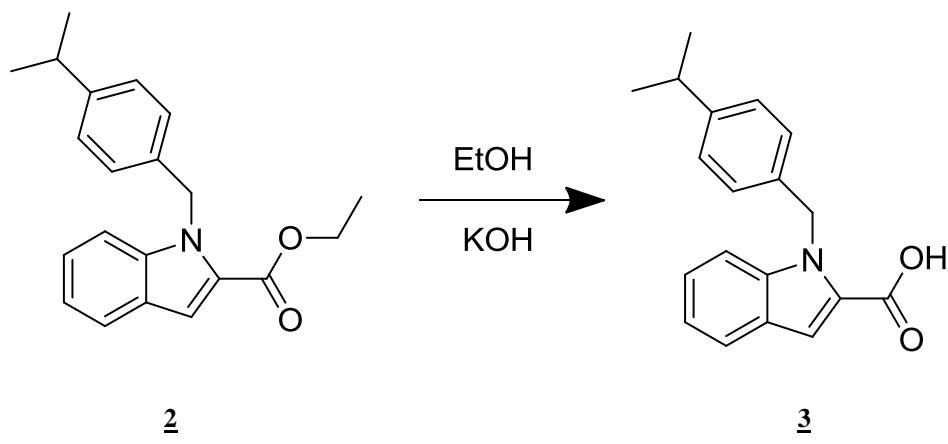
MS (ESI): 322,2 [M+H]⁺

Mr (izračunana): 321,173

HR-MS: 322,1798 (izračunana: 322,1807)

Elementna sestava: C₂₁H₂₃NO₂

4.1.2. SINTEZA 1-(4-IZOPROPILBENZIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (3)



Postopek:

V bučko smo natehtali 660 mg (2,053 mmol) etil 1-(4-izopropilbenzil)-1H-indol-2-karboksilata (**2**) ter dodali 13 mL etanola. Nato smo dodali 4,7 mL 1M raztopine KOH ter pustili mešati, dokler po 24 urah in preverbi s TLC nismo ugotovili, da je reakcija potekla do konca. Nato smo odpareli etanol in vodno fazo nakisali z 1M HCl do pH 3. Izborjeni produkt smo izolirali z odsesavanjem in ga čez noč posušili pri 75 °C ter dobili 0,534 g spojine **3**.

Rezultati:

Izgled: bež amorfna snov

Izkoristek: 88,6 % (534 mg)

Rf: 0,24 (heksan/etilacetat : 5/1)

T_{tališča}: 218 - 221 °C

IR (cm^{-1}): 2960, 2870, 1678, 1522, 1484, 1456, 1445, 1428, 1349, 1266, 1247, 1197, 1136, 745, 735, 727

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO – d_6): δ [ppm] = 1,13 (d, 6H, $J=7,2$ Hz, -CH-(CH₃)₂), 2,77 – 2,84 (m, 1H, -CH(-CH₃)₂), 5,84 (s, 2H, -CH₂-Ph), 6,96 (d, 2H, $J=8,4$ Hz, Ar-H), 7,10 – 7,14 (m, 3H, Ar-H), 7,26 – 7,31 (m, 2H, Ar-H), 7,55 (dd, 1H, $J=8,4$ Hz, $J=0,8$ Hz, Ar-H), 7,70 (d, 1H, $J=8,0$ Hz, Ar-H), 12,99 (s, 1H, -COOH)

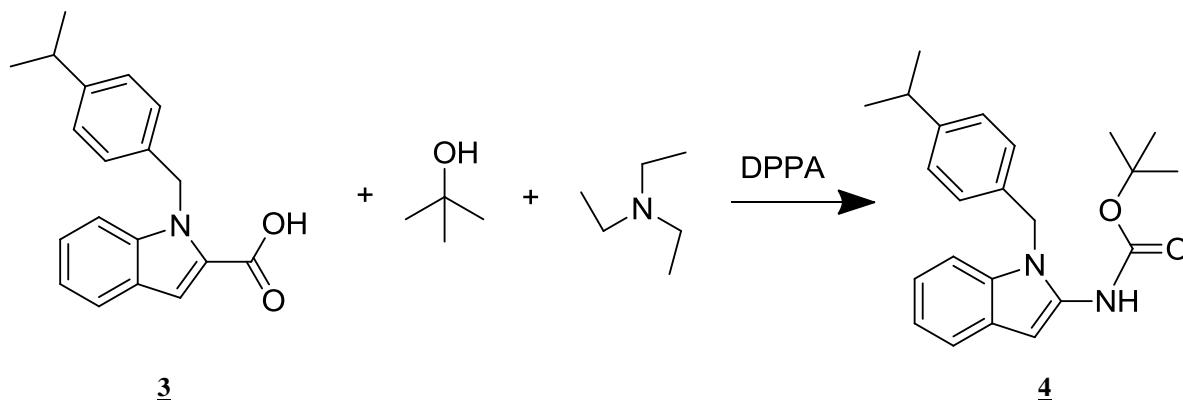
MS (ESI): 292,1 [M-H]⁻

Mr (izračunana): 293,142

HR-MS: 292,1331 (izračunana: 292,1338)

Elementna sestava: C₁₉H₁₉NO₂

4.1.3. SINTEZA TERC-BUTIL (1-(4-IZOPROPILBENZIL)-1H-INDOL-2-IL)KARBAMATA (4)



Postopek:

V bučko smo natehtali 293 mg (1 mmol) 1-(4-isopropilbenzil)-1H-indol-2-karboksilne kisline (3) ter s pipeto dodali 7 mL *terc*-butanola in 100 mg zdrobljenih molekulskih sit. Po 20 minutah mešanja na oljni kopeli, segreti na 30 °C, smo dodali še 0,2 mL (1,5 eq; 1,5 mmol, $\rho = 0,727$ g/mL) trietilamina in 0,3 mL (1,5 eq; 1,5 mmol, $\rho = 1,273$ g/mL) difenilfosforilazida (DPPA), nato pa smo temperaturo oljne kopeli dvignili na 82 °C ter reakcijsko zmes pustili mešati čez noč. Ko smo s TLC potrdili, da je reakcija potekla do konca, smo odpareli topilo in surov produkt očistili s kolonsko kromatografijo ter dobili 0,212 g spojine 4.

Rezultati:

Izgled: rjava amorfna snov

Izkoristek: 58,3 % (212 mg)

Rf: 0,50 (heksan/etilacetat : 5/1)

T_{tališča}: 127 - 131 °C

IR (cm^{-1}): 3222, 3140, 3050, 2979, 2956, 2928, 2866, 2360, 2342, 2169, 1689, 1613, 1580, 1560, 1511, 1489, 1465, 1449, 1395, 1372, 1354, 1336, 1316, 1259, 1182, 1153, 1105, 1062, 1053, 1015, 997, 966, 941, 920, 892, 842, 815, 778, 765, 746, 734, 717, 688, 669, 630, 607

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO – d_6): δ [ppm] = 1,13 (d, 6H, $J=7,2$ Hz, (-CH₃)₂), 1,43 (s, 9H, (-CH₂)₃), 2,76 – 2,83 (m, 1H, -CH(-CH₃)₂), 5,30 (s, 2H, -CH₂-Ph), 6,32 (s, 1H, Ar-H), 6,94 – 7,02 (m, 4H, Ar-H), 7,12 (d, 2H, $J=8,0$ Hz, Ar-H), 7,27 – 7,34 (m, 1H, Ar-H), 7,42 – 7,44 (m, 1H, Ar-H), 9,34 (s, 1H, -NH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO – d_6): δ [ppm] = 23,81; 27,96; 33,02; 79,51; 109,83; 119,39; 125,25; 126,27; 126,51; 134,35; 135,42; 147,13; 153,39

MS (ESI): 365,2 [M+H]⁺

Mr (izračunana): 364,215

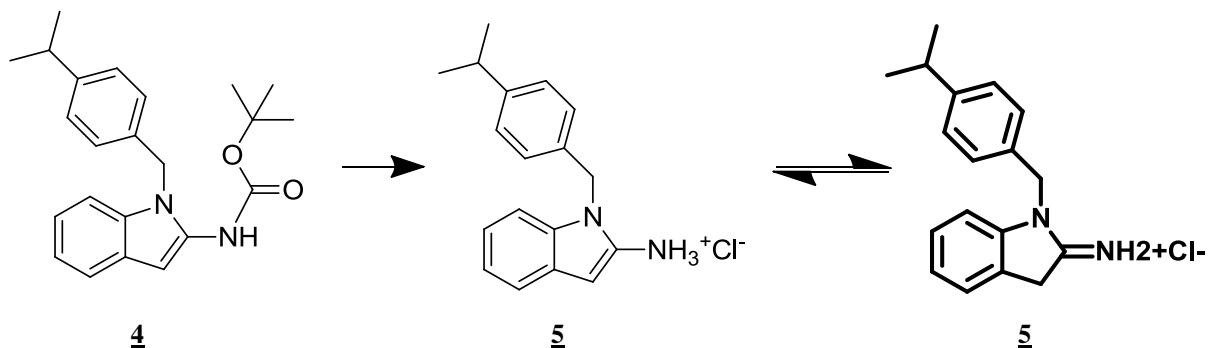
HR-MS: 365,2219 (izračunana: 365,2229)

Elementna sestava: C₂₃H₂₈N₂O₂

Elementna sestava za C₂₃H₂₈N₂O₂

	Izračunane vrednosti	C ₂₃ H ₂₈ N ₂ O ₂ x 0,3 H ₂ O	Ugotovljene vrednosti
%C	75,79	74,68	74,05
%H	7,74	7,79	7,04
%N	7,69	7,57	7,46

4.1.4. SINTEZA 1-(4-IZOPROPILBENZIL)-1H-INDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (5)



Postopek:

V 25 mL bučko smo natehtali 146 mg (0,4 mmol) *terc*-butil (1-(4-izopropilbenzil)-1H-indolin-2-il)karbamata (**4**) in ga raztopili v 4 mL dietiletra ter nato bučko za 10 minut hladili na ledeni kopeli. Nato smo dodali še 4 mL dietiletra, ki smo ga predhodno prepihal s HCl, ter pustili, da je reakcija potekala na ledu. Po 1,5 h smo s TLC zaznali, da je reakcija potekla do konca in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Vsebino bučke smo 4x suspendirali v 4 mL dietiletra ter ga vsakič odpareli. Nato smo še enkrat dodali 4 mL dietiletra ter bučko postavili v hladilnik.

Po 16 h je izpadel želeni produkt, 1-(4-isopropilbenzil)-1H-indolin-2-iminijev klorid (**5**), ki smo ga odfiltrirali z odsesavanjem posušili na zraku ter dobili 0,032 g spojine **5**

Rezultati:

Izgled: rjava amorfna snov

Izkoristek: 26,7 % (32 mg)

Rf: 0 (heksan/etilacetat : 5/1)

T_{tališča}: 82 - 86 °C

IR (cm⁻¹): 2960, 2929, 2169, 1698, 1610, 1514, 1481, 1464, 1420, 1365, 1242, 1206, 1157, 1112, 1056, 1019, 965, 739, 689

¹H-NMR (400 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm]= 1,17 (d, 6H, J=7,2 Hz, -CH(-CH₃)₂), 2,80 – 2,90 (m, 1H, -CH(-CH₃)₂), 4,37 (s, 2H, indolin-CH₂), 5,31 (s, 2H, -CH₂-Ph), 6,95 – 6,99 (m, 1H, Ar-H), 7,18 – 7,36 (m, 6H, Ar-H), 7,49 (d, 1H, J=7,6 Hz, Ar-H), 10,27 (s, 1H, =NH), 10,63 (s, 1H, =NH)

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm]= 24,28; 33,57; 36,35; 45,80; 111,62; 125,21; 126,71; 127,20; 127,63; 128,47; 131,62; 143,94; 148,70; 161,46; 170,58

MS (ESI): 265,2 [M-Cl]⁺

Mr (izračunana): 300,62

HR-MS: 265,1712 (izračunana: 265,1705 brez Cl)

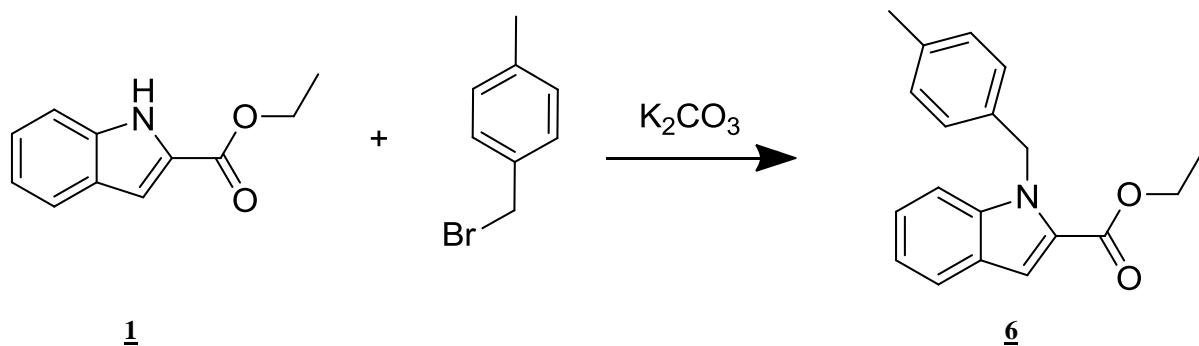
Elementna sestava: C₁₈H₂₁N₂Cl

Elementna sestava za C₁₈H₂₁N₂Cl

	Izračunane vrednosti	C ₁₈ H ₂₁ N ₂ Cl x 0,65 HCl	Ugotovljene vrednosti
%C	71,87	68,15	68,98
%H	7,04	6,82	5,85
%N	9,31	8,83	8,36

4.2. SINTEZA 1-(4-METILBENZIL)-1H-INDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (**9**)

4.2.1. SINTEZA ETIL 1-(4-METILBENZIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILATA (**6**)



Postopek:

V 50 mL bučko smo natehtali 501 mg (2,647 mmol) etil 1H-indol-2-karboksilata (**1**) ter ga raztopili v 15 mL acetonitrila. Bučko smo nato vpeli v stojalo, ji dodali mešalni magnetek ter pustili, da se je spojina **1** raztopila. Medtem smo natehtali še 732 mg (2 eq; 5,294 mmol) kalijevega karbonata ter ga dodali v reakcijsko zmes. Nato smo mešali 15 minut, nakar smo s pipeto dodali v bučko še 0,407 mL (1,1 eq; 2,912 mmol, $\rho=1,324$ g/mL) 4-metilbenzilbromida. Bučko smo nato postavili nad oljno kopel in segrevali pri temperaturi refluksa. Po dveh dneh smo s TLC ugotovili, da je reakcija potekla do konca. Topilo smo uparili do suhega ter dodali 15 mL diklorometana ter 10 mL vode in mešali dokler se ni vse raztopilo. Vsebino bučke smo nato prelili v rij ločnik, ločili obe fazi in organsko fazo sušili z natrijevim sulfatom, nato pa smo topilo odparili do suhega in dobili 0,590 g spojine **6**.

Rezultati:

Izgled: svetlorumeno olje

Izkoristek: 76,1 % (590 mg)

Rf: 0,70 (heksan/etilacetat : 5/1)

T_{tališča}: /

IR (cm⁻¹): 2980, 1704, 1516, 1480, 1456, 1410, 1376, 1351, 1319, 1245, 1183, 1163, 1138, 1118, 1093, 1025, 1012, 799, 767, 748

¹H-NMR (400 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm] = 1,29 (t, 3H, $J=7,2$ Hz, -CH₂-CH₃), 2,21 (s, 3H, Ar-CH₃), 4,29 (k, 2H, $J=7,2$ Hz, -CH₂-CH₃), 5,80 (s, 2H, -CH₂-Ph), 6,92 (d, 2H, $J=8,4$ Hz, Ar-H), 7,05 (d, 2H, $J=7,6$ Hz, Ar-H), 7,11 – 7,15 (m, 1H, Ar-H), 7,28 – 7,32 (m, 1H, Ar-H),

7,35 (d, 1H, $J=0,8$ Hz, indol-H), 7,56 (dd, 1H, $J=8,4$ Hz, $J=0,8$ Hz, Ar-H), 7,71 (d, 1H, $J=8,0$ Hz, Ar-H)

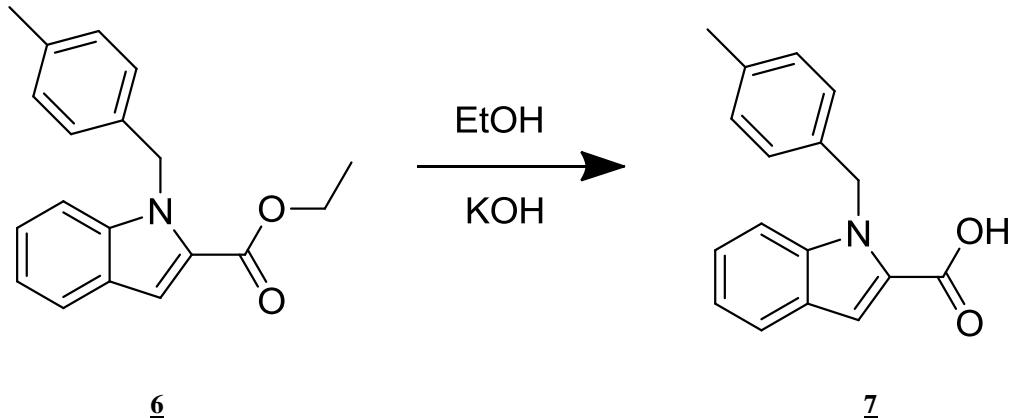
MS (ESI): 294,1 [M+H]⁺

Mr (izračunana): 293,142

HR-MS: 294,1491 (izračunana: 294,1494)

Elementna sestava: C₁₉H₁₉NO₂

4.2.2. SINTEZA 1-(4-METILBENZIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (7)



Postopek:

V bučko smo natehtali 560 mg (1,909 mmol) etil 1-(4-metilbenzil)-1H-indol-2-karboksilata (6) ter dodali 11 mL etanola. Nato smo dodali 4 mL 1M raztopine KOH ter pustili mešati, dokler po 24 urah in preverbi s TLC nismo ugotovili, da je reakcija potekla do konca. Nato smo odpareli etanol in vodno fazo nakisali z 1M HCl do pH 3. Izoborjeni produkt smo izolirali z odsesavanjem in ga čez noč posušili pri 75 °C ter dobili 0,462 g spojine 7.

Rezultati:

Izgled: bež praškasta snov

Izkoristek: 91,2 % (462 mg)

Rf: 0,24 (heksan/etilacetat : 5/1)

T_{tališča}: 159 - 163 °C

IR (cm⁻¹): 2938, 2603, 2361, 2343, 1673, 1614, 1522, 1483, 1456, 1443, 1426, 1354, 1323, 1269, 1206, 1139, 1118, 895, 820, 789, 749, 733

¹H-NMR (400 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm] = 2,20 (s, 3H, Ar-CH₃), 5,82 (s, 2H, -CH₂-Ph), 6,92 (d, 2H, $J=8,0$ Hz, Ar-H), 7,05 (d, 2H, $J=7,6$ Hz, Ar-H), 7,08 – 7,12 (m, 1H, Ar-H), 7,24 – 7,29 (m, 2H, Ar-H), 7,51 (dd, 1H, $J=8,4$ Hz, $J=0,8$ Hz, Ar-H), 7,68 (d, 1H, $J=8,0$ Hz, Ar-H), 12,96 (s, 1H, -COOH)

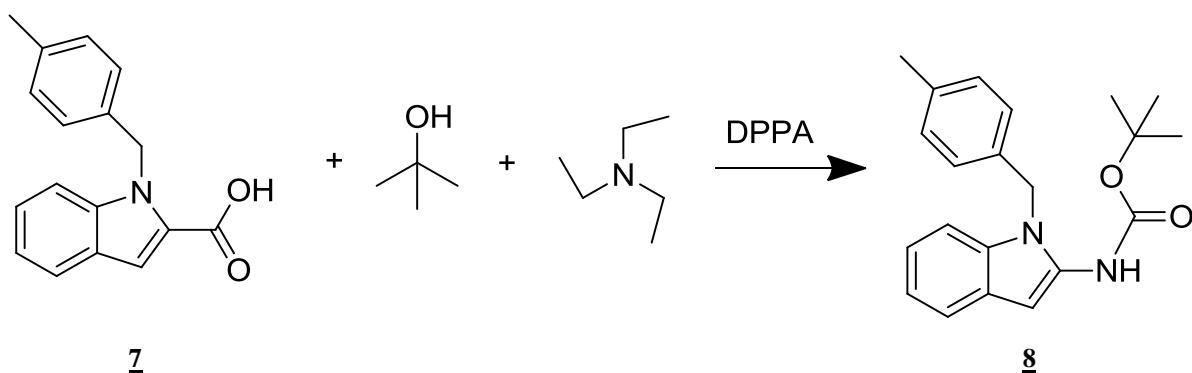
MS (ESI): 264,1 [M-H]⁻

HR-MS: 264,1030 (izračunana: 264,1025)

Mr (izračunana): 265,110

Elementna sestava: C₁₇H₁₅NO₂

4.2.3. SINTEZA TERC-BUTIL (1-(4-METILBENZIL)-1H-INDOL-2-IL)KARBAMATA (8)



Postopek:

V bučko smo natehtali 265 mg (1,0 mmol) 1-(4-metilbenzil)-1H-indol-2-karboksilne kisline (**7**) ter s pipeto dodali 7 mL *terc*-butanola in 100 mg zdrobljenih molekulskih sit. Po 20 minutah mešanja na oljni kopeli, segreti na 30 °C, smo dodali še 0,2 mL (1,5 eq; 1,5 mmol, ρ = 0,727 g/mL) trietylamina in 0,3 mL (1,5 eq; 1,5 mmol, ρ = 1,273 g/mL) difenilfosforilazida (DPPA), nato pa smo temperaturo oljne kopeli dvignili na 82 °C ter reakcijsko zmes pustili mešati čez noč. Ko smo s TLC potrdili, da je reakcija potekla do konca, smo odpareli topilo in surov produkt očistili s kolonsko kromatografijo ter dobili 0,221 g spojine **8**.

Rezultati:

Izgled: rjava amorfna snov

Izkoristek: 65,8 % (221 mg)

Rf: 0,44 (heksan/etilacetat : 5/1)

T_{tališča}: 147 - 151 °C

IR (cm⁻¹): 3258, 3174, 3050, 3018, 2981, 2927, 2360, 2342, 2168, 1692, 1612, 1590, 1578, 1554, 1514, 1481, 1462, 1393, 1369, 1333, 1312, 1251, 1204, 1181, 1150, 1107, 1060, 1011, 965, 909, 891, 838, 810, 772, 761, 751, 730, 688, 658, 644

¹H-NMR (400 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm] = 1,43 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 2,21 (s, 3H, Ar-CH₃), 5,29 (s, 2H, -CH₂-Ph), 6,32 (s, 1H, Ar-H), 6,92 – 7,00 (m, 3H, Ar-H), 7,05 (d, 2H, J=8,0 Hz,

Ar-H), 7,24 – 7,26 (m, 1H, Ar-H), 7,33 (dd, 1H, $J=8,4$ Hz, $J=1,2$ Hz, Ar-H), 7,42 – 7,51 (m, 1H, Ar-H), 9,33 (s, 1H, -NH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm]= 20,57; 27,96; 44,74; 79,51; 109,86; 119,38; 120,31; 126,53; 128,90; 133,60; 134,34; 134,98; 136,12; 153,41

MS (ESI): 337,2 [M+H]⁺

Mr (izračunana): 336,184

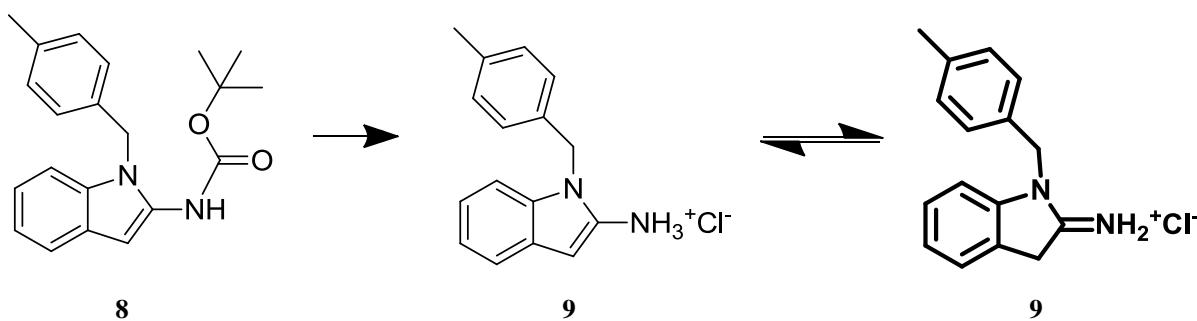
HR-MS: 337,1912 (izračunana: 337,1916)

Elementna sestava: C₂₁H₂₄N₂O₂

Elementna sestava za C₂₁H₂₄N₂O₂

	Izračunane vrednosti	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₂ x 0,25 CH ₂ Cl ₂	Ugotovljene vrednosti
%C	74,97	71,36	71,70
%H	7,19	6,90	6,42
%N	8,33	7,83	8,29

4.2.4. SINTEZA 1-(4-METILBENZIL)-1H-INDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (9)



Postopek:

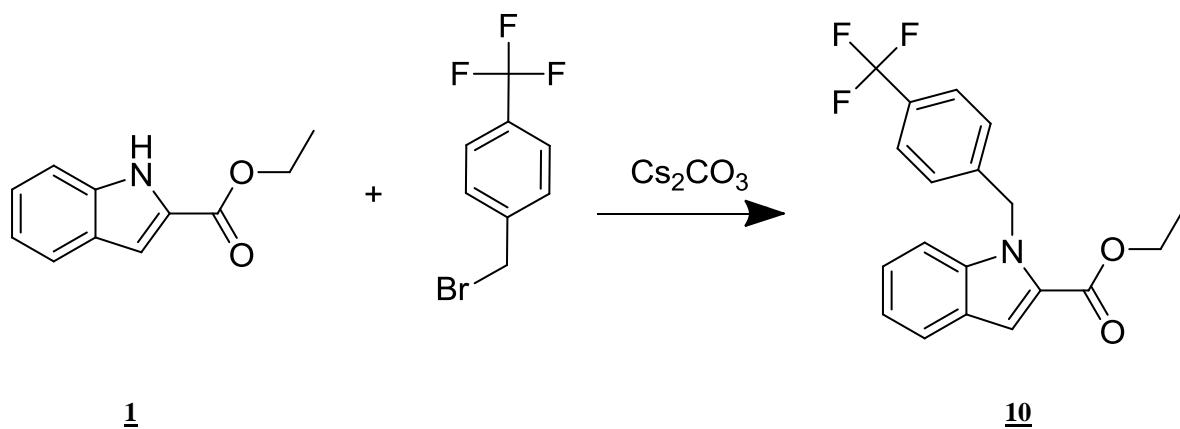
V 25 mL bučko smo natehtali 101 mg (0,3 mmol) *terc*-butil (1-(4-metilbenzil)-1H-indol-2-il)karbamata (**8**) in ga raztopili v 4 mL dietiletra ter nato bučko za 10 minut hladili na ledeni kopeli. Nato smo dodali še 4 mL dietiletra, ki smo ga predhodno prepihal s HCl, ter pustili, da je reakcija potekala na ledu. Po 1,5 h smo s TLC zaznali, da je reakcija potekla do konca ter odpareli topilo pod znižanim tlakom. Vsebino bučke smo 4x suspendirali v 4 mL dietiletra ter ga vsakič odpareli. Nato smo še enkrat dodali 4 mL dietiletra ter bučko postavili v hladilnik. Po 16 h je izpadel želeni produkt, 1-(4-metilbenzil)-1H-indolin-2-iminijev klorid (**9**), ki smo ga odfiltrirali z odsesavanjem posušili na zraku ter dobili 0,049 g spojine **9**.

Rezultati:**Izgled:** temnorjava amorfna snov**Izkoristek:** 60,0 % (49 mg)**Rf:** 0 (heksan/etilacetat : 5/1)**T_{tališča}:** 70 - 74 °C**IR (cm⁻¹):** 2973, 2922, 2169, 1698, 1589, 1515, 1482, 1463, 1392, 1365, 1264, 1203, 1179, 1155, 1111, 1058, 1022, 1010, 965, 780, 739, 688**¹H-NMR (400 MHz, DMSO – d₆):** δ [ppm]= 2,27 (s, 3H, -CH₃), 4,36 (s, 2H, indolin-CH₂), 5,25 (s, 2H, -CH₂-Ph), 6,93 (d, 1H, J=8,0 Hz, Ar-H), 7,05 (d, 1H, J=7,6 Hz, Ar-H), 7,13 (d, 1H, J=7,6 Hz, Ar-H), 7,18 (d, 2H, J=8,4 Hz, Ar-H), 7,25 (d, 1H, J=8,4 Hz, Ar-H), 7,29 – 7,33 (m, 1H, Ar-H), 7,48 (dd, 1H, J=7,2 Hz, J=0,8 Hz, Ar-H), 10,04 (s, 1H, =NH), 10,45 (s, 1H, =NH)**¹³C-NMR (100 MHz, DMSO – d₆):** δ [ppm]= 27,96; 37,81; 44,83; 58,03; 103,47; 111,61; 126,93; 127,01; 127,60; 128,98; 129,37; 143,76; 147,43; 169,41**MS (ESI):** 237,1 [M-Cl]⁺**Mr (izračunana):** 272,59**HR-MS:** 237,1388 (izračunana: 237,1392 brez Cl)**Elementna sestava:** C₁₆H₁₇N₂Cl**Elementna sestava za C₁₆H₁₇N₂Cl**

	Izračunane vrednosti	C ₁₆ H ₁₇ N ₂ Cl x 1,4 HCl x 0,3 C ₄ H ₁₀ O	Ugotovljene vrednosti
%C	70,45	59,70	60,51
%H	6,28	6,23	5,23
%N	10,27	8,09	7,17

4.3. SINTEZA 1-(4-TRIFLUOROMETILBENZIL)-1H-INDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (13)

4.3.1. SINTEZA ETIL 1-(4-TRIFLUOROMETILBENZIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILATA (10)



Postopek:

V 50 mL bučko smo natehtali 503 mg (2,658 mmol) etil 1H-indol-2-karboksilata (1) ter ga raztopili v 15 mL acetonitrila. Bučko smo nato vpeli v stojalo, ji dodali mešalni magnetek ter pustili, da se je spojina 1 raztopila. Medtem smo natehtali še 1,732 g (2 eq; 5,316 mmol) cezijevega karbonata ter ga dodali v reakcijsko zmes. Nato smo mešali 15 minut, nakar smo s pipeto dodali v bučko še 0,452 mL (1,1 eq; 2,924 mmol, $\rho=1,546 \text{ g/mL}$) 4-trifluorometilbenzilbromida. Bučko smo nato postavili nad oljno kopel in segrevali pri temperaturi refluksa. Po enem dnevu smo s TLC ugotovili, da je reakcija potekla do konca in da lahko začnemo s postopkom izolacije. Topilo smo uparili do suhega ter dodali 15 mL diklorometana in 10 mL vode ter mešali dokler se ni vse raztopilo. Vsebino bučke smo nato prelili v lij ločnik, ločili obe fazi in organsko fazo sušili z natrijevim sulfatom, nato pa smo topilo odparili do suhega. Surov produkt smo prekristalizirali iz etanola in dobili 0,608 g spojine 10.

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 65,9 % (608 mg)

Rf: 0,64 (heksan/etilacetat : 5/1)

T_{tališča}: 48 - 52 °C

IR (cm^{-1}): 2981, 2359, 2337, 1703, 1620, 1519, 1482, 1459, 1414, 1355, 1321, 1261, 1200, 1159, 1141, 1106, 1065, 1018, 900, 821, 742, 754, 731, 642

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO – d_6): δ [ppm] = 1,26 (t, 3H, $J=7,2$ Hz, - $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4,26 (q, 2H, $J=7,2$ Hz, - $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 5,94 (s, 2H, - $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 7,14 – 7,19 (m, 3H, Ar-H), 7,31 – 7,34 (m, 1H, Ar-H), 7,41 (d, 1H, $J=0,8$ Hz, Ar-H), 7,57 (dd, 1H, $J=8,4$ Hz, $J=0,8$ Hz, Ar-H), 7,65 (d, 2H, $J=8,0$ Hz, Ar-H), 7,75 (d, 1H, $J=8,0$ Hz, Ar-H)

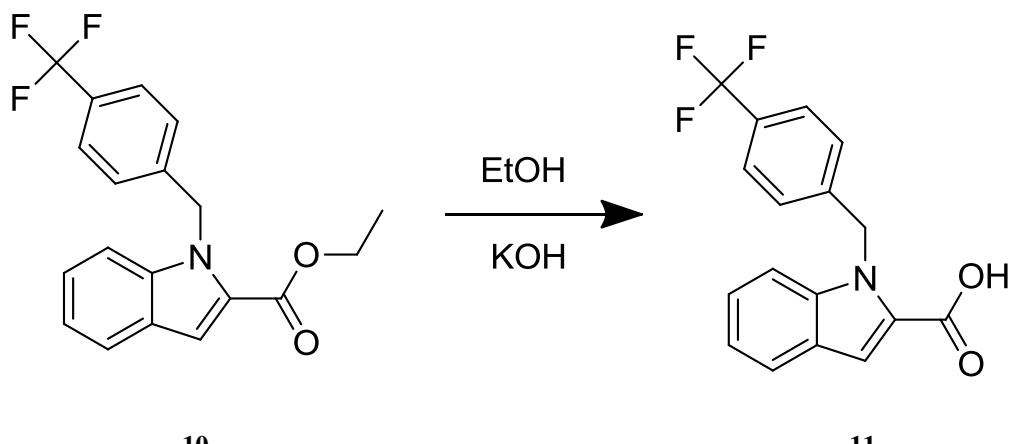
MS (ESI): 348,1 [$\text{M}+\text{H}]^+$

Mr (izračunana): 347,113

HR-MS: 348,1211 (izračunana: 348,1211)

Elementna sestava: $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{NO}_2$

4.3.2. SINTEZA 1-(4-TRIFLUOROMETILBENZIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (**11**)



Postopek:

V bučko smo natehtali 560 mg (1,630 mmol) etil 1-(4-trifluorometilbenzil)-1H-indol-2-karboksilata (**10**) ter dodali 11 mL etanola. Nato smo dodali 3,4 mL 1M raztopine KOH ter pustili mešati, dokler po 24 urah in preverbi s TLC nismo ugotovili, da je reakcija potekla do konca. Nato smo odpareli etanol in vodno fazo nakisali z 1M HCl do pH 3. Izborjeni produkt smo izolirali z odsesavanjem in ga čez noč posušili pri 75 °C ter dobili 0,514 g spojine **11**.

Rezultati:

Izgled: svetlorumena amorfna snov

Izkoristek: 98,8 % (514 mg)

Rf: 0,82 (heksan/etilacetat : 5/1)

T_{tališča}: 180 - 184 °C

IR (cm^{-1}): 2879, 2605, 2526, 2362, 2343, 1671, 1619, 1520, 1484, 1458, 1446, 1429, 1352, 1321, 1265, 1203, 1160, 1139, 1109, 1065, 1015, 920, 897, 851, 835, 822, 771, 752, 738, 647

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO – d_6): δ [ppm] = 5,96 (s, 2H, - $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 7,12 – 7,19 (m, 3H, Ar-H), 7,27 – 7,31 (m, 1H, Ar-H), 7,35 (d, 1H, $J=0,8$ Hz, Ar-H), 7,52 (dd, 1H, $J=8,4$ Hz, $J=0,8$ Hz, Ar-H), 7,64 (d, 2H, $J=8,0$ Hz, Ar-H), 7,72 (d, 1H, $J=8,0$ Hz, Ar-H), 13,03 (s, 1H, -COOH)

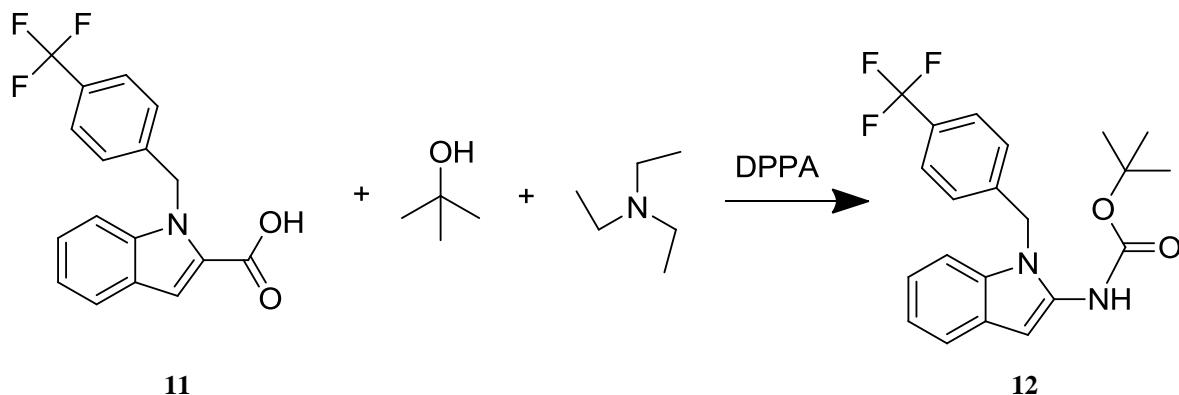
MS (ESI): 318,1 [M-H]⁻

Mr (izračunana): 319,082

HR-MS: 318,0748 (izračunana: 218,0742)

Elementna sestava: C₁₇H₁₂NO₂

4.3.3. SINTEZA TERC-BUTIL (1-(4-TRIFLUOROMETILBENZIL)-1H-INDOL-2-IL)KARBAMATA (12)



Postopek:

V bučko smo natehtali 319 mg (1,0 mmol) 1-(4-metilbenzil)-1H-indol-2-karboksilne kisline (**11**) ter s pipeto dodali 7 mL *terc*-butanola in 100 mg zdrobljenih molekulskih sit. Po 20 minutah mešanja na oljni kopeli, segreti na 30 °C, smo dodali še 0,2 mL (1,5 eq; 1,5 mmol, ρ = 0,727 g/mL) trietylamina in 0,3 mL (1,5 eq; 1,5 mmol, ρ = 1,273 g/mL) difenilfosforilazida (DPPA), nato pa smo temperaturo oljne kopeli dvignili na 82 °C ter reakcijsko zmes pustili mešati čez noč. Ko smo s TLC potrdili, da je reakcija potekla do konca, smo odpareli topilo in surov produkt očistili s kolonsko kromatografijo ter dobili 0,241 g spojine **12**.

Rezultati:

Izgled: bež amorfna snov

Izkoristek: 61,9 % (241 mg)

Rf: 0,22 (heksan/etilacetat : 5/1)

T_{tališča}: 146 - 150 °C

IR (cm^{-1}): 3293, 2989, 2972, 2934, 2361, 2342, 2170, 1701, 1620, 1586, 1561, 1514, 1489, 1458, 1422, 1394, 1369, 1360, 1325, 1264, 1247, 1211, 1152, 1117, 1067, 1018, 999, 967, 920, 829, 815, 801, 769, 742, 729, 719, 684, 643, 619

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO – d_6): δ [ppm] = 1,40 (s, 9H, -C(CH_3)₃), 5,47 (s, 2H, -CH₂-Ph), 6,37 (s, 1H, Ar-H), 6,98 – 7,03 (m, 2H, Ar-H), 7,17 (d, 2H, $J=8,0$ Hz, Ar-H), 7,26 – 7,28 (m, 1H, Ar-H), 7,31 – 7,35 (m, 1H, Ar-H), 7,46 – 7,50 (m, 1H, Ar-H), 7,64 (d, 1H, $J=8,0$ Hz, Ar-H), 9,35 (s, 1H, -NH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO – d_6): δ [ppm] = 27,89; 44,60; 79,57; 109,66; 119,54; 119,67; 120,61; 125,30; 125,34; 127,05; 129,66; 130,40; 133,66; 134,33; 142,95; 153,34

MS (ESI): 391,2 [M+H]⁺

Mr (izračunana): 390,156

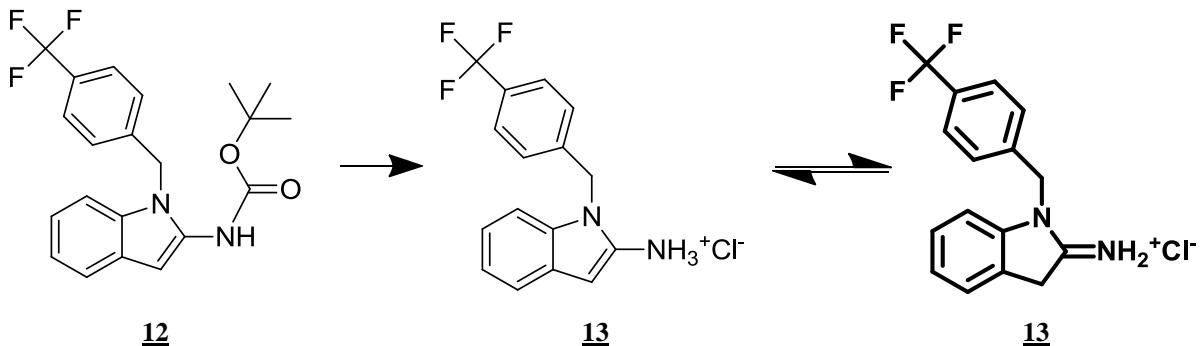
HR-MS: 391,1631 (izračunana: 391,1633)

Elementna sestava: C₂₁H₂₁F₃N₂O₂

Elementna sestava za: C₂₁H₂₁F₃N₂O₂

	Izračunane vrednosti	C ₂₁ H ₂₁ F ₃ N ₂ O ₂ x 0,05 H ₂ O	Ugotovljene vrednosti
%C	64,61	64,46	64,18
%H	5,42	5,44	5,50
%N	7,18	7,16	7,49

4.3.4. SINTEZA 1-(4-TRIFLUOROMETILBENZIL)-1H-INDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (13)



Postopek:

V 25 mL bučko smo natehtali 78 mg (0,2 mmol) *terc*-butil (1-(4-trifluorometilbenzil)-1H-indol-2-il)karbamata (**12**) in ga raztopili v 4 mL dietiletra ter nato bučko za 10 minut hladili na ledeni kopeli. Nato smo dodali še 4 mL dietiletra, ki smo ga predhodno prepihalili s HCl, ter pustili, da je reakcija potekala na ledu. Po 1,5 h smo s TLC zaznali, da je reakcija potekla do konca ter odpareli topilo pod znižanim tlakom. Vsebino bučke smo 4x suspendirali v 4 mL

dietiletra ter ga vsakič odpareli. Nato smo še enkrat dodali 4 mL dietiletra ter bučko postavili v hladilnik. Po 16 h je izpadel želeni produkt, 1-(4-trifluorometilbenzil)-1H-indolin-2-iminijev klorid (**13**), ki smo ga odfiltrirali z odsesavanjem, posušili na zraku ter dobili 0,036 g spojine **13**.

Rezultati:

Izgled: bež amorfna snov

Izkoristek: 55,2 % (36 mg)

Rf: 0 (heksan/etilacetat : 5/1)

T_{tališča}: 87 - 91 °C

IR (cm⁻¹): 2978, 2173, 1701, 1481, 1464, 1420, 1393, 1367, 1323, 1247, 1159, 1121, 1066, 1018, 968, 741

¹H-NMR (400 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm]= 4,39 (s, 2H, indolin-CH₂), 5,50 (s, 2H, -CH₂-Ph), 7,13 (d, 1H, J=8,0 Hz, Ar-H), 7,22 (t, 1H, J=7,6 Hz, Ar-H), 7,33 (t, 1H, J=7,6 Hz, Ar-H), 7,51 (d, 1H, J=7,2 Hz, Ar-H), 7,60 (d, 2H, J=8,0 Hz, Ar-H), 7,76 (d, 2H, J=8,0 Hz, Ar-H), 10,43 (s, 1H, =NH), 10,74 (s, 1H, =NH)

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm]= 36,46; 45,79; 111,40; 125,12; 125,29; 126,12; 126,16; 126,74; 128,31; 128,52; 139,19; 143,81; 171,00

MS (ESI): 291,1 [M-Cl]⁺

Mr (izračunana): 326,56

HR-MS: 291,1104 (izračunana: 291,1109 brez Cl)

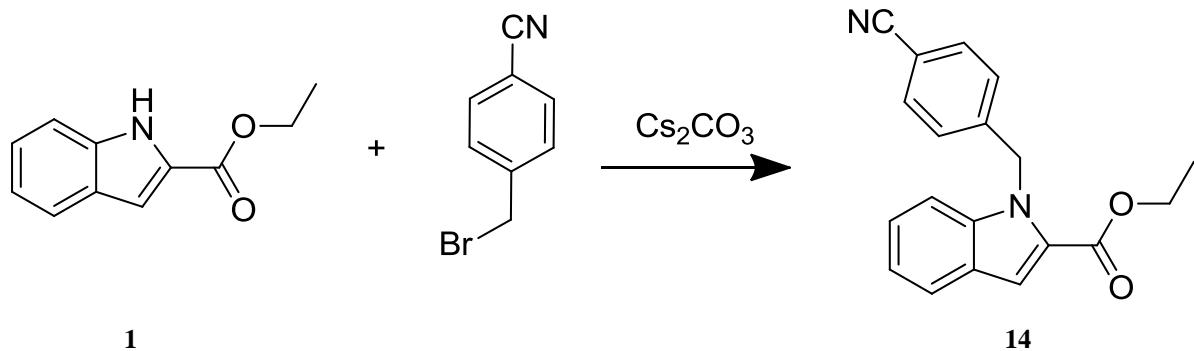
Elementna sestava: C₁₆H₁₄F₃N₂Cl

Elementna sestava za C₁₆H₁₄F₃N₂Cl

	Izračunane vrednosti	C ₁₆ H ₁₄ F ₃ N ₂ Cl x 0,1 HCl	Ugotovljene vrednosti
%C	56,40	58,17	58,18
%H	4,14	4,30	4,06
%N	12,33	8,48	8,32

4.4. SINTEZA 1-(4-CIANOBENZIL)-1H-INDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (17)

4.4.1. SINTEZA ETIL 1-(4-CIANOBENZIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILATA (14)



Postopek:

Spojina je bila za namen druge diplomske naloge že sintetizirana in ker je bila to začetna stopnja smo nadaljnjo sintezo nadaljevali z njo.

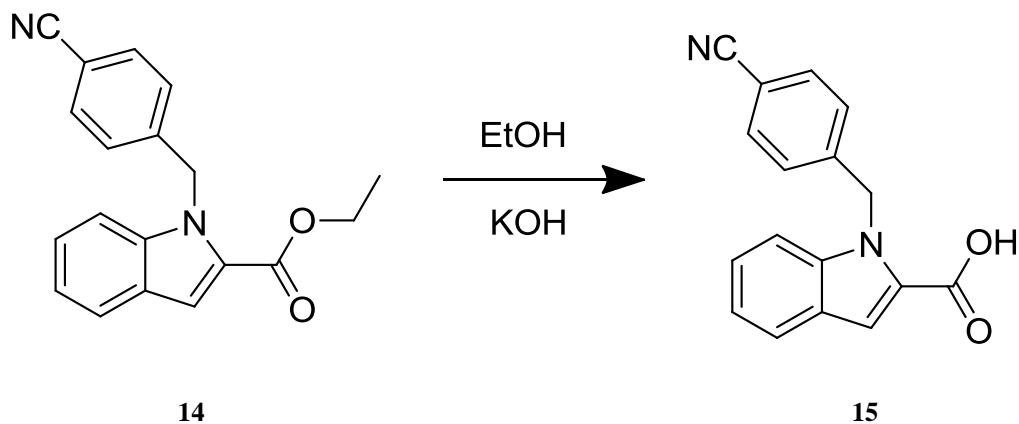
Rezultati:

¹H-NMR (400 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm] = 1,27 (t, 3H, *J*=7,2 Hz, -CH₂-CH₃), 4,27 (k, 2H, *J*=7,2 Hz, -CH₂-CH₃), 5,95 (s, 2H, -CH₂-Ph), 7,14 – 7,20 (m, 3H, Ar-H), 7,32 – 7,36 (m, 1H, Ar-H), 7,42 (s, 1H, Ar-H), 7,57 (d, 1H, *J*=8,4 Hz, Ar-H), 7,76 (d, 3H, *J*=8,4 Hz, Ar-H)

Mr (izračunana): 303,43

Elementna sestava: C₁₉H₁₆N₂O₂

4.4.2. SINTEZA 1-(4-CIANOBENZIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (15)



Postopek:

V bučko smo natehtali 393 mg (1,292 mmol) etil 1-(4-cianobenzil)-1H-indol-2-karboksilata (**14**) ter dodali 8 mL etanola. Nato smo dodali 2,7 mL 1M raztopine KOH ter pustili mešati, dokler po 24 urah in preverbi s TLC nismo ugotovili, da je reakcija potekla. Nato smo odpareli etanol in vodno fazo nakisali z 1M HCl do pH 3. Izborjeni produkt smo izolirali z odsesavanjem in ga čez noč posušili pri 75 °C ter dobili 0,354 g spojine **15**.

Rezultati:

Izgled: svetlooranžna amorfna snov

Izkoristek: 99,2 % (354 mg)

Rf: 0,72 (heksan/etilacetat : 5/1)

T_{tališča}: 179 - 183 °C

IR (cm⁻¹): 3242, 3048, 2360, 2342, 2231, 1710, 1678, 1607, 1525, 1481, 1458, 1443, 1414, 1383, 1350, 1337, 1319, 1270, 1237, 1180, 1165, 1138, 1120, 1091, 897, 831, 807, 776, 746, 701

¹H-NMR (400 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm] = 5,97 (s, 2H, -CH₂-Ph), 7,16 (t, 3H, J = 7,2 Hz, Ar-H), 7,29 – 7,33 (m, 1H, Ar-H), 7,37 (s, 1H, Ar-H), 7,53 (d, 1H, J = 8,4 Hz, Ar-H), 7,75 (t, 3H, J = 7,6 Hz, Ar-H)*

*vrh za -COOH na spektru NMR je skrit pod vrhom za vodo

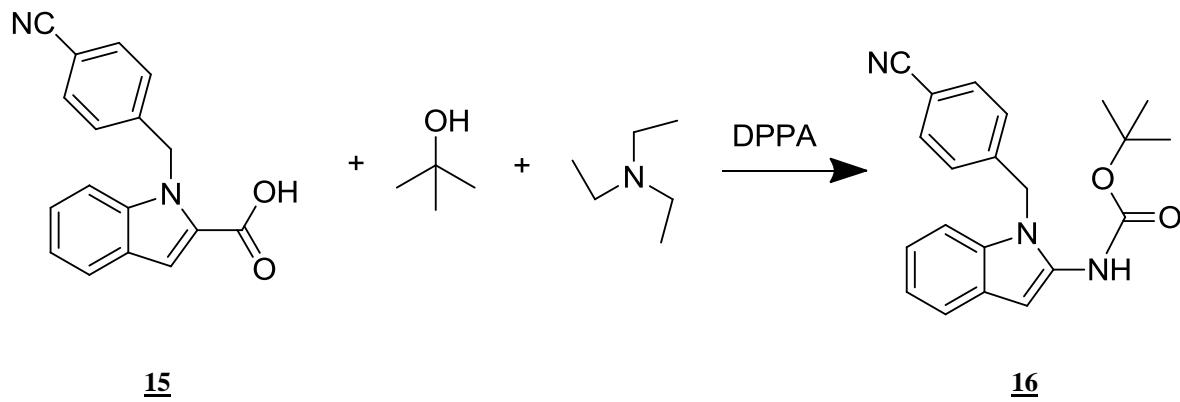
MS (ESI): 275,1 [M-H]⁻

Mr (izračunana): 276,090

HR-MS: 275,0816 (izračunana: 275,0821)

Elementna sestava: C₁₇H₁₂N₂O₂

4.4.3. SINTEZA TERC-BUTIL (1-(4-CIANOBENZIL)-1H-INDOL-2-IL)KARBAMATA (16)



Postopek:

Postopek:

V bučko smo natehtali 236 mg (0,86 mmol) 1-(4-cianobenzil)-1H-indol-2-karboksilne kisline (**15**) ter s pipeto dodali 7 mL *terc*-butanola in 100 mg zdrobljenih molekulskih sit. Po 20 minutah mešanja na oljni kopeli, segreti na 30 °C, smo dodali še 0,178 mL (1,5 eq; 1,3 mmol, $\rho = 0,727 \text{ g/mL}$) trietilamina in 0,259 mL (1,5 eq; 1,3 mmol, $\rho = 1,273 \text{ g/mL}$) difenilfosforilazida (DPPA), nato pa smo temperaturo oljne kopeli dvignili na 82 °C ter reakcijsko zmes pustili mešati čez noč. Ko smo s TLC potrdili, da je reakcija potekla do konca, smo odpareli topilo in surov produkt očistili s kolonsko kromatografijo ter dobili 0,163 g spojine **16**.

Rezultati:

Izgled: bež amorfna snov

Izkoristek: 54,5 % (163 mg)

Rf: 0,10 (heksan/etilacetat : 5/1)

$T_{\text{tališča}}$: 148 - 152 °C

IR (cm^{-1}): 3219, 3129, 3072, 2982, 2928, 2229, 1685, 1608, 1579, 1562, 1508, 1479, 1463, 1437, 1414, 1400, 1392, 1369, 1336, 1315, 1260, 1217, 1152, 1107, 1059, 1014, 997, 957, 920, 845, 815, 773, 748, 730

¹H-NMR (400 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm]= 1,41 (s, 9H, -C(-CH₃)₃), 5,47 (s, 2H, -CH₂-Ph), 6,38 (s, 1H, Ar-H), 7,00 – 7,02 (m, 2H, Ar-H), 7,13 (d, 2H, *J*=8,4 Hz, Ar-H), 7,24 (d, 1H, *J*=8,4 Hz, Ar-H), 7,46 – 7,48 (m, 1H, Ar-H), 7,75 (d, 2H, *J*=8,4 Hz, Ar-H), 9,36 (s, 1H, -NH)

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm]= 27,91; 44,73; 79,62; 93,79; 93,83; 109,65; 109,79; 118,70; 119,57; 119,74; 120,65; 126,93; 127,26; 132,38; 133,62; 134,33; 143,93; 153,35

MS (ESI): 348,2 [M+H]⁺

Mr (izračunana): 347,163

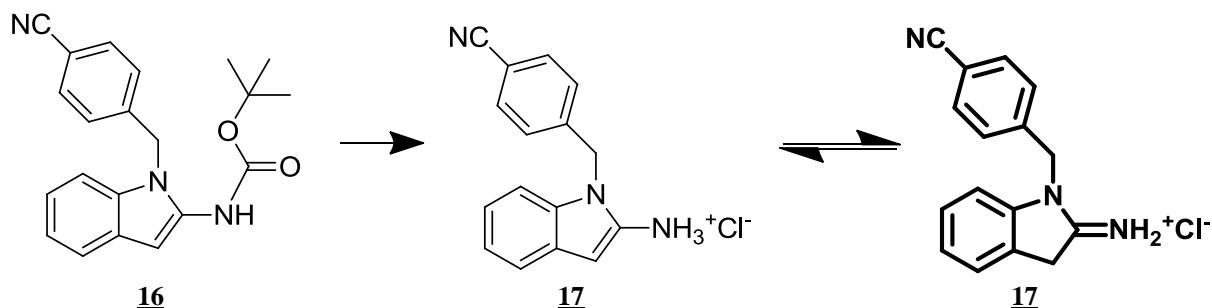
HR-MS: 348,1715 (izračunana: 348,1712)

Elementna sestava: C₂₁H₂₁N₃O₂

Elementna sestava za C₂₁H₂₁N₃O₂

	Izračunane vrednosti	C ₂₁ H ₂₁ N ₃ O ₂ x 0,1 H ₂ O	Ugotovljene vrednosti
%C	72,60	72,23	72,51
%H	6,09	6,12	6,18
%N	12,10	12,03	11,76

4.4.4. SINTEZA 1-(4-CIANOBENZIL)-1H-INDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (17)



Postopek:

V 25 mL bučko smo natehtali 104 mg (0,3 mmol) *terc*-butil (1-(4-cianobenzil)-1H-indol-2-il)karbamata (**16**) in ga raztopili v 4 mL dietiletra ter nato bučko za 10 minut hladili na ledeni kopeli. Nato smo dodali še 4 mL dietiletra, ki smo ga predhodno prepihali s HCl, ter pustili, da je reakcija potekala na ledu. Po 1,5 h smo s TLC zaznali, da je reakcija potekla do konca ter odpareli topilo pod znižanim tlakom. Vsebino bučke smo 4x suspendirali v 4 mL dietiletra ter ga vsakič odpareli. Nato smo še enkrat dodali 4 mL dietiletra ter bučko postavili v hladilnik. Po 16 h je izpadel želeni produkt, 1-(4-cianobenzil)-1H-indolin-2-iminijski klorid (**17**), ki smo ga odfiltrirali z odsesavanjem ter dobili 0,041 g spojine **17**.

Rezultati:

Izgled: temnorjava amorfna snov

Izkoristek: 48,2 % (41 mg)

Rf: 0 (heksan/etilacetat : 5/1)

T_{tališča}: 88 - 92 °C

IR (cm^{-1}): 3053, 2968, 2926, 2229, 2173, 1701, 1608, 1564, 1482, 1464, 1415, 1392, 1366, 1325, 1243, 1155, 1112, 1066, 1020, 963, 895, 813, 744, 689

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO – d_6): δ [ppm]= 4,37 (s, 2H, indolin- CH_2), 5,53 (s, 2H, - CH_2 -Ph), 7,08 (d, 1H, $J=7,6$ Hz, Ar-H), 7,20 (t, 1H, $J=7,6$ Hz, Ar-H), 7,30 (t 1H, $J=7,6$ Hz, Ar-H), 7,50 (d, 1H, $J=7,2$ Hz, Ar-H), 7,57 (d, 2H, $J=8,0$ Hz, Ar-H), 7,86 (d, 2H, $J=8,0$ Hz, Ar-H), 10,56 (s, 1H, =NH), 10,82 (s, 1H, =NH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO – d_6): δ [ppm]= 36,48; 45,96; 111,18; 111,35; 119,04; 125,09; 125,29; 126,79; 128,45; 133,16; 140,14; 143,76; 171,04

MS (ESI): 248,1 [M-Cl]⁺

Mr (izračunana): 283,57

HR-MS: 248,1184 (izračunana: 248,1188 brez Cl)

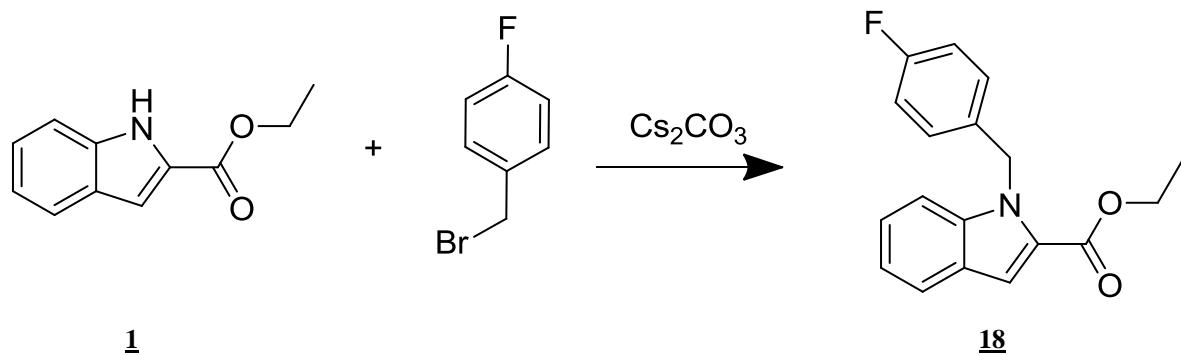
Elementna sestava: C₁₆H₁₄N₃Cl

Elementna sestava za C₁₆H₁₄N₃Cl

	Izračunane vrednosti	C ₁₆ H ₁₄ N ₃ Cl x 0,4 HCl	Ugotovljene vrednosti
%C	67,72	64,41	64,60
%H	4,97	4,86	4,67
%N	14,81	14,08	13,81

4.5. SINTEZA 1-(4-FLUOROBENZIL)-1H-INDOL-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (21)

4.5.1. SINTEZA ETIL 1-(4-FLUOROBENZIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILATA (18)



Postopek:

V 50 mL bučko smo natehtali 502 mg (2,652 mmol) etil 1H-indol-2-karboksilata (1) ter ga raztopili v 15 mL acetonitrila. Bučko smo nato vpeli v stojalo, ji dodali mešalni magnetek ter pustili da se je spojina 1 raztopila. Medtem smo natehtali še 1,728 g (2 eq; 5,304 mmol) cezijevega karbonata ter ga dodali v reakcijsko zmes. Nato smo mešali 15 minut, nakar smo s

pipeto dodali v bučko še 0,363 mL (1,1 eq; 2,917 mmol, ρ=1,517 g/mL) 4-fluorobenzilbromida. Bučko smo nato postavili nad oljno kopel in segrevali pri temperaturi refluksa. Po enem dnevu smo s TLC ugotovili, da je reakcija potekla do konca in da lahko začnemo s postopkom izolacije. Topilo smo uparili do suhega in dodali 15 mL diklorometana ter 10 mL vode in mešali dokler se ni vse raztopilo. Vsebino bučke smo nato prelili v lik ločnik, ločili obe fazi in organsko fazo sušili z natrijevim sulfatom, nato pa smo topilo odparili do suhega. Surov produkt smo prekristalizirali iz etanola in dobili 0,687 g spojine **18**.

Rezultati:

Izgled: rumeni kristali

Izkoristek: 87,2 % (687 mg)

Rf: 0,57

T_{tališča}: 78-80 °C

IR (cm⁻¹): 1675, 1501, 1456, 1365, 1311, 1248, 1145, 1088, 1053, 1013, 936, 887, 827, 791, 736, 685, 632, 600, 574, 555

¹H-NMR (400 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm]= 1,29 (t, 3H, J = 7,2 Hz, -CH₃), 4,30 (k, 2H, J = 7,2 Hz, -CH₂-CH₃), 5,84 (s, 2H, -CH₂-Ph), 7,09-7,16 (m, 5H, Ar-H), 7,31-7,35 (m, 1H, Ar-H), 7,38 (d, 1H, J = 0,8 Hz, Ar-H), 7,59-7,62 (m, 1H, Ar-H), 7,72-7,74 (m, 1H, Ar-H)

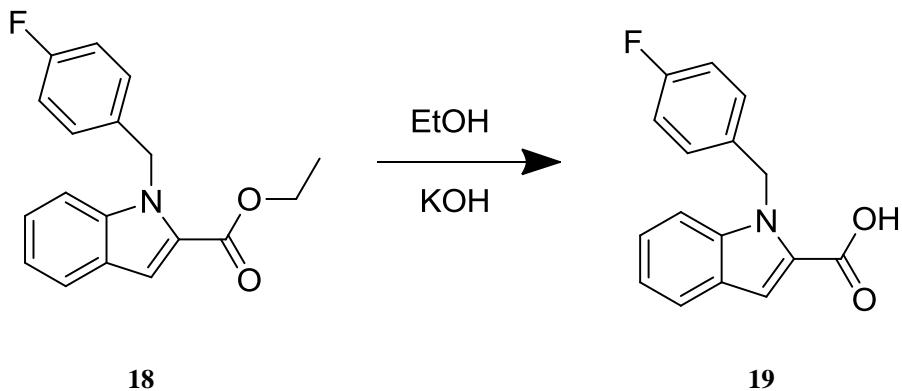
MS (ESI): 298.1 (M+H)⁺

Mr (izračunana): 297,32

HR-MS: 298.1238 (izračunana: 298.1243)

Elementna sestava: C₁₈H₁₆FNO₂

4.5.2. SINTEZA 1-(4-FLUOROBENZIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (19)



Postopek:

V bučko su

(18) ter dodali 7 mL etanola. Nato smo dodali 2,5 mL 1M raztopine KOH ter pustili mešati, dokler po 24 urah in preverbi s TLC nismo ugotovili, da je reakcija potekla. Nato smo odpareli etanol in vodno fazo nakisali z 1M HCl do pH 3. Izoborjeni produkt smo izolirali z odsesavanjem in ga čez noč posušili pri 75 °C ter dobili 0,317 g spojine **19**.

Rezultati:

Izgled: bela amorfna snov

Izkoristek: 99,4 % (317 mg)

Rf: 0,2 (heksan/etilacetat : 5/1)

T_{tališča}: 168 - 171 °C

IR (cm^{-1}): 3050, 2599, 2360, 2343, 1678, 1608, 1513, 1484, 1460, 1445, 1428, 1357, 1319, 1268, 1223, 1207, 1158, 1136, 1121, 1018, 898, 836, 826, 807, 768, 753, 739, 617

¹H-NMR (400 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm] = 5,85 (s, 2H, -CH₂-Ph), 7,08 – 7,14 (m, 5H, Ar-H), 7,27 – 7,32 (m, 2H, Ar-H), 7,56 (dd, 1H, J=8,4 Hz, J=0,8 Hz, Ar-H), 7,70 (d, 1H, J=8,0 Hz, Ar-H), 13,01 (s, 1H, -COOH)

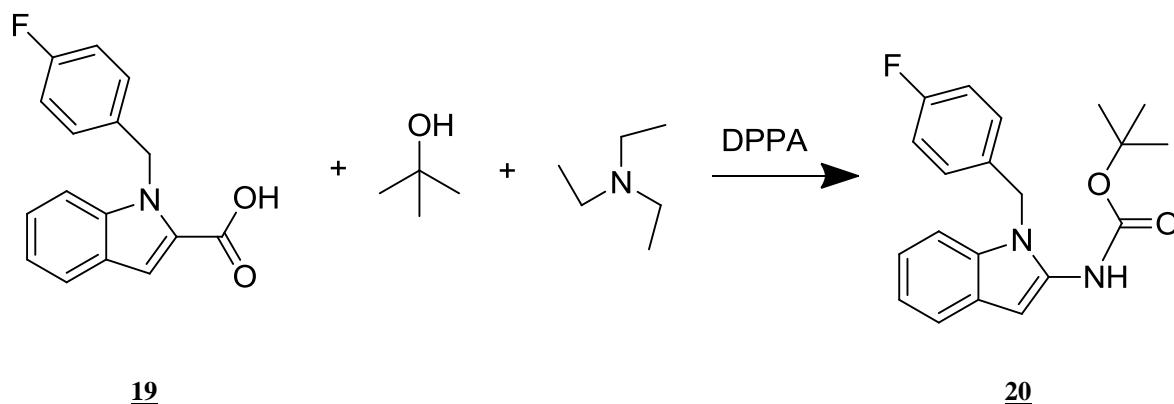
MS (ESI): 268,1 [M-H]⁻

Mr (izračunana): 269,085

HR-MS: 268,0770 (izračunana: 268,0774)

Elementna sestava: C₁₆H₁₂FNO₂

4.5.3. SINTEZA TERC-BUTIL 1-(4-FLUOROBENZIL)-1H-INDOL-2-IL)KARBAMATA (20)



Postopek:

V bučko smo natehtali 201 mg (0,68 mmol) 1-(4-fluorobenzil)-1H-indol-2-karboksilne kisline (**19**) ter s pipeto dodali 7 mL *terc*-butanola in 100 mg zdrobljenih molekulskih sit. Po 20 minutah mešanja na oljni kopeli, segreti na 30 °C, smo dodali še 0,141 mL (1,5 eq; 1,0 mmol, $\rho = 0,727 \text{ g/mL}$) trietylamina in 0,205 mL (1,5 eq; 1,0 mmol, $\rho = 1,273 \text{ g/mL}$) difenilfosforilazida (DPPA), nato pa smo temperaturo oljne kopeli dvignili na 82 °C ter reakcijsko zmes pustili mešati čez noč. Ko smo s TLC potrdili, da je reakcija potekla do konca, smo odpareli topilo in surov produkt očistili s kolonsko kromatografijo ter dobili 0,139 g spojine **20**.

Rezultati:

Izgled: rjava amorfna snov

Izkoristek: 60,3 % (139 mg)

Rf: 0,34 (heksan/etilacetat : 5/1)

T_{tališča}: 121 - 125 °C

IR (cm⁻¹): 3292, 2977, 2933, 2359, 2342, 1702, 1604, 1584, 1561, 1508, 1481, 1452, 1421, 1393, 1368, 1359, 1341, 1265, 1247, 1218, 1155, 1112, 1095, 1062, 1016, 999, 968, 939, 916, 843, 814, 780, 771, 740, 727, 683, 648, 632, 603

¹H-NMR (400 MHz, DMSO - d₆): δ [ppm] = 1,43 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 5,33 (s, 2H, -CH₂-Ph), 6,34 (s, 1H, Ar-H), 6,97 – 7,12 (m, 6H, Ar-H), 7,28 (d, 1H, $J=8,0$ Hz, Ar-H), 7,44 (d, 1H, $J=8,0$ Hz, Ar-H), 9,35 (s, 1H, -NH)

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO - d₆): δ [ppm] = 27,94; 44,26; 79,56; 109,79; 115,05; 115,26; 119,47; 119,52; 120,48; 126,89; 128,44; 128,53; 133,57; 134,17; 134,20; 134,24; 153,42

MS (ESI): 341,2 [M+H]⁺

Mr (izračunana): 340,159

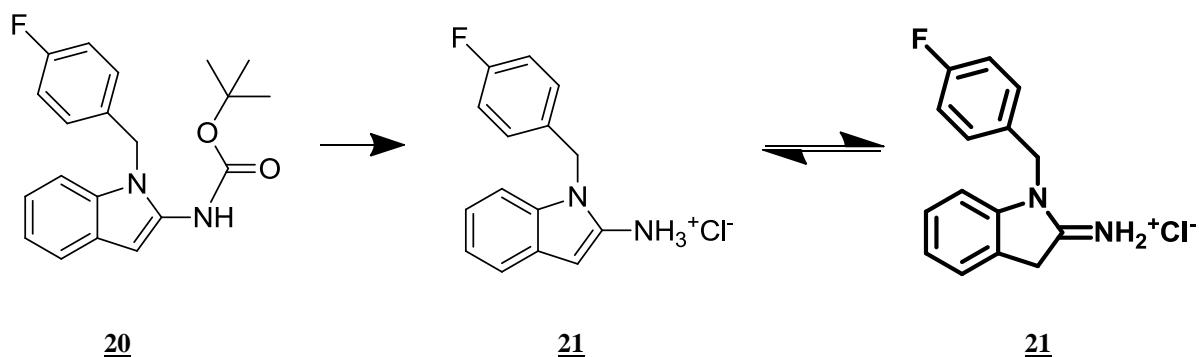
HR-MS: 341,1662 (izračunana: 341,1665)

Elementna sestava: C₂₀H₂₁FN₂O₂

Elementna sestava za: C₂₀H₂₁FN₂O₂

	Izračunane vrednosti	C ₂₀ H ₂₁ FN ₂ O ₂ x 0,25 H ₂ O	Ugotovljene vrednosti
%C	70,57	69,65	69,63
%H	6,22	6,28	6,27
%N	8,23	8,12	7,98

4.5.4. SINTEZA 1-(4-FLUOROBENZIL)-1H-INDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (21)



Postopek:

V 25 mL bučko smo natehtali 102 mg (0,3 mmol) *terc*-butil 1-(4-fluorobenzil)-1H-indol-2-il)karbamata (**20**) in ga raztopili v 4 mL dietiletra ter nato bučko za 10 minut hladili na ledeni kopeli. Nato smo dodali še 4 mL dietiletra, ki smo ga predhodno prepihalo s HCl, ter pustili, da je reakcija potekala na ledu. Po 1,5 h smo s TLC zaznali, da je reakcija potekla do konca ter odpareli topilo pod znižanim tlakom. Vsebino bučke smo 4x suspendirali v 4 mL dietiletra ter ga vsakič odpareli. Nato smo še enkrat dodali 4 mL dietiletra ter bučko postavili v hladilnik. Po 16 h je izpadel želeni produkt, 1-(4-fluorobenzil)-1H-indolin-2-iminijev klorid (**21**), ki smo ga odfiltrirali z odsesavanjem ter dobili 0,039 g spojine **21**.

Rezultati:

Izgled: bledorjava amorfna snov

Izkoristek: 47,4 % (39 mg)

Rf: 0 (heksan/etilacetat : 5/1)

T_{tališča}: 91 - 95 °C

IR (cm^{-1}): 3146, 3049, 2963, 2921, 2849, 2171, 1709, 1606, 1509, 1485, 1465, 1410, 1366, 1298, 1261, 1222, 1180, 1157, 1096, 1011, 965, 895, 812, 740, 688

MS (ESI): 241,1 [M-Cl]⁺

Mr (izračunana): 276,56

HR-MS: 241,1144 (izračunana: 241,1141 brez Cl)

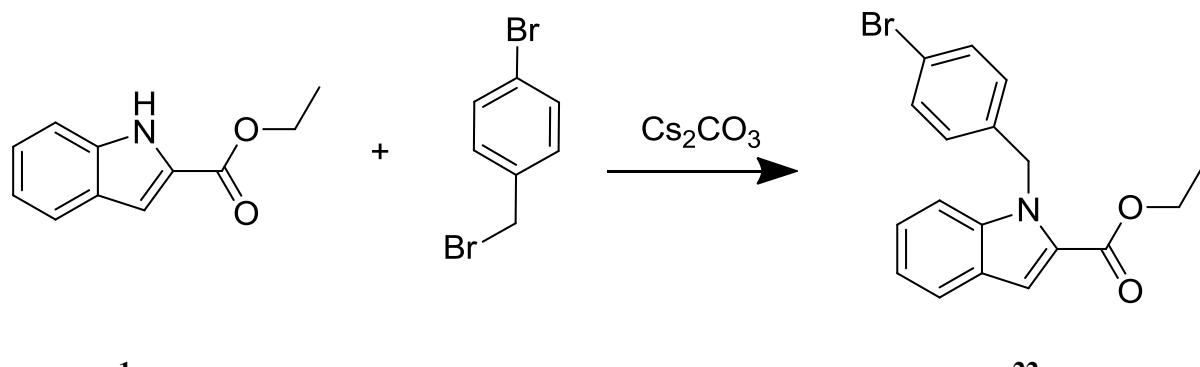
Elementna sestava: C₁₅H₁₄FN₂Cl

Elementna sestava za C₁₅H₁₄FN₂Cl

	Izračunane vrednosti	C ₁₅ H ₁₄ FN ₂ Cl x 0,25 HCl	Ugotovljene vrednosti
%C	65,10	63,03	63,51
%H	5,10	5,02	4,49
%N	10,12	9,80	9,58

4.6. SINTEZA 1-(4-BROMOBENZIL)-1H-INDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (25)

4.6.1. SINTEZA ETIL 1-(4-BROMOBENZIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILATA (22)



1

22

Postopek:

V 50 mL bučko smo natehtali 251 mg (1,327 mmol) etil 1H-indol-2-karboksilata (**1**) ter ga raztopili v 15 mL acetonitrila. Bučko smo nato vpeli v stojalo, ji dodali mešalni magnetek ter pustili da se je spojina **1** raztopila. Medtem smo natehtali še 864 mg (2 eq; 2,654 mmol) cezijevega karbonata ter ga dodali v reakcijsko zmes. Nato smo mešali 15 minut, nakar smo s pipeto dodali v bučko še 365 mg (1,1 eq; 1,459 mmol) 4-bromobenzilbromida. Bučko smo nato postavili nad oljno kopel in segrevali pri temperaturi refluksa. Po enem dnevu smo s TLC ugotovili, da je reakcija potekla do konca in da lahko začnemo s postopkom izolacije. Topilo smo uparili do suhega in dodali 15 mL diklorometana ter 10 mL vode in mešali dokler

se ni vse raztopilo. Vsebino bučke smo nato prelili v lij ločnik, ločili obe fazi in organsko fazo sušili z natrijevim sulfatom, nato pa smo topilo odparili do suhega. Surov produkt smo prekristalizirali iz etanola in dobili 0,096 g spojine **22**.

Rezultati:

Izgled: svetlorumeni kristali

Izkoristek: 20,2 % (96 mg)

Rf: 0,58 (heksan/etilacetat : 5/1)

T_{tališča}: 94-97 °C

IR (cm⁻¹): 2982, 1709, 1517, 1481, 1457, 1440, 1410, 1352, 1259, 1249, 1196, 1181, 1163, 1141, 1120, 1096, 1069, 1027, 1009, 826, 794, 748, 740

¹H-NMR (400 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm] = 1,28 (t, 3H, J=7,2 Hz, -CH₂-CH₃), 4,27 (k, 2H, J=7,2 Hz, -CH₂-CH₃), 5,82 (s, 2H, -CH₂-Ph), 6,96 (d, 2H, J=8,4 Hz, Ar-H), 7,13 – 7,17 (m, 1H, Ar-H), 7,30 – 7,34 (m, 1H, Ar-H), 7,38 (d, 1H, J=0,8 Hz, Ar-H), 7,46 (d, 2H, J=8,4 Hz, Ar-H), 7,57 (dd, 1H, J=8,4 Hz, J=0,8 Hz, Ar-H), 7,73 (d, 1H, J=8,0 Hz, Ar-H)

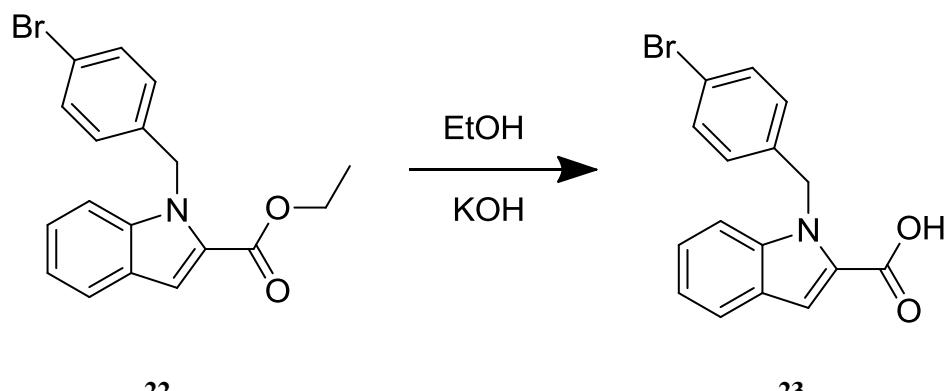
MS (ESI): 358,0

Mr (izračunana): 358,25

HR-MS: 358,0453 (izračunana: 358,0443)

Elementna sestava: C₁₈H₁₆BrNO₂

4.6.2. SINTEZA 1-(4-BROMOBENZIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (**23**)



Postopek:

V bučko smo natehtali 401 mg (1,119 mmol) etil 1-(4-bromobenzil)-1H-indol-2-karboksilata (**22**) ter dodali 8 mL etanola. Nato smo dodali 2,5 mL 1M raztopine KOH ter pustili mešati, dokler po 24 urah in preverbi s TLC nismo ugotovili, da je reakcija potekla. Nato smo

odpareli etanol in vodno fazo nakisali z 1M HCl do pH 3. Izborjeni produkt smo izolirali z odsesavanjem in ga čez noč posušili pri 75 °C ter dobili 0,339 g spojine **23**.

Rezultati:

Izgled: umazano bela amorfna snov

Izkoristek: 92,0 % (339 mg)

Rf: 0,42 (heksan/etilacetat : 5/1)

T_{tališča}: 176 - 180 °C

IR (cm⁻¹): 2929, 2604, 2360, 2342, 1672, 1615, 1519, 1483, 1459, 1440, 1429, 1321, 1266, 1207, 1164, 1138, 1072, 1011, 826, 800, 747, 736

¹H-NMR (400 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm] = 5,84 (s, 2H, -CH₂-Ph), 6,95 – 6,98 (m, 2H, Ar-H), 7,11 – 7,15 (m, 1H, Ar-H), 7,27 – 7,31 (m, 1H, Ar-H), 7,33 (s, 1H, Ar-H), 7,45 – 7,48 (m, 2H, Ar-H), 7,53 (dd, 1H, J=8,4 Hz, J=0,8 Hz, Ar-H), 7,71 (d, 1H, J=7,6 Hz, Ar-H), 13,02 (s, 1H, -COOH)

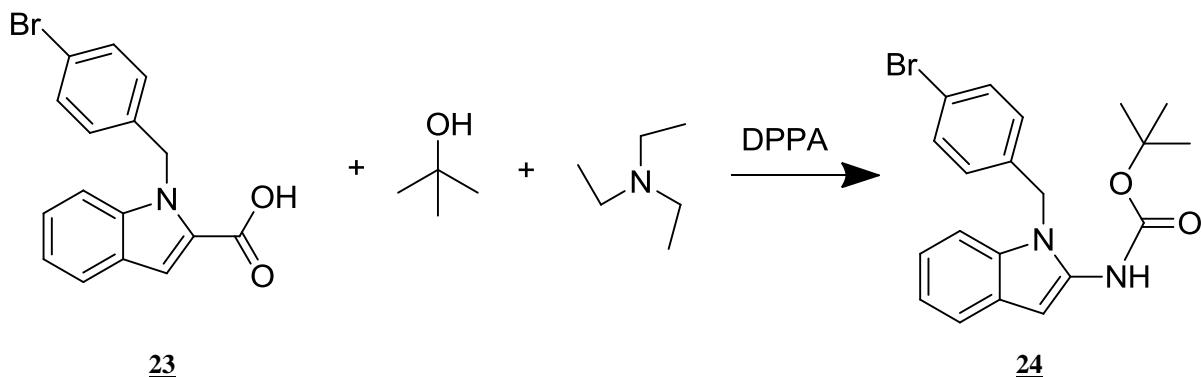
MS (ESI): 328,0 [M-H]⁻

Mr (izračunana): 329,005

HR-MS: 327,9979 (izračunana: 327,9973)

Elementna sestava: C₁₆H₁₂BrNO₂

4.6.3. SINTEZA TERC-BUTIL (1-(4-BROMOBENZIL)-1H-INDOL-2-IL)KARBAMATA (**24**)



Postopek:

V bučko smo natehtali 227 mg (0,690 mmol) 1-(4-cianobenzil)-1H-indol-2-karboksilne kisline (**23**) ter s pipeto dodali 7 mL *terc*-butanola in 100 mg zdrobljenih molekulskih sit. Po 20 minutah mešanja na oljni kopeli, segreti na 30 °C, smo dodali še 0,144 mL (1,5 eq; 1,0 mmol, ρ = 0,727 g/mL) trietylamina in 0,209 mL (1,5 eq; 1,0 mmol, ρ = 1,273 g/mL) difenilfosforilazida (DPPA), nato pa smo temperaturo oljne kopeli dvignili na 82 °C ter

reakcijsko zmes pustili mešati čez noč. Ko smo s TLC potrdili, da je reakcija potekla do konca, smo odpareli topilo in surov produkt očistili s kolonsko kromatografijo ter dobili 0,154 g spojine **24**.

Rezultati:

Izgled: bež amorfna snov

Izkoristek: 55,7 % (154 mg)

Rf: 0,30 (heksan/etilacetat : 5/1)

T_{tališča}: 132 - 136 °C

IR (cm⁻¹): 3221, 3136, 3080, 3019, 2979, 2928, 2360, 2342, 2170, 1685, 1578, 1561, 1510, 1487, 1463, 1442, 1392, 1368, 1335, 1313, 1259, 1216, 1152, 1106, 1070, 1058, 1011, 996, 968, 943, 918, 845, 806, 778, 763, 744, 727, 688, 670, 645

¹H-NMR (400 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm]= 1,42 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 5,33 (s, 2H, -CH₂-Ph), 6,34 (s, 1H, Ar-H), 6,94 – 7,01 (m, 3H, Ar-H), 7,25 (d, 1H, J=7,6 Hz, Ar-H), 7,32 – 7,35 (m, 1H, Ar-H), 7,44 – 7,47 (m, 3H, Ar-H), 9,34 (s, 1H, -NH)

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm]= 27,94; 44,38; 79,58; 109,73; 119,48; 119,58; 120,06; 120,51; 128,67; 130,41; 131,26; 131,37; 131,56; 133,59; 134,29; 137,51; 153,37

MS (ESI): 401,1 [M+H]⁺

Mr (izračunana): 400,079

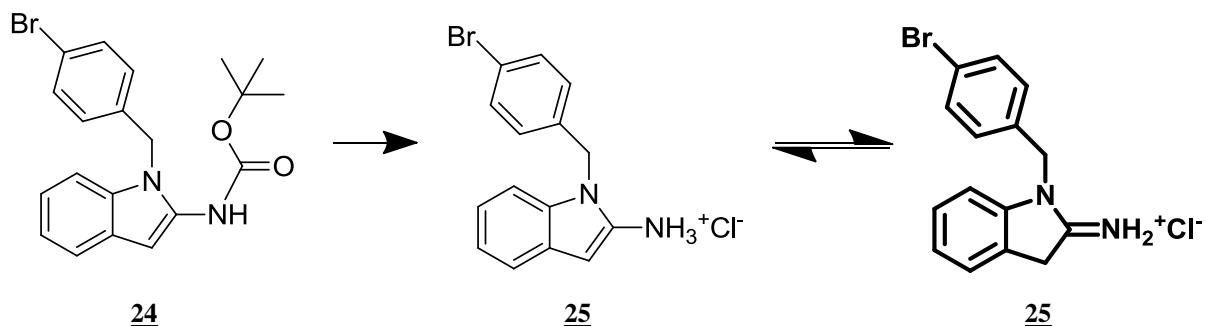
HR-MS: 401,0874 (izračunana: 401,0865)

Elementna sestava: C₂₀H₂₁BrN₂O₂

Elementna sestava za: C₂₀H₂₁BrN₂O₂

	Izračunane vrednosti	Ugotovljene vrednosti
%C	59,86	59,78
%H	5,27	4,97
%N	6,98	7,02

4.6.4. SINTEZA 1-(4-BROMOBENZIL)-1H-INDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (25)



Postopek:

V 25 mL bučko smo natehtali 120 mg (0,3 mmol) *terc*-butil (1-(4-bromobenzil)-1H-indol-2-il)karbamata (**24**) in ga raztopili v 4 mL dietiletra ter nato bučko za 10 minut hladili na ledeni kopeli. Nato smo dodali še 4 mL dietiletra, ki smo ga predhodno prepihal s HCl, ter pustili, da je reakcija potekala na ledu. Po 1,5 h smo s TLC zaznali, da je reakcija potekla do konca ter odpareli topilo pod znižanim tlakom. Vsebino bučke smo 4x suspendirali v 4 mL dietiletra ter ga vsakič odpareli. Nato smo še enkrat dodali 4 mL dietiletra ter bučko postavili v hladilnik. Po 16 h je izpadel želeni produkt, 1-(4-bromobenzil)-1H-indolin-2-iminijev klorid (**25**), ki smo ga odfiltrirali z odsesavanjem ter dobili 0,026 g spojine **25**.

Rezultati:

Izgled: svetlorjava amorfna snov

Izkoristek: 25,9 % (26 mg)

Rf: 0 (heksan/etilacetat : 5/1)

T_{tališča}: 78 - 82 °C

IR (cm^{-1}): 2968, 2924, 2169, 1697, 1604, 1591, 1566, 1487, 1463, 1392, 1366, 1261, 1204, 1152, 1112, 1070, 1010, 966, 781, 739, 687

¹H-NMR (400 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm]= 4,35 (s, 2H, indolin-CH₂), 5,32 (s, 2H, -CH₂-Ph), 7,12 (d, 1H, J=8,0 Hz, Ar-H), 7,20 (t, 1H, J=7,6 Hz, Ar-H), 7,30 – 7,35 (m, 3H, Ar-H), 7,49 (d, 1H, J=7,6 Hz, Ar-H), 7,58 (d, 2H, J=8,4 Hz, Ar-H), 10,27 (s, 1H, =NH), 10,62 (s, 1H, =NH)

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm] = 36,43; 45,54; 111,51; 121,63; 125,10; 125,25; 126,73; 128,48; 129,83; 132,17; 133,74; 143,79; 170,85

MS (ESI): 301,0 [M-Cl]⁺

Mr (izračunana): 336,48

HR-MS: 301.0333 (izračunana: 301.0340 brez Cl)

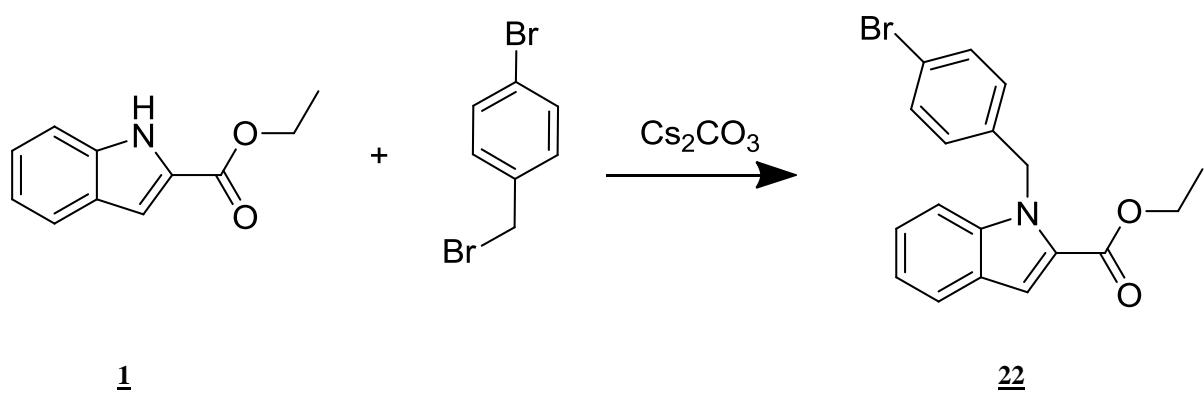
Elementna sestava: C₁₅H₁₄BrN₂Cl

Elementna sestava za C₁₅H₁₄BrN₂Cl

	Izračunane vrednosti	$C_{15}H_{14}BrN_2Cl$ x 0,25 HCl	Ugotovljene vrednosti
%C	53,36	51,96	52,27
%H	4,18	4,14	3,87
%N	8,30	8,08	7,69

4.7. SINTEZA 1-(4-CIKLOPROPILOBENZIL)-1H-INDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (29)

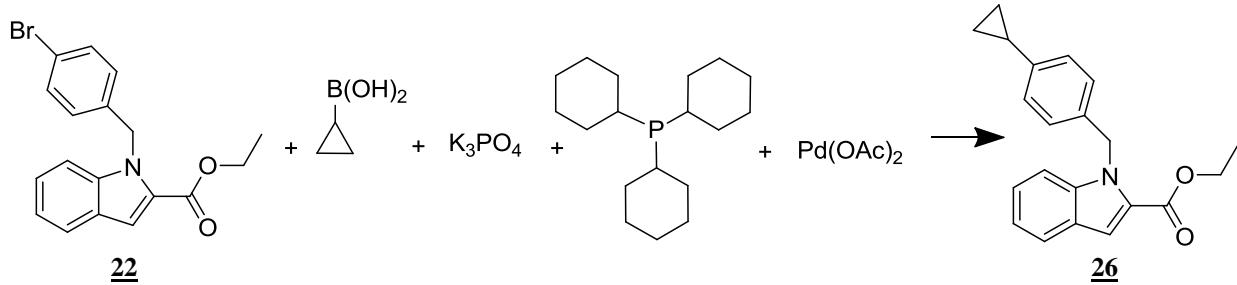
4.7.1. SINTEZA ETIL 1-(4-BROMOBENZIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILATA (22)



Postopek:

Postopek sinteze etil 1-(4-bromobenzil)-1H-indol-2-karboksilata je opisan že v 4.6.a

4.7.2. SINTEZA ETIL 1-(4-CIKLOPROPILBENZIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILATA (26) S SUZUKIJEVO CROSS-COUPING REAKCIJO



Postopek:

V dvogrlo bučko smo najprej natehtali 220 mg (0,610 mmol) etil 1-(4-bromobenzil)-1H-indol-2-karboksilata (**22**), dodali 456 mg (3,5 eq; 2,150 mmol) kalijevega fosfata in 69 mg

(1,4 eq; 0,8 mmol) ciklopropilboronske kisline. S pipeto smo nato dodali še 97 μ L (0,5 eq; 0,305 mmol, $\rho = 0,886 \text{ g/mL}$) tricikloheksilfosfina. Ločeno smo pripravili še 5 mL mešanice toluena in destilirane vode v razmerju 4:1, ki smo jo prepihalo z argonom in nato odmerili v dvogrlo bučko ter ponovno prepihalo z argonom. Na koncu smo v bučko dodali še 7,4 mg (0,054 eq; 0,033 mmol) paladijevega acetata.

Bučko z reakcijsko zmesjo smo nato opremili z vodnim hladilnikom in 24 ur segrevali nad oljno kopeljo pri 100 °C. Po koncu reakcije smo v dvogrlo bučko dodali 10 mL vode in vse skupaj prelili v ljubilo. Vodno fazo smo ekstrahirali z $2 \times 15 \text{ mL}$ etil acetata. Organsko fazo smo nato sprali z nasičeno raztopino NaCl, jo posušili z natrijevim sulfatom in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Surov produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo in dobili 134 mg spojine **26**.

Rezultati:

Izgled: svetlorumeno olje

Izkoristek: 68,3 % (134 mg)

Rf: 0,61 (heksan/etilacetat : 5/1)

T_{tališča}: /

IR (cm^{-1}): 2981, 2603, 2360, 2342, 1705, 1673, 1614, 1518, 1482, 1457, 1442, 1429, 1408, 1350, 1319, 1246, 1187, 1162, 1137, 1120, 1093, 1072, 1046, 1011, 897, 801, 765, 746

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO – d_6): δ [ppm] = 0,57 – 0,60 (m, 2H, -CH(-CH₂)₂), 0,85 – 0,90 (m, 2H, -CH(-CH₂)₂), 1,30 (t, 3H, $J=7,2 \text{ Hz}$, -CH₂-CH₃), 1,80 – 1,84 (m, 1H, -CH(-CH₂)₂), 4,29 (k, 2H, $J=7,2 \text{ Hz}$, -CH₂-CH₃), 5,80 (s, 2H, -CH₂-Ph), 6,92 (d, 2H, $J=8,4 \text{ Hz}$, Ar-H), 6,96 (d, 2H, $J=8,0 \text{ Hz}$, Ar-H), 7,14 (t, 1H, $J=7,6 \text{ Hz}$, Ar-H), 7,30 (t, 1H, $J=7,2 \text{ Hz}$, Ar-H), 7,36 (s, 1H, Ar-H), 7,57 (d, 1H, $J=8,8 \text{ Hz}$, Ar-H), 7,72 (d, 1H, $J=8,0 \text{ Hz}$, Ar-H)

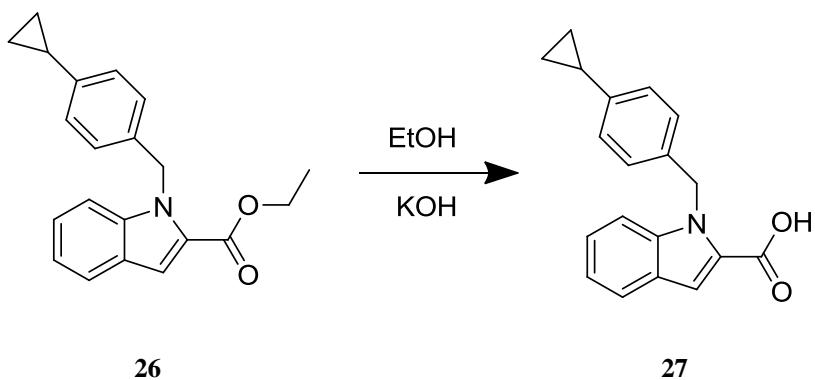
MS (ESI): 320,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Mr (izračunana): 319,157

HR-MS: 320,1646 (izračunana: 320,1651)

Elementna sestava: C₂₁H₂₁NO₂

4.7.3. SINTEZA 1-(4-CIKLOPROPILBENZIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (27)



Postopek:

V bučko smo natehtali 246 mg (0,771 mmol) etil 1-(4-ciklopropilbenzil)-1H-indol-2-karboksilata (26) ter dodali 8 mL etanola. Nato smo dodali 2,5 mL 1M raztopine KOH ter pustili mešati, dokler po 24 urah in preverbi s TLC nismo ugotovili, da je reakcija potekla. Nato smo odpareli etanol in vodno fazo nakisali z 1M HCl do pH 3. Izborjeni produkt smo izolirali z odsesavanjem in ga čez noč posušili pri 75 °C ter dobili 0,290 g spojine 27.

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 99,7 % (290 mg)

Rf: 0,10 (heksan/etilacetat : 5/1)

T_{tališča}: 182 - 186 °C

IR (cm⁻¹): 3021, 2600, 2530, 1670, 1615, 1518, 1483, 1459, 1442, 1428, 1357, 1321, 1270, 1199, 1165, 1138, 1102, 1047, 1017, 897, 846, 826, 807, 766, 747, 733

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1.14 (d, 6H, *J* = 7.2 Hz, (CH₃)₂CH), 2.77-2.84 (m, 1H, (CH₃)₂CH), 5.84 (s, 2H, Ar-CH₂), 6.97 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, Ar-H), 7.11-7.15 (m, 3H, Ar-H), 7.29 (dt, 1H, *J* = 7.2 Hz, *J* = 1.2 Hz, Ar-H), 7.32 (d, 1H, *J* = 0.8 Hz, Ar-H), 7.56 (dd, 1H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 0.8 Hz, Ar-H), 7.70 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, Ar-H), 12.99 (s, 1H, -COOH)

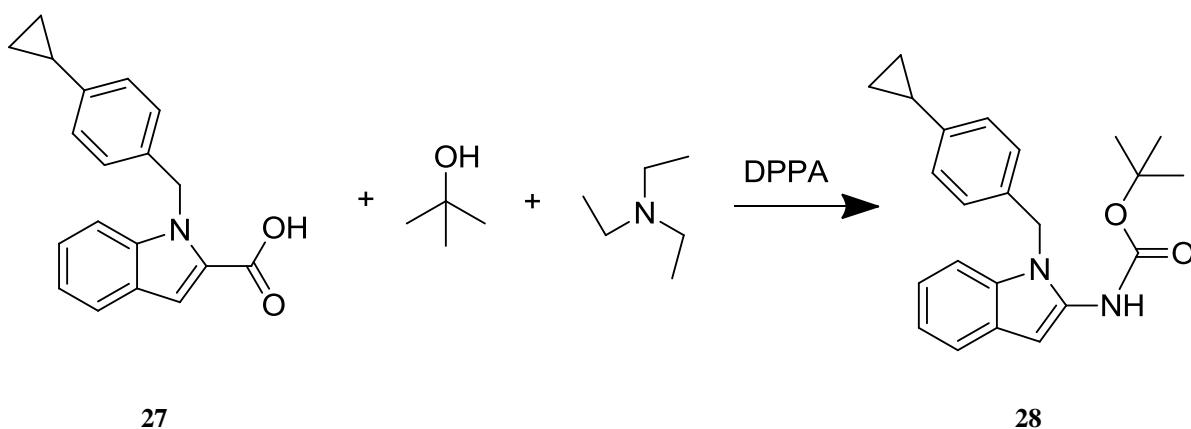
MS (ESI): 290,1 [M-H]⁻

Mr (izračunana): 291,126

HR-MS: 290,1189 (izračunana: 290,1181)

Elementna sestava: C₁₉H₁₇NO₂

4.7.4. SINTEZA TERC-BUTIL (1-(4-CIKLOPROPILBENZIL)-1H-INDOL-2-IL)KARBAMATA (28)



Postopek:

V bučko smo natehtali 171 mg (0,60 mmol) 1-(4-ciklopropilbenzil)-1H-indol-2-karboksilne kisline (27) ter s pipeto dodali 7 mL *terc*-butanola in 100 mg zdrobljenih molekulskih sit. Po 20 minutah mešanja na oljni kopeli, segreti na 30 °C, smo dodali še 0,123 mL (1,5 eq; 0,88 mmol, ρ = 0,727 g/mL) trietylamina in 0,179 mL (1,5 eq; 0,88 mmol, ρ = 1,273 g/mL) difenilfosforilazida (DPPA), nato pa smo temperaturo oljne kopeli dvignili na 82 °C ter reakcijsko zmes pustili mešati čez noč. Ko smo s TLC potrdili, da je reakcija potekla do konca, smo odpareli topilo in surov produkt očistili s kolonsko kromatografijo ter dobili 0,130 g spojine 28.

Rezultati:

Izgled: oker amorfna snov

Izkoristek: 59,8 % (130 mg)

Rf: 0,40 (heksan/etilacetat : 5/1)

T_{tališča}: 123 - 127 °C

IR (cm⁻¹): 3217, 3135, 3080, 3009, 2976, 2927, 2360, 2341, 2170, 1687, 1613, 1578, 1559, 1504, 1463, 1443, 1399, 1364, 1336, 1316, 1254, 1215, 1152, 1106, 1059, 1046, 1015, 995, 966, 941, 920, 901, 889, 845, 831, 812, 798, 777, 763, 745, 729, 712, 667, 623, 606

¹H-NMR (400 MHz, DMSO - d₆): δ [ppm] = 0,57 – 0,60 (m, 2H, -CH(-CH₂)₂), 0,85 – 0,90 (m, 2H, -CH(-CH₂)₂), 1,41 (s, 9H, -C(-CH₃)₃), 1,80 – 1,82 (m, 1H -CH(-CH₂)₂), 5,28 (s, 2H, -CH₂-Ph), 6,31 (s, 1H, Ar-H), 6,92 – 7,44 (m, 8H, Ar-H), 9,36 (s, 1H, -NH)

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm]= 9,27; 14,67; 27,97; 44,69; 79,53; 107,11; 109,85; 109,90; 119,38, 120,32; 125,32; 126,52; 126,89; 130,41; 133,61; 134,36; 134,90; 142,49; 153,39; 166,07

MS (ESI): 363,2 [M+H]⁺

Mr (izračunana): 362,199

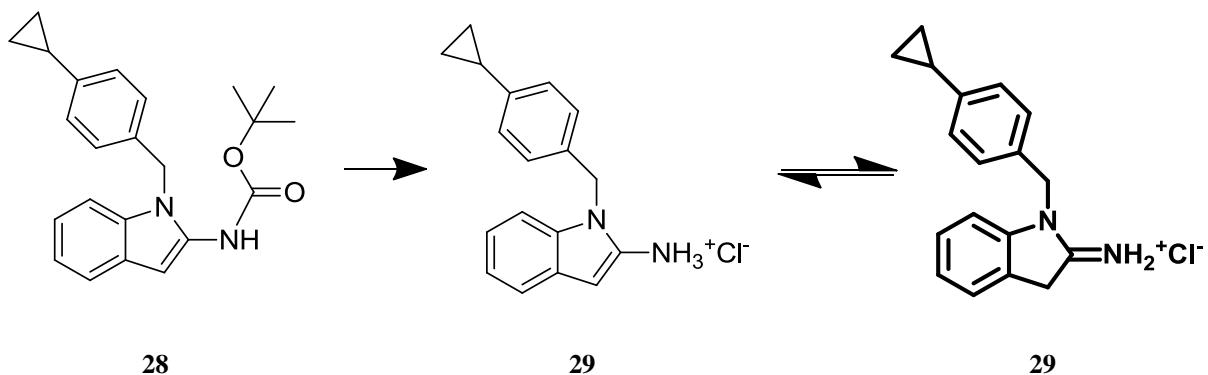
HR-MS: 363,2068 (izračunana: 363,2073)

Elementna sestava: C₂₃H₂₆N₂O₂

Elementna sestava za: C₂₃H₂₆N₂O₂

	Izračunane vrednosti	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₂ x 0,75 H ₂ O	Ugotovljene vrednosti
%C	76,21	73,47	73,09
%H	7,23	7,37	6,94
%N	7,73	7,45	7,72

4.7.5. SINTEZA 1-(4-CIKLOPROPILBENZIL)-1H-INDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (**29**)



Postopek:

V 25 mL bučko smo natehtali 109 mg (0,3 mmol) *terc*-butil (1-(4-ciklopropilbenzil)-1H-indol-2-il)karbamata (**28**) in ga raztopili v 4 mL dietiletra ter nato bučko za 10 minut hladili na ledeni kopeli. Nato smo dodali še 4 mL dietiletra, ki smo ga predhodno prepihal s HCl, ter pustili, da je reakcija potekala na ledu. Po 1,5 h smo s TLC zaznali, da je reakcija potekla do konca ter odpareli topilo pod znižanim tlakom. Vsebino bučke smo 4x suspendirali v 4 mL dietiletra ter ga vsakič odpareli. Nato smo še enkrat dodali 4 mL dietiletra ter bučko postavili v hladilnik. Po 16 h je izpadel želeni produkt, 1-(4-ciklopropilbenzil)-1H-indolin-2-iminijski klorid (**29**), ki smo ga odfiltrirali z odsesavanjem ter dobili 0,021 g spojine **29**.

Rezultati:**Izgled:** beli kristali**Izkoristek:** 23,8 % (21 mg)**Rf:** 0 (heksan/etilacetat : 5/1)**T_{tališča}:** 62 - 66 °**IR (cm⁻¹):** 2973, 2926, 2169, 1698, 1605, 1590, 1487, 1463, 1392, 1366, 1261, 1204, 1153, 1111, 1010, 966, 781, 739, 687**¹H-NMR (400 MHz, DMSO – d₆):** δ [ppm]= 0,61 – 0,65 (m, 2H, -CH(-CH₂)₂), 0,91 – 0,95 (m, 2H, -CH(-CH₂)₂), 1,86 – 1,92 m, 1H, -CH(-CH₂)₂), 4,36 (s, 2H, indolin-CH₂), 5,28 (s, 2H, -CH₂-Ph), 7,07 (d, 2H, J=8,4 Hz, Ar-H), 7,15 (d, 1H, J=7,6 Hz, Ar-H), 7,20 (dt, 1H, J=7,6 Hz, J=0,8 Hz, Ar-H), 7,25 (d, 2H, J=8,4 Hz, Ar-H), 7,30 – 7,34 (m, 1H, Ar-H), 7,49 (d, 1H, J=6,8 Hz, Ar-H), 10,21 (s, 1H, =NH), 10,58 (s, 1H, =NH)**¹³C-NMR (100 MHz, DMSO – d₆):** δ [ppm]= 10,01; 15,23; 36,36; 44,69; 111,65; 125,02; 125,20; 126,18; 126,70; 127,62; 128,44; 131,01; 143,89; 144,18; 170,58**MS (ESI):** 263,2 [M-Cl]⁺**Mr (izračunana):** 298,60**HR-MS:** 263,1541 (izračunana: 263,1548 brez Cl)**Elementna sestava:** C₁₈H₁₉N₂Cl**Elementna sestava za C₁₈H₁₉N₂Cl**

	Izračunane vrednosti	C ₁₈ H ₁₉ N ₂ Cl x 0,3 HCl	Ugotovljene vrednosti
%C	72,35	69,80	70,12
%H	6,41	6,28	5,60
%N	9,37	9,04	8,87

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. SINTEZNI POSTOPKI

Sinteza naših sedmih končnih spojin je v vseh primerih (razen pri ciklopropilnem derivatu) potekala v štirih stopnjah. Sintezo smo povsod začeli z etil 1*H*-indol-2-karboksilatom (spojina **1**), torej z indol-2-karboksilno kislino, pri kateri je bilo -COOH mesto zaščiteno v obliki etilnega estra. V sklopu sinteze smo izvedli (Shema 2):

- a) N-alkiliranje indolnega dušika,
- b) alkalno hidrolizo estrov substituiranih indol-2-karboksilatov,
- c) pretvorbo kisline do karbamata z vključujočo Curtiusovo premestitvijo
- d) acidolizno odstranitev BOC zaščite,
- x) Suzukijevo »cross-coupling« reakcijo (le pri ciklopropilnem derivatu).

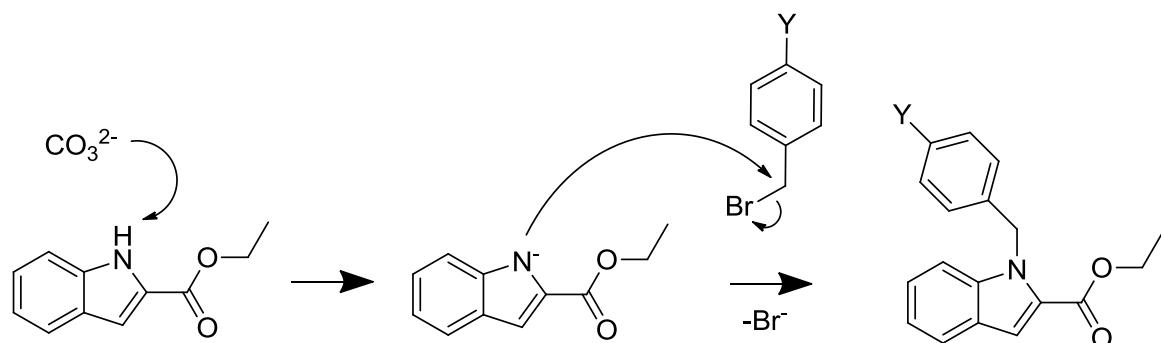
5.1.1. N-ALKILIRANJE INDOLNEGA DUŠIKA

Zaščita karboksilne skupine (-COOH) v obliki etilnega estra, kot etil 1*H*-indol-2-karboksilat, nam je omogočila selektiven potek reakcije na indolnem dušiku. Običajno pri sinteznih poteh N-alkiliranja uporabljam močne baze kot so NaH, KH, natrijev amid ali n-BuLi v polarnih aprotičnih topilih ali KOH v acetonu ali DMSO. Alternativni načini N-alkiliranja potekajo z uporabo tetraalkilamonijevih soli ali kronskeih etrov. Za alkiliranje indolov, ki so substituirani z elektronprivlačno skupino, pa zadostuje že uporaba šibke baze kot je K₂CO₃ in Cs₂CO₃ v polarnem aprotičnem topilu (50, 51).

Na splošno velja, da s pomočjo baze odcepimo proton na dušiku in indol na ta način sprememimo v dober nukleofil, ta pa nadalje reagira z benzilnim halidom, ki predstavlja dober elektrofil zaradi elektronakceptorskega značaja halogena na sosednjem ogljikovem atomu (Slika 13).

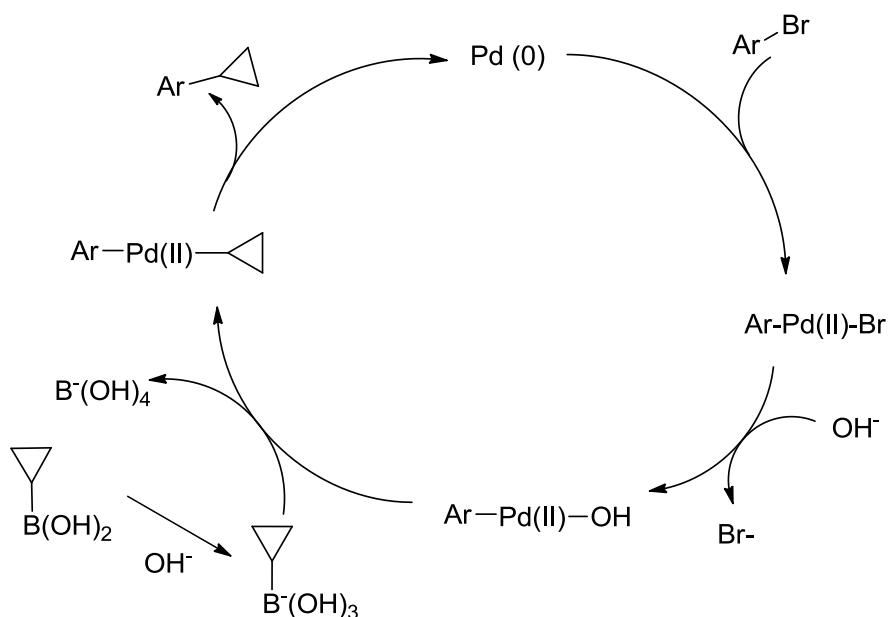
Jorapur in sodelavci so opazili, da so bromidni alkilhalidi bistveno bolj reaktivni kakor njihovi kloridni analogi. Razlog za to je v moči konjugirane baze, ki jo predstavlja halogenidni ion, saj le-ta slabša kot je, lažje se odcepi. Opazili so še, da ob sočasnem dodatku baze K₂CO₃ in alkilhalida nastane več stranskega produkta in ker poleg tega tako šibka baza potrebuje nekaj časa, da delno odcepi protone, smo tudi sami substituiran 4-Y-benzilbromid (Y = CH₃, CF₃, CN, Br, F ali izopropilna skupina) v reakcijsko zmes dodali 15 minut za dodatkom baze. Fink in sodelavci pa so ugotovili, da poteka reakcija neprimerno hitreje s

Cs_2CO_3 kakor s K_2CO_3 , kar smo opazili tudi mi, saj smo morali prvi dve reakciji N-alkiliranja (izopropilni in metilni derivat), pri katerih smo uporabili K_2CO_3 , izvajati več kot 48 ur, da je reakcija potekla do konca, medtem ko je bila reakcija z uporabo Cs_2CO_3 končana že po enem dnevu (50, 51).



Slika 13: N-alkiliranje etil indol-2-karboksilata

5.1.2. SUZUKIJEVA »CROSS-COUPLING« REAKCIJA



Slika 14: Potek Suzukijeve »cross-coupling« reakcije

Suzukijev »cross-coupling« je reakcija med organohalogenom in organoboranom, pri kateri ob uporabi paladija (katalizator) in baze, nastane sklopljen produkt (Slika 14). Reakcija se začne z oksidativno adicijo alkilhalogenida na $\text{Pd}(0)$, pri čemer nastane $\text{Pd}(\text{II})$ kompleks. Tricikloheksilsilfosfin v reakciji služi kot paladijev ligand. Molekula hidroksida nato reagira s paladijem, kar povzroči izpad broma iz kompleksa, druga molekula hidroksida pa reagira z

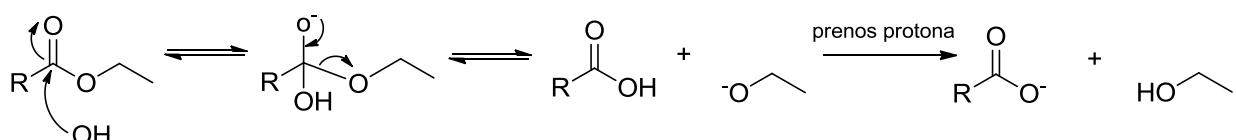
boronsko kislino. V naslednjem koraku pride do transmetalacije, pri čemer se ogljik prestavi h kovini, ki ima njemu podobno elektronegativnost. Ker je elektronegativnost ogljika (2,5) bližje paladijevi (2,4) kot borovi (2,0), se ogljik pripne na paladij, ob tem pa izstopi hidroksidna skupina. Sledi le še reduktivna eliminacija, pri kateri paladij (II) izstopi iz kompleksa ter znova postane Pd(0), ogljika pa pri tem tvorita vez (52).

Večim raziskovalnim skupinam je uspelo dokazati, da reakcija enostavno poteče tudi na indolih. Ugotovljeno je bilo tudi, da ob prisotnosti kisika nastane več stranskih produktov, zato smo pred reakcijo z argonom zrak odstranili iz reakcijske zmesi (53).

5.1.3. ALKALNA HIDROLIZA ESTROV

Po opravljenem N-alkiliranju smo lahko izvedli odščito karboksilne kislino. Najlažje se to lahko izvede z vodno raztopino natrijevega ali kalijevega hidroksida, torej s postopkom alkalne hidrolize estra (Slika 15). V sklopu te hidroksidni ion izvede napad na karboksilni ogljikov atom, čemur sledi odcepitev alkoxsidnega iona. Ker pride pri tem pride do prekinitve vezi med acilno skupino in alkoxsi kisikovim atomom, to imenujemo prekinitve acil-oksi. Teoretično bi lahko prišlo do prekinitve alkil-oksi, a so z označenim izotopom ^{18}O dokazali, da do tega ne pride (54).

Reakcija daje visoke izkoristke, kar se je izkazalo tudi pri našem eksperimentu. Produkt se v zmesi etanola in vode nahaja v obliki kalijeve soli, zato smo etanol odparili in preostalo vodno raztopino nakisali do pH 3, kar je povzročilo, da se je produkt izoboril kot prosta kislina.

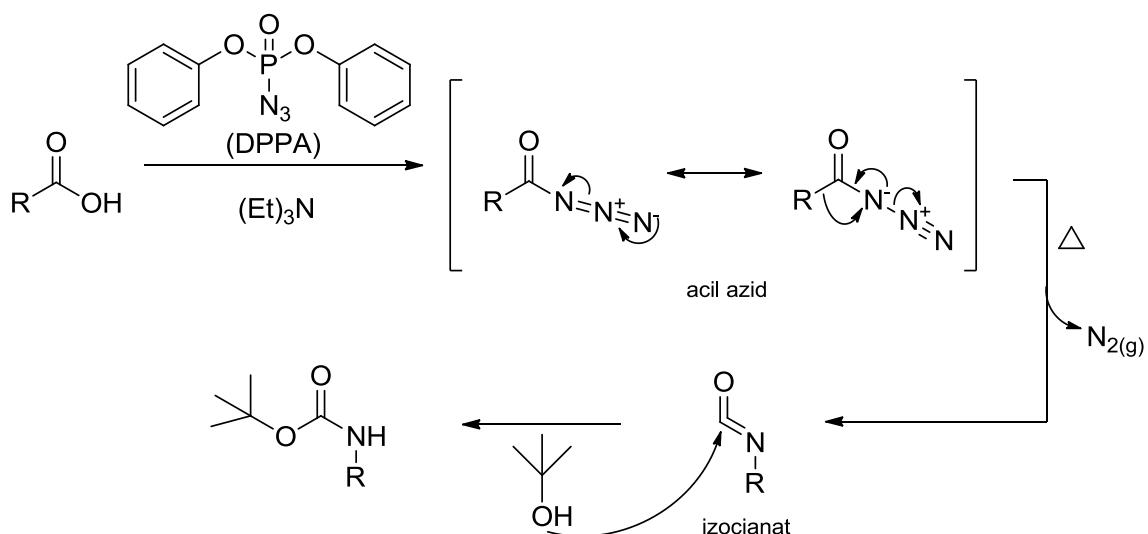


Slika 15: Potek alkalne hidrolize estrov

5.1.4. CURTIUSOVA PREMESTITEV

Curtiusova premestitev je elegantna rešitev, pri kateri lahko karboksilno skupino pretvorimo v primarne amine ali pa po drugi poti na elektrofilni izocianatni ogljik vežemo različne nukleofile, česar smo se poslužili tudi mi. DPPA, ki je v reakciji deloval kot kislinski aktivator oziroma tipični azidni prenosnik in bazo trietilamin (Et_3N) smo dodali karboksilni

kislini, pri čemer je nastal resonančno stabiliziran acil azid. Nato pri segrevanju izstopi dušik (N_2), kar vodi do premestitve skupine R iz ogljika na sosednji dušik – Curtiusove premestitve. Tako dobimo izocianat, na katerega lahko v nadaljevanju pripenjamo različne nukleofile, saj kisikov atom izocianata vleče elektronsko gostoto k sebi in podeli sosednjemu ogljiku elektrofilne značilnosti, kar je zelo ugodno za napad nukleofila. Mi smo kot nukleofil uporabili *tert*-butanol, s čimer smo izocianat direktno pretvorili v BOC-karbamat, zaščiten obliko primarne aminske skupine (Slika 16). Da reakcija brez težav poteka tudi na indolnem skeletu, so dokazali že Murakami in sodelavci (55).

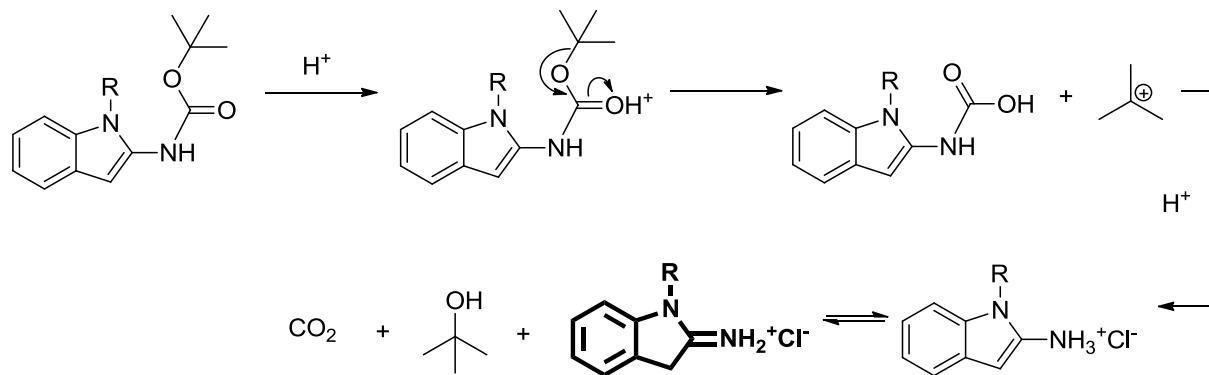


Slika 16: Potev Curtiusove premestitve

5.1.5. ODSTRANITEV BOC ZAŠČITE

Teoretično bi lahko končne produkte preko Curtiusove premestitve dobili tudi po drugi poti, torej tako da bi izocianat hidrolizirali in s tem direktno tvorili amine, ki smo jih mi pridobili šele v zadnjem koraku. A so prosti 2-aminoindoli načeloma zelo nestabilni, mi pa smo v zadnjem koraku tvorili stabilno sol, zato je bila zaščita aminov, ki smo jo dobili pri Curtiusovi premestitvi in odščita v naslednjem koraku bolj smiselna.

Za BOC zaščito je značilno, da je obstojna pri pH 4 – 12, zato za njeno odstranitev niso potrebni zelo kisli pogoji. Selektivno se jo lahko odstrani z acidolizo s klorovodikovo kislino v ocetni ali trifluorocetni kislini. Mi smo za odščito uporabili dietileter prepihan s $HCl_{(g)}$, kjer smo na podlagi TLC-jev ugotovili, da je bila odščita popolna. (Slika 17).

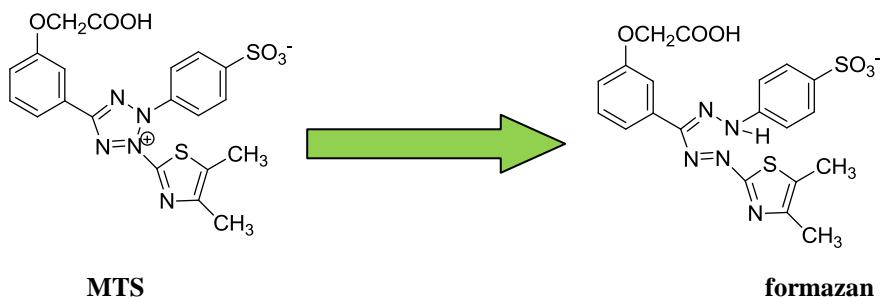


Slika 17: Odstranitev BOC zaščite z acidolizo

5.2. TESTIRANJE SINTETIZIRANIH SPOJIN

5.2.1. PREIZKUS CITO TOKSIČNOSTI

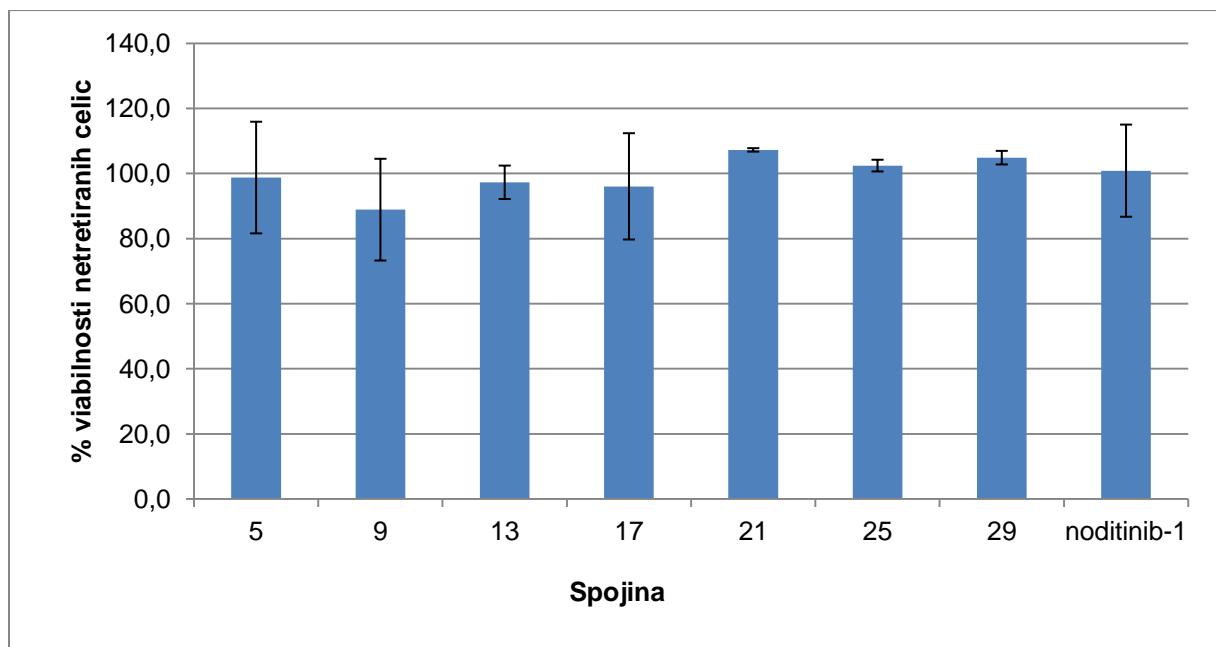
MTS test citotoksičnosti temelji na celični redukciji tetrazolnega MTS reagenta v vodotopni obarvani formazanski produkt (Slika 18), ki ga izmerimo spektrofotometrično pri 490 nm. Po celični smrti se redukcija tetrazolov takoj ustavi, zato je nastajanje formazanskega produkta proporcionalno številu živih celic v kulturi. MTS test je nadgradnja MTT testa, pri čemer je velika prednost prvega v tem, da je produkt MTS reagenta za razliko od produkta MTT reagenta vodotopen (56).



Slika 18: Redukcija MTS v formazan pri MTS testu

MTS test so izvedli pri 20 µM koncentraciji, pri čemer so poleg naših končnih spojin kot referenco izmerili še citotoksičnost noditiniba-1. MTS test je pokazal, da smo z bioizosterno zamenjavo klora z izbranimi bioizosternimi zamenjavami pri vseh izgubili citotoksičnost, kar je bil eden od ciljev našega dela. Ob enem pa smo tudi potrdili, da je klor res bil vzrok za citotoksičnost spojine vodnice. V primeru ohranitve citotoksičnosti ne bi mogli iti dalje na naslednji korak in sicer k meritvi antagonistične aktivnosti novih spojin, poleg tega pa bi bilo

potrebno nadaljnje vzroke za citotoksičnost iskati pri drugih delih spojine. Vzrok za nižjo viabilnost celic pri MTS testu ne pomeni nujno citotoksičnosti spojine, saj lahko do nižjih odstotkov viabilnosti netretiranih celic pride tudi, če spojina deluje citostatično ali antiproliferativno, a ker pri našem delu nismo imeli opravka s protitumornimi spojinami, lahko nižje odstotke viabilnosti celic pripišemo le citotoksičnosti testeranih spojin.



Grafikon 1: Rezultati testiranja na citotoksičnost skupaj s standardno deviacijo za naše sintetizirane spojine

5.2.2. PREIZKUS ANTAGONISTIČNE AKTIVNOSTI NA RECEPTORJU NOD1

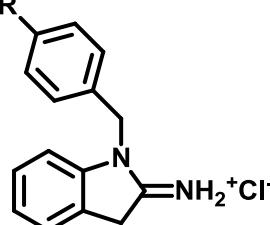
Naše končne sintetizirane spojine so nato testirali na celični liniji Ramos-BlueTM, ki med drugim izražajo tudi receptorje NOD1. Ramos-BlueTM je celična linija limfocitov B, ki stabilno izraža od NF-κB inducibilen reporterski gen za SEAP (izločena zarodna alkalna fosfataza, angl. secreted embryonic alkaline phosphate). Ob aktivaciji receptorjev NOD1 se preko signalne kaskade aktivira transkripcijski faktor NF-κB, ki sproži tvorbo SEAP, ki ga nato celice izločajo v supernatant. Za izmero koncentracije se nato v supernatant doda reagent QUANTI-BlueTM, ki ob prisotnosti SEAP spremeni barvo iz rožnate v modro. Spremembo se nato pomeri spektrofotometrično med 620 in 655 nm (48).

Ob antagonističnem delovanju naših spojin na receptorje NOD1 je posledično zavrta tudi aktivacija NF-κB, s tem pa se ne izloča SEAP, kar se pozna pri nespremenjeni barvi reagenta QUANTI-BlueTM.

Pri našem testiranju so kot agonist receptorjev NOD1 uporabili C12-iEDAP (5 μM), ki je naše celice aktiviral ter nato dodali noditinib-1 in naših sedem končnih spojin (20 μM). Po končani inkubaciji so v celičnem supernatantu, s pomočjo obarvanja z reagentom QUANTI-BlueTM, spektrofotometrično izmerili koncentracijo izločenega encima SEAP, s čimer je bila posredno ugotovljena tudi aktivnost NF-κB. Kot pozitivno kontrolo pri našem testiranju so uporabili vzorec z noditinibom-1, kot negativno pa vzorec brez antagonistika (torej le z dodanim agonistom). Pri vseh rezultatih so odšteli vrednost slepega vzorca (vse komponente posameznega vzorca, razen celic). Končni rezultat so izrazili kot rezidualno aktivnost NF-κB, ki je procentualni ostanek polne aktivnosti nastale zaradi agonista NOD1 (C12-iEDAP), zmanjšan zaradi antagonističnega učinka preiskušanih spojin.

Na podlagi rezultatov smo ugotovili, da je najnižjo rezidualno aktivnost izkazala spojina s trifluorometilno skupino (**13**) (58,3 %) (Preglednica II), katero lahko kot praktično edino označimo za aktivno, torej kot antagonist NOD1. Precej višjo rezidualno aktivnost je na drugem mestu izkazala spojina s ciano skupino (**17**) (70,9 %), ki je poleg spojine **13** še kot edina padla izven 20 % intervala variabilnosti testa, zaradi česar ji prav tako lahko pripisemo šibek antagonistični učinek na receptorje NOD1. Vse ostale spojine so se na lestvici rezidualne aktivnosti uvrstile znotraj intervala med 81% in 90 %, s čimer so vse padle znotraj 20% intervala variabilnosti in jim tako ne moremo pripisati antagonističnih učinkov.

Preglednica II: Rezultati testiranja zaviralne aktivnosti sintetiziranih spojin

	R	RA (%)
	CH-(CH₃)₂ – izopropil (5)	88,6
	CH₃ (9)	84,6
	CF₃ (13)	58,3
	CN (17)	70,9
	F (21)	89,7
	Br (25)	81,1
	CH-(CH₂)₂ – ciklopropil (29)	86,8

Ob pogledu na rezultate lahko najprej lahko opazimo, da nobena spojina z bioizosterno zamenjavo ni kazala niti približno podobnega antagonističnega učinka, kakor ga je 4-klorobenzilni derivat (spojava vodnica), pri čemer bi lahko sklepali, da je klor ravno pravilne velikosti, saj sta si v drugih parametrih (npr. v hidrofobnosti in Hammetovi konstanti) z

bromom precej podobna. Po drugi strani pa sta se kot najbolj aktivni izkazala trifluorometilni (**13**) in ciano substituiran derivat (**17**), ki po velikosti s klorom nista primerljiva (sta večja), sta pa izmed vseh substituentov najbolj izrazito elektronakceptorski skupini. Ciano in trifluorometilna skupina se močno razlikujeta v hidrofobnosti, pri čemer bi lahko sklepali, da predstavlja območje okoli *para* mesta na benzilnem obroču nekakšen hidrofobni žep, kjer največ k umestitvi doprinese elektronakceptorski značaj, manj pa hidrofobnost. Tu je potrebno imeti v obziru tudi velikost. Iz tega vidika se je fluorov derivat (**21**) odrezal najslabše, čeprav je fluor elektronakceptorska skupina, a je majhna. Spojina z izopropilnim substituentom (**5**), prav tako kaže nizko aktivnost, čeprav ima izopropilna skupina največji hidrofobni efekt. Vzrok za nizko aktivnost je v tem primeru verjetno elektronondonorski značaj in velikost. Ob koncu je potrebno omeniti tudi predvidevanje, da je spojina vodnica zelo verjetno kazala tako dobre rezultate na testu antagonistične aktivnosti ravno na račun svoje citotoksičnosti ter na ta način preprečila tvorbo NF-κB.

6. SKLEP

Spojina vodnica, 1-(4-klorobenzil)-1H-indolin-2-iminijev klorid, ki se je predhodno izkazala z dobrim antagonističnim učinkom na receptorju NOD1, ki je bil primerljiv tudi prvemu odkritemu selektivnemu antagonistu NOD1 (noditinib-1), je žal izkazovala tudi citotoksične lastnosti. Za namen magistrskega dela smo si to spojino izbrali za spojino vodnico ter na podlagi le-te poskušali sintetizirati sedem novih spojin tako, da smo izvedli bioizosterne zamenjave za klor, za katerega smo menili, da je vzrok za omenjene citotoksične lastnosti.

Ob zaključku magistrskega dela lahko podamo naslednje sklepe:

- uspešno smo sintetizirali vseh sedem načrtovanih spojin, ki so vsebovale bioizosterno zamenjavo za klor na fenilnem obroču spojine vodnice,
- test na citotoksičnost je pokazal, da je vseh sedem sintetiziranih spojin necitotoksičnih, kar je potrdilo domnevo, da je za citotoksičnost na spojini vodnici bil kriv prav klor,
- vse spojine z izjemo spojine **13** so bile brez antagonistične aktivnosti, pri čemer pa velja vseeno omeniti, da je imela spojina **13** drugo najboljšo antagonistično aktivnost pri do sedaj izmerjenih potencialnih antagonistih receptorjev NOD1, pri čemer vemo, da je bila indolna spojina z najboljšo antagonistično aktivnostjo (naša spojina vodnica) citotoksična,
- ob proučitvi rezultatov lahko sklepamo, da je za aktivnost na mestu štiri na benzenovem obroču, ob primerni velikosti, najbolj pomemben elektronakceptorški značaj, nekoliko manj pa hidrofobnost,
- meritve do sedaj sintetiziranih spojin kažejo, da se indolni skelet ni izkazal za boljše ogrodje kot benzimidazolni
- vseeno pa bi lahko poleg indolnega lahko preizkusili tudi druge ogrodne skelete npr. benztriazolnega ali indazolnega, ki so jih že večkrat uporabili za zamenjavo pri indolu, kot tudi pri benzimidazolu.

7. VIRI IN LITERATURA

1. Veliki zdravstveni priročnik: za domačo rabo. 1. izdaja, Mladinska knjiga, Ljubljana, 2000, 807-808.
2. Roitt I, Brostoff J, Male D: Immunology. 5. izdaja, Mosby, London, 1998, 1-3.
3. Franchi L, Warner N, Viani K, Nuñez G: Function of NOD-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Review*, 227, 2009: 106-28.
4. Vander A, Sherman J, Luciano D: Human physiology: the mechanisms of body function, 7. izdaja, WCB/McGraw-Hill, ZDA, 1998, 689-722.
5. Khan PM, Correa RG, Divlanska DB et al.: Identification of Inhibitors of NOD1-Induced Nuclear Factor- κ B Activation; *ACS Med. Chem. Lett.* 2011, 2, 780 – 785.
6. Newton K, Dixit VM: Signaling in Innate Immunity and Inflammation. *Cold Spring harb perspect biol* 2012, 1-19.
7. Inohara N, Nuñez G: NODs: Intercellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nature reviews (immunology)*, 2003 (5), 3, 371 – 382.
8. Geddes K, Magalhaes JG, Girardin SE: Unleashing the therapeutic potential of NOD-like receptors. *Nat Rev Drug Discov*; 2009, 8, 456 – 479.
9. Shaw MH, Reimer T, Kim YG, Nuñez G: NOD-like receptors (NLRs): bona fide intracellular microbial sensors. *Curr Opin Immunol*, 20, 4, 377–82.
10. Ting JPY, Lovering RC, Alnemri ES, Bertin J, Boss JM, Davis B, Flavell RA, Girardin SE, Godzik A, Harton JA, Hoffman HM, Hugot JP, Inohara N, MacKenzie A, Maltais LJ, Nuñez G, Ogura Y, Otten L, Reed JC, Reith W, Schreiber S, Steimle V, Ward PA: The NLR gene family: An official nomenclature. *Immunity*, 2008 (3), 28 (3), 285 – 7.
11. van Heel DA, Hunt KA, Ghosh S, Herve M, Playford RJ: Normal responses to specific NOD1-activating peptidoglycan agonists in the presence of the NOD2 frameshift and other mutations in Crohn's disease. *Eur. J. Immunol.*, 2006, 36, 1629 – 35.
12. Stober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T: Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nature reviews/Immunology*, 2006 (1), 6, 9 – 19.
13. Corea RG, Milutinovic S, Reed JC: Roles of NOD1 (NLRC1) and NOD2 (NLRC2) in innate immunity and inflammatory diseases. *Bioscl. Rep.*, 32, 2012, 597 – 608.
14. Jakopin Ž: Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) inhibitors: A rational approach toward inhibition of NOD signaling pathway. *Journal of Medicinal Chemistry*; 2014, 57, 6897 – 6918.

15. Kutikhin AG: Role of NOD1/CARD4 and NOD2/CARD15 gene polymorphisms in cancer etiology. *Human immunology*, 2011, 72, 955 – 68.
16. Philpott DJ, Sorbara MT, Robertson SJ, Croitoru K, Girardin SE: NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nature reviews/Immunology*, 2014 (1), 14, 9 – 23.
17. Khan PM, Correa RG, Divlianska DB, Peddibhotla S, Hampton Sessions E, Magnuson G, Brown B, Suyama E, Yuan H, Mangravita-Novo A, Vicchiarelli M, Su Y, Vasile S, Smith LH, Diaz PW, Reed JC, Roth GP: Identification of inhibitors of NOD1-induced nuclear factor- κ B activation. *ACS Med. Chem. Lett.* 2011, 2, 780 – 785.
18. Hasegawa M, Fujimoto Y, Lucas PC, Nakano H, Fukase K, Nuñez G, Inohara N: A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF- κ B activation. *EMBO J.* 2008, 27, 373 – 383.
19. Inohara N, Ogura Y, Chen FF, Muto A, Nuñez G: Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem*, 276, 4, 2551–4.
20. Kufer TA, Kremmer E, Adam AC, Philpott DJ, Sansonetti PJ: The pattern-recognition molecule Nod1 is localized at the plasma membrane at sites of bacterial interaction. *Cellular Microbiology* (2008), 10(2), 477 – 486.
21. Rickard DJ, Sehon CA, Kasparcova V, Kallal LA, Haile PA, Zeng X, Montoute MN, Poore DD, Li H, Wu Z, Eidam PM, Emery JG, Marquis RW, Gough PJ, Bertin J: Identification of selective small molecule inhibitors of the Nucleotide-binding Oligomerization Domain 1 (NOD1) signaling pathway. *Plosone; letnik 9, št 5, 2014, 1 – 12.*
22. Inohara N, Koseki T, Lin J, del Peso L, Lucas PC, Chen FF, Ogura Y, Nuñez G: An induced proximity model for NF- κ B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *JBC Papers and Press*, 2000, 1 – 31.
23. da Silva Correia J, Miranda Y, Leonard N, Hsu J, Ulevitch RJ: Regulation of Nod1-mediated signaling pathways. *Cell Death and Differentiation* (2007) 14, 830 – 839.
24. Yang L, Tang Z, Zhang H, Kou W, Lu Z, Li X, Li Q, Miao Z: PSMA7 directly interacts with NOD1 and regulates its function. *Cell physiol biochem*, 2013, 31, 952 – 59.
25. da Silva Correia J, Miranda Y, Austin-Brown N, Hsu J, Mathison J, Xiang R, Zhou H, Li Q, Han J, Ulevitch RJ: Nod1-dependent control of tumor growth. *PNAS*, 2006 (2), 103 (6), 1840 – 45.

26. Kang MJ, Heo SK, Song EJ, Kim DJ, Han SY, Ham JH, Kim BY, Park JH: Activation of NOD1 and NOD2 induces innate immune responses of prostate epithelial cells. Wiley periodicals, inc., The prostate, 2012, 72, 1351 – 58.
27. Correa RG, Khan PM, Askari N, Zhai D, Gerlic M, Brown B, Magnuson G, Spreafico R, Albani S, Sergienko E, Diaz PW, Roth GP, Reed JC: Discovery and characterization of 2-aminobenzimidazole derivates as selective NOD1 inhibitors. Chemistry & biology, 2011 (7), 18, 825 – 32.
28. Magnuson G, Khan P, Yuan H, Brown B, Divlanska DB, Stonich D, Peddibhotla M, Su Y, Dad S, Sergienko E, Chung TDY, Roth GP, Wimer C, Diaz P, Correa RG, Reed JC: High throughput screening assays for NOD1 inhibitors - probe 1. Molecular libraries, 2010, 1 – 20.
29. Hershberger PM, Peddibhotla S, Sessions EH, Divlanska DB, Correa RG, Pinkerton AB, Reed JC, Roth GP: Synthesis and physicochemical characterization of novel phenotypic probes targeting the nuclear factor-kappa B signaling pathway. Bielstein J. Org. Chem., 2013, 9, 900 – 7.
30. Drug design: www.rcmd.it/rcmd-portal/RR/06.Drug%20design.pdf
31. Sun H, Tawa G, Wallqvist A: Classification of scaffold-hopping approaches. Drug discov. today, 2011, 1 – 15.
32. Bergmann R, Liljefors T, Sørensen MD, Zamora I: Receptor-based scaffold HOPing by GRID-based similarity searches. J. chem. Inf. Model., 2009, 49, 658 – 669.
33. El-Araby M, Omar A, Hassanein HH, El-Helby A-G H, Abdel-Rahman AA: Design, synthesis and *in vivo* anti-inflammatory activities of 2,4-diaryl-5-4*H*-imidazolone derivates. Molecules, 2012, 17, 12262 – 75.
34. Böhm HJ, Flohr A, Stahl M: Scaffold hopping. Drug Discovery Today: Technologies, 2004, 1 (3), 217 – 24.
35. Brown N: Scaffold hopping in medicinal chemistry - Identifying and representing scaffolds. 1. izd. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014, 1 – 12.
36. Beaulieu PL, Gillard J, Bykowski D, Brochu C, Dansereau N, Duceppe JS, Hache B, Jakalian A, Lagace L, LaPlante S, McMercher G, Moreau E, Perreault S, Stammers T, Thauvette L, Warrington J, Kukolj G: Improved replicon cellular activity of non-nucleoside allosteric inhibitors of HCV NS5B polymerase: From benzimidazole to indole scaffolds. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2006, 16, 4987 – 93.
37. Schneider EH, Strasser A, Thurmond RL, Seifert R: Structural requirements for inverse agonism and neutral antagonism of indole-, benzimidazole-, and thienopyrrole- derived

- histamine H₄ receptor ligands. The journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2010, 334 (2), 513 – 21.
38. Cichero E, Cesarini S, Mosti L, Fossa P: CoMFA and CoMSIA analyses on 1,2,3,4-tetrahydropyrrolo[3,4-b]indole and benzimidazole derivatives as selective CB2 receptor agonists. J Mol Model, 2010, 16, 1481 – 98.
 39. Ohemeng KA, Roth B: Receptor-Based Design of Novel Dihydrofolate Reductase Inhibitors: Benzimidazole and Indole Derivatives. J. Med. Chem., 1991, 34, 1383 – 94.
 40. Takeuchi K, Bastian JA, Gifford-Moore DS, Harper RW, Miller SC, Mullaney JT, Sall DJ, Smith GF, Zhang M, Fisher MJ: 1,2-disubstituted indole, azaindole and benzimidazole derivatives possessing amine moiety: A novel series of thrombin inhibitors. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2000, 10, 2347 – 51.
 41. Williams DA, Lemke TL: Foye's principles of medicinal chemistry. 5. izdaja, Lippincott Williams & Wilkins, 2002, 59 – 62.
 42. Gaikwad PL, Gandhi PS, Jagdale DM, Kadam VJ: The use of bioisosterism in drug design and molecular modification. American journal of pharmtech research, 2012, 2 (4), 1 – 23.
 43. The practice of medicinal chemistry. 2. izdaja, Academic press, 2003, 192.
 44. Approaches of Classical Medicinal Chemistry Optimizing Drug Binding Affinity: (Semi) Empirical Studies: www.chem.uzh.ch/zerbe/MedChem/MedChem4_MedChem.pdf
 45. Lemoine SL: The development and implementation of a novel bioisosteric software program for the development of new pharmaceuticals. University of North Carolina, 2014, 1 – 94.
 46. Diana DG, Rudewicz PR, Pevear DC, Nitz TJ, Aldous SC, Aldous DJ, Robinson DT, Draper T, Dutko FJ, Aldi C, Gendron G, Oglesby RC, Volkots DL, Reuman M, Bailey TR, Czerniak R, Block T, Ronald R, Oppermann J: Picornavirus inhibitors: Trifluoromethyl substitution provides a global protective effect against hepatic metabolism. Journal of medicinal chemistry, 1995, 38 (8), 1355 – 71.
 47. Pekošak A: Načrtovanje in sinteza zaviralcev proteina NOD1 z indolnim skeletom. Ljubljana, 2013, 78 str.
 48. <http://www.invivogen.com/ramos-blue-cell> (april, 2015)
 49. MTS cell proliferation colorimetric assay kit:
<http://www.biovision.com/manuals/K300.pdf>
 50. Jorapur YR, Min Jeong J, Yoon Chi D: Potassium carbonate as a base for the N-alkylation of indole and pyrrole in ionic liquids. Tetrahedron Letters, 2006, 46, 2435 – 8.

51. Fink DM: Cesium carbonate promoted N-alkylation of indoles. *Synlett*, 2004, 13, 2394 – 6.
52. <http://www.name-reaction.com/suzuki-cross-coupling> (april, 2015)
53. Kotha S, Lahiri K, Kashinath D: Recent applications of the Suzuki – Miyaura cross-coupling reaction in organic synthesis. *Tetrahedron*, 2002 (58), 625, 9633 – 95.
54. Atkins PW, Clugston MJ, Frazer MJ, Jones RAY: *Kemija: zakonitosti in uporaba*. 1. izdaja, Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, 1995, 543.
55. Murakami Y, Watanabe T, Sakai M, Yokoyama Y: A new synthesis of epulauramine from benz (f) indole derivative. *Chem. Pharm. Bull.*, 1988, 36 (9), 3732 – 5.
56. <https://worldwide.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/cell-viability/> (april, 2015)