

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



ALEKSANDRA PEKOŠAK

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA ZAVIRALCEV PROTEINA
NOD1 Z INDOLNIM SKELETONOM**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF INDOLE SCAFFOLD-BASED NOD1
PROTEIN INHIBITORS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2013

Diplomsko naložbo sem opravljala 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 se zahvaljujem svojemu mentorju, doc. dr. Žigi Jakopinu, mag. farm. za ves vložen trud, čas, nasvete in strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Najlepša hvala tudi vsem ostalim članom Katedre za farmacevtsko kemijo, ki so mi pomagali pri opravljanju eksperimentalnega dela.

Zahvalila bi se rada tudi vsem, ki so mi tekom študija stali ob strani in me spodbujali, še posebej mami, ki mi je z vso ljubeznijo in potrpljenjem stala ob strani v vseh lepih in slabih trenutkih. Hvala prijateljem za vse čudovite in nepozabne trenutke, ki so mi polepšali študentska leta.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko naložbo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Žige Jakopina, mag. farm.

Ljubljana, 2013

Aleksandra Pekošak, l.r.

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Joško Osredkar, mag. farm., spec. med. biokem.
Član diplomske komisije: doc. dr. Janez Ilaš, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	I
POVZETEK	IV
KLJUČNE BESEDE	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
1. UVOD	1
1.1. IMUNSKI SISTEM	1
1.1.1. PEPTIDOGLIKAN	3
1.1.1.1. ZGRADBA PEPTIDOGLIKANA	3
1.1.1.2. MEZO-DIAMINOPIMELINSKA KISLINA	4
1.2. RECEPTORJI ZA PREPOZNAVO MOLEKULSKIH VZORCEV (PRR)	5
1.2.1. DRUŽINA RECEPTORJEV NOD	5
1.2.2. RECEPTORJI NOD1	6
1.2.3. ZNANI LIGANDI NOD1	9
1.3. »SCAFFOLD HOPPING«	12
1.3.1. BENZIMIDAZOLNI SKELET	14
1.3.2. MIMETIKI BENZIMIDAZOLNEGA SKELETA	15
1.4. INDOL	16
1.4.1. INDOL KOT OGRODJE POTENCIJALNIH UČINKOVIN	17
2. NAČRT ZA DELO	19
2.1. REAKCIJSKE SHEME	21
3. MATERIALI IN METODE	22
3.1. MATERIALI	22
3.2. METODE	23
3.2.1. Kromatografske metode	23
3.2.2. Spektroskopske metode	24
3.2.3. Določanje tališča	24
3.2.4. Biološko testiranje spojin	25
3.2.4.1. Priprava celične linije Ramos-Blue TM	25
4. EKSPERIMENTALNI DEL	26
4.1. SINTEZA 1-(4-NITROBENZIL)INDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (<u>5</u>)	26
4.1.1. SINTEZA ETIL 1H-INDOL-2-KARBOKSILATA (<u>1</u>)	26
4.1.2. SINTEZA ETIL 1-(4-NITROBENZIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILATA (<u>2</u>)	27
4.1.3. SINTEZA 1-(4-NITROBENZIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (<u>3</u>)	28
4.1.4. SINTEZA TERC-BUTIL (1-(4-NITROBENZIL)-1H-INDOL-2-IL)KARBAMATA (<u>4</u>)	29
4.1.5. SINTEZA 1-(4-NITROBENZIL)-INDOLIN-2-IMININIJEVEGA KLORIDA (<u>5</u>)	30
4.2. SINTEZA 1-BENZILINDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (<u>9</u>)	31
4.2.1. SINTEZA ETIL-1-BENZIL-1H-INDOL-2-KARBOKSILATA (<u>6</u>)	31
4.2.2. SINTEZA 1-BENZIL-1H-INDOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (<u>7</u>)	32
4.2.3. SINTEZA TERC-BUTIL (1-BENZIL-1H-INDOL-2-IL)KARBAMATA (<u>8</u>)	33
4.2.4. SINTEZA 1-BENZILINDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (<u>9</u>)	34
4.3. SINTEZA 1-(4-KLOROBENZIL)INDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (<u>13</u>)	35

4.3.1. SINTEZA ETIL 1-(4-KLOROBENZIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILATA (10)	35
4.3.2. SINTEZA 1-(4-KLOROBENZIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (11)	36
4.3.3. SINTEZA TERC-BUTIL (1-(4-KLOROBENZIL)-1H-INDOL-2-IL)KARBAMATA (12).....	37
4.3.4. SINTEZA 1-(4-KLOROBENZIL)INDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (13)	38
4.4. SINTEZA 1-(4-FLUOROBENZIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (15)	40
4.4.1. SINTEZA ETIL 1-(4-FLUOROBENZIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILATA (14)	40
4.4.2. SINTEZA 1-(4-FLUOROBENZIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (15)	41
4.5. SINTEZA 1-(4-TOLUENSULFONIL)INDOLIN-2-IMINA (20)	42
4.5.1. SINTEZA ETIL 1-(4-TOLUENSULFONIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILATA (16).....	42
4.5.2. SINTEZA 1-(4-TOLUENSULFONIL)-1H-INDOL-2-HIDRAZIDA (17)....	43
4.5.3. SINTEZA 1-(4-TOLUENSULFONIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (18)	44
4.5.4. SINTEZA TERC-BUTIL (1-(4-TOLUENSULFONIL)-1H-INDOL-2-IL)KARBAMATA (19).....	45
4.5.4. SINTEZA 1-(4-TOLUENSULFONIL)INDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (20).....	47
4.6. SINTEZA ETIL 1-((4-FLUOROFENIL)SULFONIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILATA (21).....	48
4.7. SINTEZA 1-(4-KLOROBENZOIL)INDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (27) 49	
4.7.1. SINTEZA BENZIL 1H-INDOL-2-KARBOKSILATA (22)	49
4.7.2. SINTEZA BENZIL 1-(4-KLOROBENZOIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILATA (23).....	50
4.7.3. SINTEZA 1-(4-KLOROBENZOIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (24)	51
4.7.4. SINTEZA 1-(4-KLOROBENZOIL)INDOLIN-2-KARBOKSILNE KISLINE (25) 52	
4.7.5. SINTEZA TERC-BUTIL (1-(4-KLOROBENZOIL)-1H-INDOL-2-IL)KARBAMATA (26)	53
4.7.6. SINTEZA 1-(4-KLOROBENZOIL)-INDOLIN-IMINIJEVEGA KLORIDA (27) 54	
4.8. SINTEZA 1-(2,4-DIKLOROBENZOIL)INDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (31).....	55
4.8.1. SINTEZA BENZIL 1-(2,4-DIKLOROBENOZIL)1H-INDOL-2-KARBOKSILATA (28).....	55
4.8.2. SINTEZA 1-(2,4-DIKLOROBENZOIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (29)	56
4.8.3. SINTEZA TERC-BUTIL (1-(2,4-DIKLOROBENZOIL)1H-INDOL-2-IL)KARBAMATA (30)	57
4.8.4. SINTEZA 1-(2,4-KLOROBENOZIL)INDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (31).....	58

5. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	60
5.1. SINTEZNI POSTOPKI	60
5.1.1. ZAŠČITA TER ODŠČITA INDOL-2-KARBOKSILNE KISLINE	60
5.1.2. UVAJANJE SUBSTITUENTOV NA INDOLNI DUŠIK	62
5.1.3. UVEDBA <i>terc</i> -BUTIL KARBAMATNE SKUPINE TER NJENA ODŠČITA DO AMINA	65
5.2. TESTIRANJE ZAVIRALNE AKTIVNOSTI SPOJIN	66
6. SKLEPI	71
7. LITERATURA	73
PRILOGE.....	i

POVZETEK

Imunski sistem je obrambni sistem našega organizma in spada med najosnovnejše temelje zdravja. Njegova kompleksna zgradba ponuja mnogo tarč pri iskanju novih učinkovin s katerimi bi lahko nanj vplivali, zato postajajo imunomodulatorji predmet mnogih raziskovanj. Tarča na katero smo se usmerili tekom diplomskega dela so znotrajcelični receptorji NOD1, ki prepoznavajo fragment peptidoglikana, in sicer *mezo-diaminopimelinsko kislino* in fragmente, ki jo vsebujejo. Aktivacija receptorja vodi do aktivacije NF- κ B in posledično do sproščanja vnetnih citokinov, kemokinov ter programirane celične smrti – apoptoze, kar lahko pri pretirani aktivaciji privede do septičnega šoka, kronične vnetne ali avtoimunske bolezni. Na tem mestu pa svoj potencial nakazujejo zaviralci receptorja NOD1 s katerimi bi lahko uspešno in selektivno zavirali vnetni odziv imunskega sistema.

V diplomskem delu smo načrtovali in sintetizirali nove zaviralce receptorja NOD1. Na osnovi poznavanja odnosov med strukturo in delovanjem že poznanih in uveljavljenih zaviralcev NOD1 smo s pomočjo »scaffold hoppinga« zasnovali nove spojine s 2-aminoindolnim skeletom. Indolni skelet se pojavlja v številnih biološko aktivnih spojinah in spada med »privilegirane strukture«, zato smo ga uporabili kot mimetik benzimidazola. Menjava skeleta se je na podlagi bioloških testiranj, pri katerih smo merili odstotek zaviranja aktivacije NF- κ B ob stimulaciji agonista C12iE-DAP na celicah Ramos-Blue™, izkazala za ustrezno. Najbolj aktivna spojina 13 (1-(4-klorobenzil)indolin-2-iminijev klorid) je pri nižjih koncentracijah zavirala aktivacijo NF- κ B celo boljše kot znan zaviralec Noditinib, vendar zaradi velike standardne deviacije ne moremo trditi, da je bila boljši zaviralec kot Noditinib. Kljub temu, da se je spojina 13 pri višjih koncentracijah izkazala za citotoksično, predstavlja dobro izhodišče za nadaljnjo optimizacijo.

ABSTRACT

The immune system is a defense system that protects us against diseases and is crucial for our health. Its complex structure offers several targets, which can be exploited for rational design of novel drugs which could affect the immune system, therefore immunomodulators are becoming the subject of many studies. Throughout the thesis our target was intracellular NOD1 receptor that detects fragments from peptidoglycan, specifically *meso*-diaminopimelic acid and *meso*-DAP containing fragments. In response to bacterial ligands NF- κ B pathway is activated, which leads to the production of pro-inflammatory cytokines, chemokines and apoptosis. The excessive response may also lead to septic shock, chronic inflammatory or autoimmune diseases. At this point NOD1 inhibitors, which could effectively and selectively inhibit the inflammatory response of the immune system, have an important role.

In the framework of my thesis we designed and synthesized novel NOD1 protein inhibitors. Based on the knowledge of structure-activity relationship of known NOD1 inhibitors we designed new compounds with 2-aminoindole scaffold using the "scaffold hopping". Indole scaffold is present in a number of biologically active compounds and it is regarded as a "privileged structure", therefore we used it as a benzimidazole mimetic. The scaffold replacement proved as satisfactory, based on biological tests measuring the percentage of inhibition of NF- κ B activation stimulated with agonist C12iE-DAP on the Ramos-BlueTM cells. At low concentrations the most active compound 13 (1-(4-chlorobenzyl)indoline-2-iminium chloride) inhibited NF- κ B activation even better than the well known inhibitor Noditinib, however because of the high standard deviation this compound cannot be regarded as a better inhibitor. In conclusion we assume that although compound 13 proved as cytotoxic at a high concentration, it represents a good starting point for further optimization.

KLJUČNE BESEDE

Imunomodulator, receptorji NOD1, aktivacija NF-κB, 2-aminoindol, 2-iminoindolin.

SEZNAM OKRAJŠAV

18-Crown-6 : angl. 1,4,7,10,13,16-hexaoxacyclooctadecane; 1,4,7,10,13,16-heksaoksocikloheksadekan

BIRs : Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein repeat ; zaviralec apoptoze beljakovin Baculovirusa

BOC : angl. *N-tert-Butoxycarbonyl* ; *tert*-butiloksikarbonil

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

CCR2b : angl. C-C chemokine receptor type 2 ; C-C humani kemokinski receptor tipa 2

CDCl₃ : devteriran kloroform

CDI : angl. 1,1'-Carbonyldiimidazole ; karbonildiimidazol

CIITA : angl. Class II, major histocompatibility complex, transactivator ; transkripcijski kofaktor, ki je potreben za aktivacijo glavnega histokompatibilnega kompleksa

COX2 : angl. Cyclooxygenase 2 ; ciklooksigenaza 2

d : dublet

DKM : diklorometan

DMF : dimetilformamid

DAP-epimeraza : angl. Diaminopimelate epimerase ; diaminopimelat epimeraza

DMAP : angl. 4-(N', N'-dimethylamino) pyridin ; 4-dimetilaminopiridin

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

DMSO – d₆ : devteriran dimetilsulfoksid

DPPA : angl. Diphenylphosphoryl azide ; difenilfosforil azid

ESI : angl. Electrospray ionisation ; ionizacija z elektro-razprševanjem

eq. : ekvivalent

g : angl. gas ; plin

HIV : angl. Human immunodeficiency virus ; virus humane imunske pomanjkljivosti

HPLC : angl. High performance liquid chromatography ; visokoločljivostna tekočinska kromatografija

HR-MS : angl. High Resolution Mass Spectrometry ; masna spektrometrija visoke ločljivosti

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

IKK : angl. IκB kinase ; IκB kinaza

IL : angl. interleukin ; interlevkin

IR : infrardeča spektroskopija

k : kvartet

LTA : angl. Lipoteichoic acid ; lipoteihoična kislina

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

m : multiplet

MCP-1 : angl. Monocyte chemoattractant protein-1 ; monocitni kemotaktični protein 1

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

MF : mobilna faza

MHC : angl. Major histocompatibility complex ; glavni histokompatibilni kompleks

Mr : molekulska masa

MS : masna spektrometrija

MurNAc : angl. N-acetylmuramic acid ; *N*-acetilmuraminska kislina

MurC : UDP-*N*-acetilmuraminska kislina: *L*-alanin ligaza

MurD : UDP-*N*-acetilmuramoil-*L*-alanin: *D*-glutamat ligaza

MurE : UDP-*N*-acetilmuramoil-*L*-alanin-*D*-glutamat: mezodiaminopimelat ligaza

MurF : UDP-*N*-acetilmuramoil-*L*-alanin-*D*-glutamat-mezodiaminopimelat: *D*-alanin-*D*-alanin ligaza

Mpl : angl. Murein peptide ligase ; murein peptidna ligaza

NF-κB : angl. Nuclear factor κappa-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 receptorjev NOD s kislo *N*-terminalno domeno

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

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

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

NLRX1 : angl. NOD-like receptors, leucine rich repeat containing X1 ; receptor NOD z levcinom bogato domeno X1

NMR : angl. Nuclear magnetic resonance ; jedrska magnetna resonanca

NOD : angl. Nucleotide-binding oligomerization domain receptors ; receptorji z nukleotid vezavno domeno oligomerizacije

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

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

RNA : angl. Ribonucleic acid ; ribonukleinska kislina

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

Rf : retencijski faktor

s : singlet

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

SEAP : angl. Secreted embryonic alkaline phosphatase ; izločena zarodna alkalna fosfataza

T : temperatura

t : triplet

TGF- β : angl. Transforming growth factor beta ; transformirajoči rastni faktor beta

Th2 : angl. T helper type 2 ; celice T-pomagalke tipa 2

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

δ : kemijski premik

1. UVOD

Povečanje odpornosti človeka pred nalezljivimi boleznimi sega že daleč v zgodovino. Z željo po povečanju odpornosti so ljudje začeli uporabljati številne tradicionalne pripravke, ki skrajšajo ali omilijo okužbe, in imajo kombinacijo imunomodulatornega in protimikrobnega učinka. Prav imunomodulatorji danes predstavljajo velik potencial pri preprečevanju in zdravljenju okužb, s katerimi lahko nadzorujemo aktivacijo prirojene imunosti ter vnetje, ki je ključno. Pomanjkanje vnetja je škodljivo, saj olajša okužbo, medtem ko prekomerna aktivacija lahko vodi do sindroma sistemskoga vnetnega odziva oziroma sepse. Le-ta pa lahko pripelje do končne odpovedi večih organov, zaradi katere človek umre. Pri imunomodulaciji lahko gre bodisi za imunosupresijo (zmanjšanje imunskega odziva) ali imunostimulacijo (povečanje imunskega odziva).

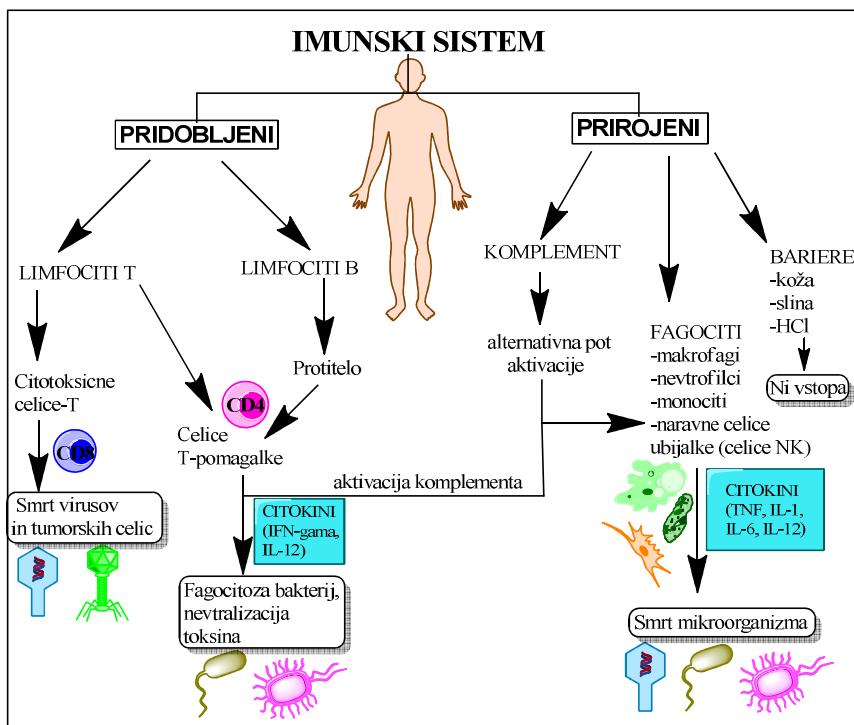
1.1. IMUNSKI SISTEM

Poglavitna fiziološka naloga imunskega sistema je obramba pred patogenimi mikroorganizmi, nevtralizacija toksinov ter uničenje tumorskih celic. Sesalci so tekom evolucije razvili učinkovit sistem obrambe, ki ga delimo na prirojeni (naravni) in pridobljeni imunski sistem. Prirojeni sistem predstavlja pomemben del obrambe pred mikroorganizmi, saj jim vstop v telo preprečujejo fizikalne bariere, kot so koža, kislost v želodcu, prilepljanje na površino sluznic, izločanje s sluzjo ter še mnoge druge nespecifične pregrade. Če bakterija kljub temu vstopi v telo, se aktivirajo številni receptorji (receptor za N-formilmektonin, Toll-u podoben receptor itd.), ki prepozna strukture značilne samo za patogene mikrobe. To povzroči aktivacijo komplementa in pospešitev fagocitoze, ki jo posredujejo nevtrofilci, monociti in tkivni makrofagi. Tudi pri znotrajceličnih bakterijah in virusih je fagocitoza poglavitni mehanizem naravne imunosti, le da se tukaj aktivirajo naravne celice ubijalke (celice NK). Obe poti aktivacije fagocitoze privedeta do povečanega nastajanja citokinov, ki spodbujajo nastanek vnetja, z namenom odstranjevanja mikroorganizma (1). (Preglednica I)

Preglednica I: Citokini prirojenega imunskega sistema (1)

Citokini	Izvorna celica	Funkcija
Tumor nekrotizirajoči faktor (TNF)	Makrofagi	Mediator vnetnega odziva, aktivacija nevtrofilcev, apoptoza celic, sinteza proteinov akutne faze v jetrih
Interlevkin-1 (IL-1)	Makrofagi	Mediator vnetnega odziva, sinteza proteinov akutne faze v jetrih
Kemokini (npr.: Interlevkin-8)	Makrofagi	Aktivacija levkocitov
Interlevkin-12 (IL-12)	Makrofagi	Sinteza IFN- γ , diferenciacija celic T CD8
Interferon- γ (IFN- γ)	Celice NK, limfociti T	Aktivacija makrofagov, mediator vnetnega odziva
Interferon tip I (INF- α , INF- β)	INF- α : makrofagi INF- β : fibroblasti	Aktivacija celic NK, povečana ekspresija MHC
Interlevkin-10 (IL-10)	Makrofagi, limfociti T	Zaviranje nastajanja IL-12
Interlevkin-6 (IL-6)	Makrofagi	Sinteza proteinov akutne faze v jetrih, proliferacija limfocitov B
Interlevkin-15 (IL-15)	Makrofagi	Proliferacija celic NK in limfocitov T
Interlevkin-18 (IL-18)	Makrofagi	Sinteza IFN- γ

Nekateri citokini spodbujajo tudi limfocite T in B ter tako okrepijo mehanizme specifične imunosti, ki predstavljajo najpomembnejši zaščitni imunski odziv. Limfociti so nosilci specifične imunosti in jih delimo v dve poglavitni skupini. Limfociti B prepoznavajo površinske antigene, proizvajajo protitelesa in so nosilci humoralne imunosti. Limfociti T pa prepozna le peptidne antigene, ki so vezani na molekulo glavnega histokompatibilnega kompleksa (MHC), ne proizvajajo protiteles in so nosilci celičnega imunskega odgovora. Limfocite T dodatno delimo še glede na prisotnost površinskega glikoproteina na limfocite CD4 in CD8, pri čemer so slednji citotoksični limfociti, ki povzročijo lizo celic in tako uničujejo virusne in tumorske celice. Celice T-pomagalke (limfociti CD4) pa se po aktivaciji hitro delijo, sproščajo citokine in pri tem spodbujajo limfocite B, da izločajo protitelesa. Enako tudi limfociti B aktivirajo celice T-pomagalke in tako povzročijo fagocitozo zunajceličnih bakterij, nevtralizacijo toksinov in aktivacijo komplementa, kar privede do uničenja bakterij ter sproščanja mediatorjev akutnega vnetja (1,2,3).



Slika 1: Prikaz imunskega sistema

1.1.1. PEPTIDOGLIKAN

Bakterijska celična stena je rigidna, močno strukturirana in kompleksna plast, ki ščiti bakterijsko celico pred zunanjimi vplivi, bodisi pred uničenjem s strani gostitelja, spremembami v osmoznem tlaku ali pa pred prehodom neželenih snovi. Glavna komponenta bakterijske celične stene je makromolekula peptidoglikan, na podlagi debeline in sestave le-tega pa ločimo med Gram-pozitivnimi in Gram-negativnimi bakterijami.

Gram-negativne bakterije imajo nekoliko bolj zapleteno zgradbo kot Gram-pozitivne, saj je njihova celična stena sestavljena iz tanke plasti peptidoglikana (7-8 nm), ter dodatne lipofilne zunanje plasti, ki jo sestavljajo lipopolisaharidi, fosfolipidi in purini. Pri Gram-pozitivnih bakterijah lahko peptidoglikan predstavlja do 90 % celotne celične stene (20-80 nm), v katerega sta vključeni teihoična in lipoteihoična kislina (LTA) (4,5).

1.1.1.1. ZGRADBA PEPTIDOGLIKANA

Peptidoglikan je sestavljen iz linearnih polisaharidnih verig - ogrodja, ki je prečno povezano s kratkimi peptidnimi verigami. Ogrodje tvorijo enote *N*-acetilglukozamina in *N*-acetilmuraminske kisline, ki so med seboj povezane z 1,4- β glikozidno vezjo. *N*-acetilmuramska kislina, ki je značilna samo za bakterije, z izjemo družine

Chlamydiaceae (6), je po kemijski zgradbi derivat *N*-acetilglukozamina, saj ima na C-3 atomu preko estrske vezi pripeto *D*-laktilno skupino. Na njene karboksilne kisline so dodatno vezani še tetra- oziroma pentapeptidi, na podlagi katerih lahko razlikujemo med vrstami bakterij. Gram-negativne bakterije imajo v teh peptidih sledeče zaporedje aminokislin: *L*-alanin, *D*-glutaminska kislina, *mezo*-diaminopimelinska kislina in *D*-alanin. Pri Gram-pozitivnih bakterijah pa je zaporedje sledeče: *L*-alanin, *D*-glutaminska kislina, *L*-lizin in *D*-alanin. Peptidi se med seboj še dodatno povezujejo, in sicer tvorijo direktno prečno povezavo (*mezo*-DAP in *D*-Ala) ali pa prečno povezavo preko peptidnega mostička (*D*-Ala in *D*-Lys), ki je običajno dolg 5 glicinskih enot (npr. pri *Staphylococcus aureus*) (4,5,6). Prečne povezave dajejo peptidoglikanu moč in rigidnost, pred proteolitično razgradnjijo pa naj bi ga varovala prisotnost *D*-aminokislin (6).

Za ohranitev celične integritete in oblike mora kontinuirano potekati biosinteza peptidoglikana. Pri tem kompleksnem procesu sodelujejo številni encimi, ki predstavljajo potencialna tarčna mesta za protimikrobnne učinkovine. Ena takšnih so specifični encimi ligaze Mur (MurC, MurD, MurE, MurF), ki na UDP-*N*-acetilmuraminsko kislino pripenjajo posamezne aminokisline (*L*-Ala, *D*-Glu, *mezo*-DAP / *L*-Lys, *D*-Ala-*D*-Ala) (6,8).

1.1.1.2. MEZO-DIAMINOPIMELINSKA KISLINA

Mezo-diaminopimelinska kislina (*mezo*-DAP) je gradnik peptidoglikana vseh Gram-negativnih bakterij in nekaterih Gram-pozitivnih bakterij (*Listeria monocytogenes* in *Bacillus spp.*) (9). Po zadnjih raziskavah naj bi bila prisotna tudi v družini *Chlamydiaceae*, čeprav za klamidije velja, da nimajo *N*-acetilmuraminske kisline in tako posledično nimajo *mezo*-DAP (6). *Mezo*-DAP nastane pri večstopenjski pretvorbi iz *L*-aspartata do *LL*-DAP, kjer zadnjo stopnjo pretvorbe do *mezo*-DAP katalizira encim DAP epimeraza (10).

Seveda pa poleg biosinteze peptidoglikana in njenih gradnikov v celični steni neprestano poteka tudi razgradnja peptidoglikana. Pri tem procesu sodelujejo številne mureinske hidrolaze, med katere uvrščamo litične transglukolaze, endopeptidaze, *L,D*-karboksipeptidaz ter amidaze (11), ki razgradijo peptidoglikan do tripeptida, *L*-Ala-*D*-glutamil-*mezo*-DAP, ki pa se lahko še dodatno razgradi do posameznih aminokislin ali pa vstopi v proces »recikliranja«, s pomočjo murein peptidne ligaze (Mpl) (12). Nastala fragmenta *L*-alanin-*D*-glutamil-*mezo*-diaminopimelinsko kislino (Tri-DAP) ter *D*-glutamil-*mezo*-diaminopimelinsko kislino (iE-DAP) pa prepozna jo znotrajcelični receptorji NOD1, ki aktivirajo NF-κB (13).

1.2. RECEPTORJI ZA PREPOZNAVO MOLEKULSKIH VZORCEV (PRR)

Prepoznavanje tujkov v telesu poteka z receptorji za prepoznavo molekulskeih vzorcev (PRR). Mednje sodijo receptorji TLR (Toll-u podobni receptorji), lektini tipa C, RIG-u podobni receptorji in znotrajcelični receptorji NOD. PRR prepoznajo molekulske vzorce povezane z mikrobi (PAMP), ki so navadno v notranjosti mikrobov in se sprostijo v okolico ob njihovem razpadu. Navzočnost PAMP je pogoj za aktivacijo prirojenega imunskega sistema, ki mu sledi vnetje, slednje pa lahko prepreči okužbe z drugimi bakterijami, virusi ali glivami. V kolikor lokalna vnetna reakcija ne uspe omejiti okužb pride do aktivacije specifičnega imunskega sistema. Pri naravnih okužbah so PAMP razpadli mikrobi (lipopolisaharid, peptidoglikan), pri cepljenju pa to funkcijo opravlja adjuvansi. Adjuvansi so lahko bakterijski lizati (Freundov adjuvans iz mikobakterij) ali pa sintezni analogi PAMP (agonisti receptorjev TLR, mimetiki muramil dipeptida), ki se dodajajo antigenom v celičnih pripravkih za stimulacijo nespecifične odpornosti pri bakterijskih infekcijah (3).

1.2.1. DRUŽINA RECEPTORJEV NOD

Receptorje NOD uvrščamo v družino znotrajceličnih NOD-u podobnih receptorjev (NLR), ki imajo pomembno vlogo pri regulaciji prirojenega imunskega odziva. Do sedaj je bilo pri človeku odkritih kar 23 različnih receptorjev NLR (14), ki jih lahko najdemo v limfocitih, makrofagih, dendritičnih celicah ter v epitelijskih celicah (14). Receptorji NOD predstavljajo pomemben razred v skupini receptorjev za prepoznavo molekulskeih vzorcev (PPR), saj kot molekulske vzorce prepoznavajo patogenom pridružene molekulske vzorce (PAMP) ter nevarnosti pridružene molekulske vzorce (DAMP), ki so posledica celičnega stresa (15). PAMP so lahko bakterijski lipopolisaharidi, bakterijski flagelin, lipoteihoična kislina, fragmenti peptidoglikana (muramil dipeptid, diaminopimelinska kislina) ali različne nukleinske kisline (dvovijačna RNA) (3). Sam mehanizem vstopa PAMP v notranjost celice še ni dobro pojasnjen, predvideva pa se, da le-ti po razpadu mikroba vstopijo s pomočjo fagocitov, por v membrani ali z mehanizmom celičnega privzema.

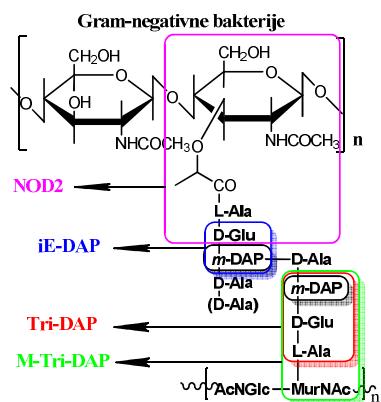
Receptorji so sestavljeni iz treh domen, in sicer iz centralne domene (NACHT), ki je skupna vsem, C-terminalne domene bogate z levcinom (LRR) in variabilne N-terminalne domene (15), glede na katero delimo receptorje na 4 skupine (16) :

- kisla transaktivacijska domena: NLRA
- domena zaviralnih proteinov apoptoze (BIRs): NLRB
- kaspazna dopolnilna domena (CARD): NLRC
- piridin: NLRP

V skupino NLRC uvrščamo receptorje NOD1, NOD2, NLRC3 (NOD3), NLRC5 (NOD4). Če v omenjeno skupino naštetih receptorjev vključimo še receptor NLRX1 (NOD5), ki je brez N-terminalne domene, ter receptor CIITA, ki spada v skupino NLRA in deluje kot transkripcijski faktor, dobimo skupino receptorjev NOD, ki so si filogenetsko podobni (16). Med njimi so najbolj poznani NOD1 in NOD2, pri našem raziskovanju pa se bomo osredotočili zgolj na receptorje NOD1.

1.2.2. RECEPTORJI NOD1

Receptorji NOD1 so izraženi v različnih celicah (npr. monocitih, makrofagih, dendritičnih celicah, limfocitih T, kardiomiocitih in srčnih fibroblastih (17)) in zaznavajo fragmente peptidoglikana z diaminopimelinsko kislino, ki je prisotna v Gram-negativnih in določenih Gram-pozitivnih bakterijah. Receptorji NOD1 kot molekule PAMP prepoznavajo različne molekule, in sicer samo *mezo*-DAP (18), fragment *D*-glutamil-*mezo*-diaminopimelinsko kislino (*iE*-DAP), *L*-alanin-*D*-glutamil-*mezo*-diaminopimelinsko kislino (*m*-DAP) ter MurNAc-*L*-alanin-*D*-glutamil-*mezo*-diaminopimelinsko kislino (*M*-Tri-DAP) (16). Za razliko od receptorjev NOD1 pa so receptorji NOD2 manj selektivni in prepoznavajo muramil dipeptid, ki se nahaja tako v Gram-negativnih in Gram-pozitivnih bakterijah (15). (Slika 2)



Slika 2: Nekatere molekule PAMP, ki jih zaznavajo receptorji NOD1

Molekule PAMP po razpadu peptidoglikana vstopijo v citosol ter interagirajo z receptorji NOD1. Sam način vstopa je delno pojasnjen samo za iE-DAP, ki najverjetneje vstopa v celico s pomočjo protonsko odvisnega transporterja PEPT2, ki z aktivno translokacijo omogoča prehod di- in tripeptidom skozi epiteljsko tkivo, še posebej v pljučih (19). Po prepoznavi specifičnega liganda za receptor NOD1 pride do aktivacije receptorja, pri čemer domena CARD interagira z domeno CARD adaptorske serin-treonin kinaze RIP2, kar vodi do aktivacije proteina RIP2 (15). Le-ta posreduje ubikvitin do regulatorne podenote kinaznega kompleksa (IKK γ), imenovane tudi bistveni modulator NF- κ B (NEMO), kar povzroči sekundarno modifikacijo proteina oziroma ubikvitinilacijo. Slednja do aktivacije katalitične podenote IKK α in IKK β ter posledično do aktivacije IKK kompleksa, ki je bistven za aktivacijo NF- κ B. Dodatno pa ubikvitiniliran RIP2 aktivira s transformirajočim rastnim faktorjem beta (TGF- β) aktivirano kinazo (TAK1), ki je bistvena za aktivacijo IKK in aktivacijo z mitogenom aktivirane proteinske kinaze (MAPK) (20). Končni rezultat aktivacije receptorjev NOD1 je vnetje, sproščanje vnetnih citokinov (najpogostejša sta TNF- α in IL-6), kemokinov ter apoptoza (21).

Aktivacija prirojenega imunskega sistema, ki jo posredujejo receptorji NOD1, je pomembna za obrambo organizma pred tujki. Slednja pa je lahko porušena v primeru okvare ali prizadetosti imunskega sistema. Ena izmed takšnih možnosti je mutacija receptorjev NOD1, ki lahko vodi do različnih kroničnih bolezni, katerih mehanizem še ni točno pojasnjen. Te bolezni so astma, atopični dermatitis in kronična vnetna črevesna bolezen (najpogostejši bolezni v tej skupini sta Chronova bolezen in ulcerozni kolitis) (15). Naštete mutacije sočasno vplivajo tudi na zmanjšano število serumskih protiteles IgE. Mutacija, ki jo povezujemo z astmo, vodi do spremembe v izoformah proteina NOD1, ki se ne odzovejo na ligande NOD1. Mutacija, ki jo povezujejo z atopičnim dermatitisom, prav tako vodi k povečani aktivaciji NF- κ B in pomanjkanju regulatornih izoform (15). Polimorfizem receptorjev NOD1 nekateri povezujejo tudi s sarkoidozo (večorganska bolezen neznanega vzroka), avtoimunskim uveitisom (vnetje žilnice), multiplo sklerozu ter vnetjem žil. Pri omenjenih kroničnih boleznih je aktivacija NF- κ B pretirana in vodi do nenormalnega vnetnega odziva, še posebej pri astmi in kronični vnetni črevesni bolezni. Dodatno lahko makrofagi v črevesju bolnikov s Chronovo boleznijo povzročijo prekomerno aktivacijo NF- κ B, vključno z TNF- α in interlevkinoma IL-1 β in IL-6 (1). Polimorfizme receptorjev NOD1 v zadnjih letih povezujejo še z določenimi tipi raka

(želodca, jajčnikov, prostate, pljučnega raka ter tudi limfomom) (22) ter inzulinsko rezistenco pri sladkorni bolezni tipa 2 (23).

Znano je, da je pretirana aktivacija NF-κB škodljiva, saj povzroči pretirano izločanje citokinov, levkocitnih adhezijskih molekul in indukcijo apoptoze, kar lahko vodi v septični šok, kronične vnetne in avtoimunske bolezni, ki smo jih že omenili. Na podlagi raziskav so ugotovili, da lahko z aplikacijo agonista NOD1 (C12-iEDAP) pri miškah selektivno povzročimo pretirano aktivacijo imunskega sistema, ki vodi do srčne disfunkcije, kar se kaže v srčni fibrozi in apoptizi kardiomiocitov. Pri tem pride do aktivacije NF-κB in TGF-β ter povečane ekspresije encimov COX2 (17). Z aplikacijo agonista NOD1 so pri miškah stimulirali tudi produkcijo citokinov v endotelijskih celicah koronarne arterije, kar se je pokazalo kot koronarni artritis z gostim celičnim infiltratom (makrofagi in nevtrofilci), histopatološko zelo podoben akutni fazi Kawasaki-jeve bolezni (24). Slednja bolezen je redka, vendar ena najpogostejših oblik vaskulitisa pri otrocih. Znan agonist NOD1, ki se uporablja kot adjuvans, lahko po aplikaciji privede do hipotenzije, večorganske odpovedi in septičnega šoka pri podganah. Pri tem pride pri podganah do hipotenzije, tahikardije, ledvične odpovedi (povečane vrednosti sečnine in kreatinina, manjšega povečanja vrednosti kreatinin kinaz, povišanja kompleksa trombin/antitrombin III), povečane sinteze citokinov (višje vrednosti TNF, IL-6, IL-1β, IL-10) ter povišanih vrednosti nitritov/nitratov v serumu (25).

Receptorji NOD1 predstavljajo odlično izhodišče za razvoj novih učinkovin, saj jih povezujemo s kopico različnih bolezni, navsezadnje pa je njihova ključna vloga preprečevanje mikrobnih infekcij, katerim smo ljudje vsakodnevno izpostavljeni. Vlogo receptorjev NOD1 pri obrambi človeškega organizma povezujejo s sledečimi patogeni: *Pseudomonas aeruginosa*, *H. pylori*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella flexneri* (15) ter *Legionella pneumophila* (25). Prednost oziroma potencial receptorjev NOD1 je ravno v tem, da prepozna specifične fragmente peptidoglikana in direktno aktivirajo NF-κB, ki nadzira sintezo vnetnih molekul (1). Aktivacijo NF-κB, ki jo povzročijo NOD1 ligandi (npr. mezo-DAP) ali pa pretirana aktivacija receptorjev NOD1 (npr. avtoimunske bolezni), bi lahko zavirali z zaviralci receptorjev NOD1. Že raziskani zaviralci receptorjev NOD1 selektivno modulirajo konformacijo proteina NOD1 in spremenijo njegovo lokalizacijo (24), kar se kaže kot selektivno zaviranje izločanja IL-8, ki je odvisno od NOD1, ter selektivno zaviranje od NOD1 odvisne aktivacije NF-κB (21). Tako bi lahko z uporabo zaviralcev NOD1, pri

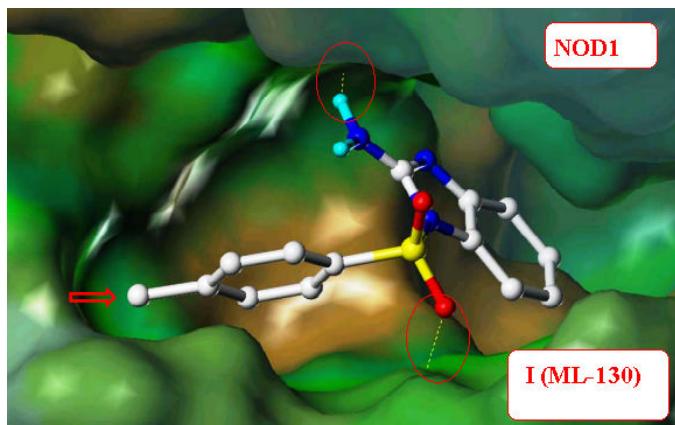
akutnih in kroničnih boleznih, zmanjšali vnetni odziv prirojenega imunskega sistema ter ponovno vzpostavili imunsko homeostazo ali pa preprečili različne infekcije. Sama farmakološka uporaba zaviralcev NOD1 je kljub dobremu poznavanju receptorjev NOD1 še slabo poznana, zato se poraja vprašanje, ali bi lahko sploh uspešno zavirali aktivacijo NOD1, brez škodljivega delovanja na imunski sistem organizma.

1.2.3.ZNANI LIGANDI NOD1

Dandanes se razvoj osredotoča na majhne molekule kot zaviralce receptorjev NOD1, ki so v dosedanjih raziskavah pokazale precejšen potencial. Mednje spadajo derivati 2-aminobenzimidazola, ki so jih v svoji raziskavi karakterizirali Correa in sodelavci. Do slednjih so prišli z metodo visoko zmogljivega rešetanja spojin iz molekulske knjižnice, ki je vsebovala okoli 290.000 majhnih molekul. Cilj rešetanja spojin je bila identifikacija spojin, ki bi zavirale NOD1 z $IC_{50} \leq 1 \mu M$. V ožji izbor je prišlo 309 spojin z $IC_{50} \leq 10 \mu M$, ki so jih še dodatno testirali na citotoksičnost (Alamar blue test). Za testiranje so bile uporabljene HEK293T-NF- κ B-luciferazne celice, kjer so opazovali z agonisti NOD1 posredovano aktivacijo NF- κ B (γ -tri-DAP) in supresijo z agonistom NOD1 posredovanega izločanja IL-8 iz celične linije MCF-7 (21, 24). Končne spojine, ki so jih dobili z navedeno metodo, so vsebovale 3 različne skelete, in sicer: tetrahidroizokinolin, indolin in benzimidazolni obroč, vendar jih je večina zavirala NOD1 z $IC_{50} > 10 \mu M$. Pogoju $IC_{50} \leq 1 \mu M$ so ustrezale le spojine z benzimidazolnim obročem (21). (Preglednica II) Izmed vseh derivatov se je najbolj izkazala spojina I (CID-1088438 oziroma ML-130) (Slika 5), ki je zavirala izražanje IL-1 β , IL-6 in TNF- α ter ni izkazovala citotoksičnosti, prav tako pa ni vplivala na receptorje NOD2 in TLR. Spojina je bila nadalje okarakterizirana kot prvi selektiven in močan zaviralec receptorja NOD1 z $IC_{50} = 0,56 \pm 0,04 \mu M$ (21). Spojini I so *in vitro* določili ADME lastnosti, kjer so ugotovili, da je slabo topna, in da ima visoko zmožnost prehajanja skozi celične membrane pri pH 3. Spojina izkazuje tudi zmerno vezavo na plazemske proteine z odlično stabilnostjo v plazmi človeka ter mišk, ter dobro stabilnost v prisotnosti človeških mikrosomov. Dodatno so *in vivo* testirali še njene farmakokinetske lastnosti v miškah (30 in 15 mg/kg), kjer je bil t_{max} po 20 min (19), ter jo sidrali v delno strukturo receptorja NOD1 (kristalna struktura humane domene, ki jo rekrutira kaspaza: NOD1_CARD; Protein data bank 2nz7). Sulfonilna in aminska skupina tvorita vodikove vezi s proteinom NOD1, vezavno afiniteto pa verjetno poveča tudi fenilni obroč, vsidran v žepek na levi strani proteina (9). (Slika 3)

Preglednica II: SAR analiza 2-aminobenzimidazolnega skeleta

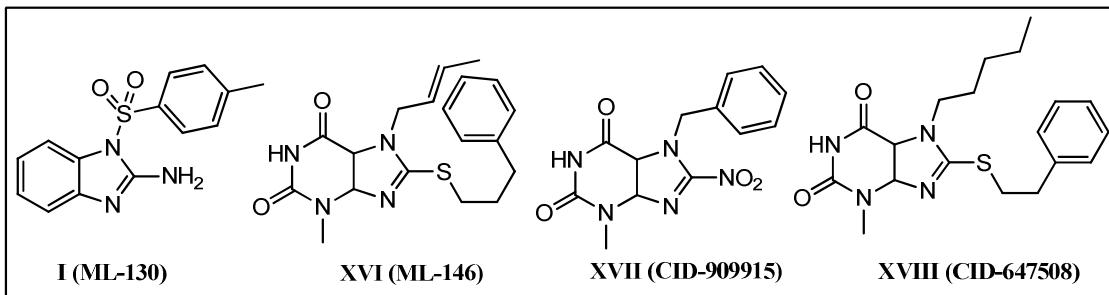
<chem>*c1cc2c(cc1N(*)C(=*)c3ccc(*)cc3)N(*)c4ccc(*)cc4</chem> I - XV							
Spojina	R1	R2	R3	X	Y	N	IC50 (µM)
I	H	H	Me	SO2	NH2	6	0,56 +/- 0,04
II	H	H	Cl	SO2	NH2	2	0,09 +/- 0,01
III	H	H	OMe	SO2	NH2	4	2,7 +/- 0,69
IV	H	H	H	SO2	NH2	4	2,2 +/- 0,21
V	H	H	NO2	SO2	NH2	6	14,0 +/- 1,8
VI	H	H	Me	SO2	H	2	6,3 +/- 0,81
VII	H	H	Me	SO2	Me	2	> 20
IIX	Me	H	Me	SO2	SH	2	> 20
IX	Me	Me	Me	SO2	NH2	4	> 20
X	H	H	Cl	CH2	NH2	2	7,7 +/- 0,82
XI	H	H	2,4-diCl	CO	NH2	2	2,8 +/- 0,57
XII	H	H	F	CO	NH2	2	18,0 +/- 2,0
XIII	H	H	Cl	(CH2)2CO	NH2	2	16,3 +/- 3,7
XIV	H	H	OMe	CH2CO	NH2	2	> 20
XV	H	H	H	COCH2	NH2	2	> 20



Slika 3: Model sidranja spojine 2 (ML-130) v NOD1 : pritejeno po (9)

Po odkritju spojine I (ML 130) so pričeli z iskanjem drugih selektivnih zaviralcev receptorja NOD1, prav tako z metodo visoko zmogljivega rešetanja spojin iz molekulske knjižnice, ki je vsebovala okoli 290.000 spojin. V ožji izbor je prišlo 183 spojin z $IC_{50} \leq 10 \mu M$, ki niso izkazovale citotoksičnosti pri $20 \mu M$ (Alamar blue test). Za testiranje so bile ponovno uporabljene HEK293T-NF- κ B-luciferazne celice, kjer so opazovali z agonistom NOD1 posredovano aktivacijo NF- κ B (γ -tri-DAP), ter supresijo z agonistom NOD1 posredovanega izločanja IL-8 iz celične linije MCF-7. Kot obetavne so se izkazale spojine s purin-2,6-dionskim skeletom, še posebej spojina XVI (ML-146), ki je izkazovala zaviralni učinek tako na receptorje NOD1, kakor tudi za NOD2. Zanjo so določili tudi IC_{50}

za receptor NOD1, ki je znašala $1,54 \pm 0,19 \mu\text{M}$. Boljši rezultat pa sta dali spojina XVII (CID-909915) (IC_{50} za receptor NOD1 $0,79 \mu\text{M}$) in XVIII (CID-647508) (IC_{50} za receptor NOD1 $0,94 \mu\text{M}$) (9). (Slika 4)



Slika 4: Znani zaviraleci receptorjev NOD1

Na podlagi znanih rezulatov prvega močnega in selektivnega zaviralca NOD1, spojine I (ML 130), lahko rečemo, da je za aktivnost benzimidazolnih derivatov izredno pomembna skupina $-\text{NH}_2$ na mestu 2 benzimidazolnega obroča. Ob odsotnosti aminske skupine na tem mestu se aktivnost podobnih sulfonamidov zmanjša za več kot 10-krat oziroma vodi do izgube zaviralne aktivnosti. Prav tako se je izkazalo, da so bile med vsemi spojinami v seriji najbolj aktivne spojine s sulfonilnim substituentom na indolu. Spojine z metilenkarbonilnim ali etilenkarbonilnim distančnikom so bile manj aktivne, spojine s karbonilnim distančnikom pa so se izkazale kot manj selektivne, saj so izkazovale približno enako aktivnost tako za receptorje NOD1 kot tudi NOD2. Glede substitucije na aromatskem obroču so ugotovili, da imajo največjo aktivnost spojine s klorom ali metilno skupino na mestu 4 (21). (Preglednica II) Dodatne raziskave so potrdile, da prisotnost elektron donorskih skupin na aromatskem obroču prispeva k selektivnosti in stopnji zaviralne aktivnosti (24). Pri iskanju drugih specifičnih zaviralcev NOD1, med njimi spojine XVI (ML 146), so ugotovili, da je za aktivnost pri purin-2,6-dionskih derivatih pomemben substituent na mestu 1 ter število C atomov, ki so vezani nanj (9).

Z metodo visoko zmogljivega rešetanja spojin so tako ugotovili, da so za zaviralce NOD1 ustrezni naslednji skeleti: tetrahidroizokinolin, indolin, benzimidazol ter purin-2,6-dion (21, 9). Vsi našteti heteroaromati se uvrščajo med biciklične heterocikle, v katerih je vedno prisoten benzenov obroč (z modifikacijo v primeru purin-2,6-diona). Kot najustreznejši skelet se je pokazal benzimidazol (21), ki je pomemben farmakofor v farmacevtski kemiji, prav tako velja za »privilegirano ogrodje« (27). Dobre IC_{50} vrednosti so dosegle spojine s tetrahidroizokinolinskim skeletom, vendar so bile neselektivne, prav tako pa so zavirale tudi aktivnost TNF- α . Z menjavo osnovnega tetrahidroizokinolinskega

skeleta so skušali povečati selektivnost, vendar se je izkazalo, da bi s piperidinskim ali indolinskim skeletom popolnoma izgubili aktivnost. Prav tako neselektivne pa so bile spojine z indolinskim skeletom, ki so bile dodatno še slabo topne pri pH 7,4 (21).

Sam razvoj ligandov NOD1 pa ni bil usmerjen samo v smeri zaviralcev, temveč tudi sinteznih agonistov. Zelo znana agonista NOD1 sta spojini FK156 in FK565, ki se uporablja kot močna adjuvansa, saj delujejo sinergistično v kombinaciji z agonisti TLR. Spojina FK156 je *D*-laktil-*L*-alanil- γ -*D*-glutamil-*mezo*-diaminopimelil-glicin in je bila prvič pridobljena s fermentacijo iz sevov *Streptomyces*. Spojina FK565 je tripeptid z zaporedjem heptanoil- γ -*D*-glutamil-*mezo*-diaminopimelil-*D*-alanin, ki prav tako v svoji zgradbi vsebuje fragment *mezo*-DAP (15).

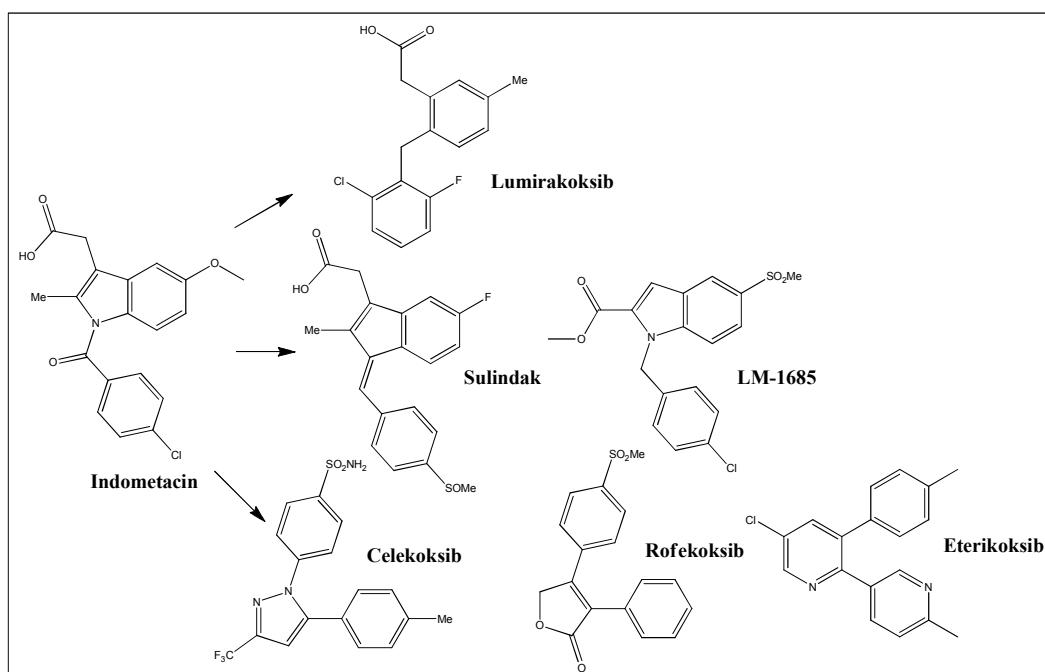
1.3. »SCAFFOLD HOPPING«

Splošen cilj odkrivanja novih potencialnih zdravilnih učinkovin je prepoznavanje novih spojin, ki se vežejo na točno določeno tarčo in imajo ustrezne farmakološke lastnosti. »Scaffold hopping« je pristop v farmacevtski kemiji, kjer s pomočjo spojine vodnice dobimo popolnoma novo, strukturno različno spojino z delovanjem na isto tarčno mesto. Pri tem spojino vodnico optimiziramo tako, da naredimo bioizosterno zamenjavo njenega osrednjega dela – skeleta ali pa le-tega nadomestimo s pogosto uporabljenim skeletom, bodisi z zamenjavo heterocikla, odprtjem ali zaprtjem obroča, spremembo dolžine vezi med dvema obročema ali zamenjavo distančnika. Na takšen način lahko izboljšamo topnost spojine, zmanjšamo toksičnost, izboljšamo farmakokinetične lastnosti, povečamo afiniteto do tarče ter navsezadnje lahko s spremembo patentiramo tudi naš produkt.

Pri »scaffold hopping-u« lahko uporabimo več pristopov. V kolikor imamo 3D strukturo že znanega aktivnega liganda, lahko iščemo spojine, ki posnemajo ravno takšno strukturo (ujemanje 3D oblike). Pri tem je težko razlikovati med značilnostmi, ki so ključne za vezavo in ostalimi, ki so lahko variabilne. Takšen način iskanja novih skeletov je najbolje uporabiti, ko imamo znanih več različnih ligandov (poznamo osnovno povezavo SAR). Če so si ligandi strukturno različni, vendar imajo določene skupne lastnosti in oblike, lahko na osnovi teh podatkov pridobimo 3D farmakofor. Drug možen pristop, ki se tudi pogosteje uporablja, pa je da iščemo nadomestitve samo določenega dela aktivne spojine (iskanje farmakofora). Pri tem načinu gledamo na prostorske odnose med dvema ali tremi vezmi (vektorji). Tretji možen pristop je sestavljen iz dveh delov, najprej

preverimo kateri del molekule ne doprinese k njeni aktivnosti in ga nadomestimo z novim fragmentom, kjer se prvotne vezi deloma prekrivajo (nadomestitev fragmenta). Četrти možen način je iskanje na podlagi podobnosti, kjer računamo podobnost med spojinami s pomočjo funkcijskoga drevesa. Ta način je najbolj abstrakten med naštetimi, saj razpolagamo samo z 2D strukturo, vendar je hiter in vedno uporaben. Lahko ga uporabimo predvsem pri zamenjavi heterociklov. Močno orodje za »scaffold hopping« pa je tudi kombinacija bioizosterne zamenjave z iskanjem na podlagi podobnosti (28), katere se bomo poslužili tudi mi v našem diplomskem delu.

Znan primer zamenjave heterociklov pri »scaffold hopping-u« je razvoj ciklooksigenaznih zaviralcev. Indolni obroč pri začetnem indometacinu so nadomestili z raznolikimi obroči (γ -lakton, piridin, pirazol, benzen) ter dobili novejše spojine z isto ali večjo selektivno aktivnostjo (zaviralci COX-2) (28). (Slika 5)

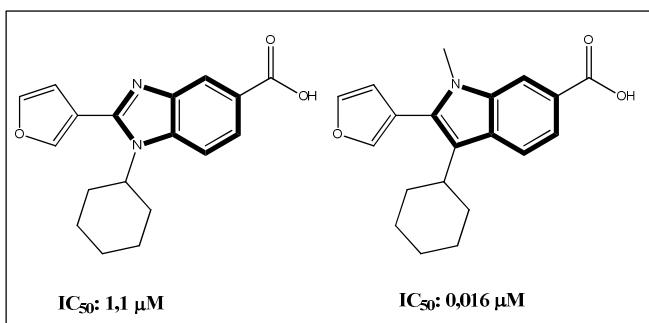


Slika 5: »Scaffold hopping« pri ciklooksigenaznih zaviralcih

1.3.1. BENZIMIDAZOLNI SKELET

Benzimidazol je heteroaromska organska spojina, ki ima na petčlenski imidazolni obroč prikondenziran benzenov obroč. Najbolj znana molekula v naravi, ki vsebuje benzimidazolni skelet, je *N*-ribozil-dimetilbenzimidazol, ki služni kot osni ligand za kobalt v vitaminu B₁₂. Benzimidazol je pomemben farmakofor v farmacevtski kemiji in se uvršča med »privilegirane strukture«. V zadnjih letih se je izkazal kot zelo pomemben, saj se nahaja v spojinah z raznolikimi biološkimi aktivnostmi. Tako ga na primer najdemo v zavircih HIV (*N*-alkoksil-2-alkil-benzimidazoli zavirajo reverzno transkriptazo HIV-1), protimikrobnih učinkovinah (ciprofloxacin), protitumornih učinkovinah (nitrobenzimidazoli imajo citotoksično delovanje proti raku na dojki), antihipertenzivih (bifenil benzimidazoli) in mnogih drugih skupinah. Na podlagi raziskav je bilo ugotovljeno, da imajo benzimidazoli in heterocikli, ki so njegove strukturne izostere, farmakološko aktivnost in kažejo nizko toksičnost (27). Benzimidazoli imajo visoko tališče (substituent na mestu 1 ga zmanjša), ponavadi so topni v polarnih topilih ter so šibko bazični (pKa = 12.33 za 2-aminobenzimidazol) (29).

Benzimidazolne spojine so bile podrobnejše raziskane kot zavirci od RNA-odvisne RNA polimeraze pri hepatitusu C, ki je odlična tarča za zaviranje razmnoževanja virusa. Prvi benzimidazolni zaviralec so dobili s pomočjo metode visoko zmogljivega rešetanja spojin, kot minimalen skelet z biološko aktivnostjo pa so v nadaljevanju določili 1,2-disubstituiran benzimidazol-5-karboksilno kislino. Nadaljnja optimizacija je pokazala, da bolj lipofilni indolni obroč izboljša protivirusno delovanje. S pomočjo »scaffold hoppinga« so razvoj usmerili v sintezo zavircov z indolnim skeletom, najuspešnejši indolni zaviralec pa se je uvrstil tudi v drugo fazo kliničnega razvoja (IC₅₀= 0,016 μM (30)). (Slika 6) Vezava obeh vrst zavircov na encim je pokazala, da se indolni in benzimidazolni zaviralec vežeta na isto alosterično mesto in lahko zavirata od RNA-odvisno RNA polimerazo (31).

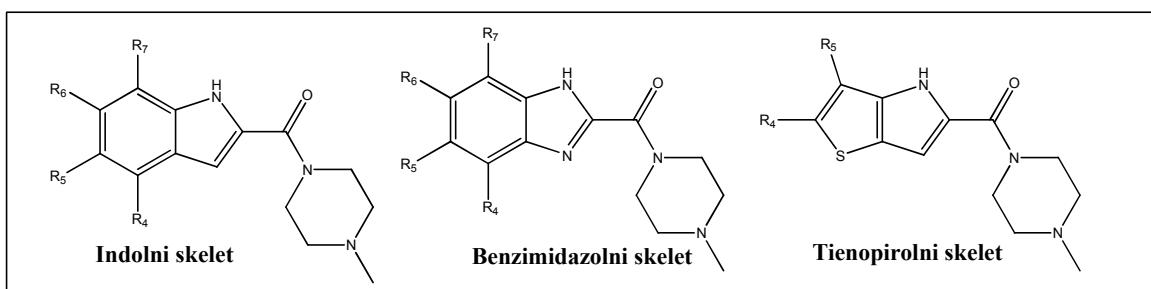


Slika 6: Benzimidazolni in indolni zaviralec RNA polimeraze

1.3.2. MIMETIKI BENZIMIDAZOLNEGA SKELETA

Slaba biološka razpoložljivost benzimidazolov kot posledica njihove slabe topnosti v vodi (32), je kljub njihovim pozitivnim lastnostim lahko ovira pri načrtovanju potencialnih zaviralcev receptorja NOD1. Prav tako lahko oviro pri načrtovanju in sintezi predstavlja sam postopek sinteze benzimidazolov, saj je pri nekaterih potrebna zelo visoka temperatura, dolg časovni potek reakcije in uporaba različnih toksičnih topil.

Kot je že bilo omenjeno lahko indolni obroč zelo uspešno nadomesti benzimidazolni skelet in celo izboljša aktivnost spojine. Poleg indolnega obroča se je kot mimetik benzimidazolnega izkazal tudi tienopirol. (Slika 7) Vse tri omenjene skelete so preučevali kot ligande histaminskega H₄ receptorja ter jih primerjali s standardnim antagonistom (JNJ-7777120). Za najuspešnejši skelet se je izkazal indol, ki je tvoril hidrofobne vezi s triptofanom v vezavnem mestu histaminskega H₄ receptorja in je tako stabiliziral neaktivno konformacijo triptofana. Prav zaradi te interakcije med ligandom in triptofanom, pa triptofan ne more preklopiti v svojo aktivno, vertikalno konformacijo. Po nadomestitvi indolnega skeleta z benzimidazolnim se je afiniteta do tarče zmanjšala za približno 0,3 logaritemske enote. Do zmanjšanja afinitete glede na indolni skelet je prišlo predvsem pri nesubstituiranih derivatih ter derivatih, pri katerih je bila na mesto 7 vezana metilna skupina. Pri zamenjavi indola s tienopirolokom pa je pri nesubstituiranih derivatih prišlo do zmanjšanja vrednosti pKi za 0,5 logaritemske enote (33). Tudi benzofuran in benzotiofen sta lahko možna mimetika benzimidazolnega obroča, ki se po 3D obliki ujemata z indolnim skeletom ter posledično tudi z benzimidazolnim (34).

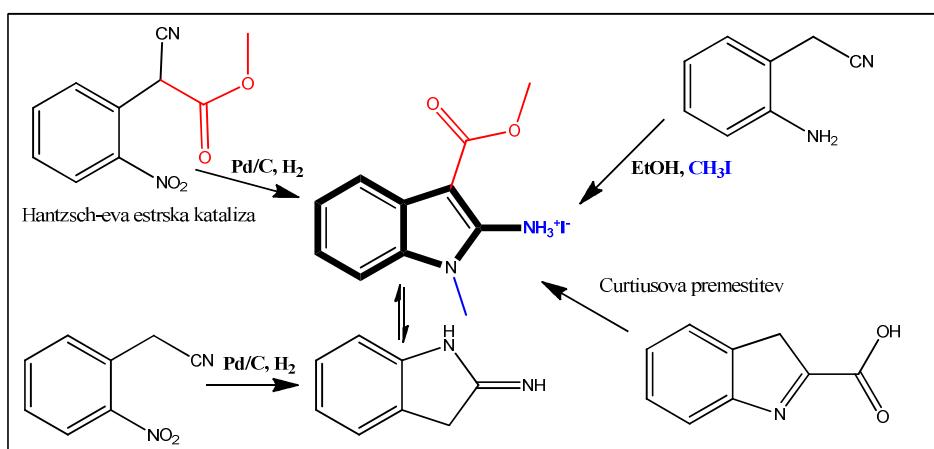


Slika 7: Različni ligandov histaminskega H₄ receptorja

1.4. INDOL

Indol je heteroaromatska organska spojina, ki ima na petčlenski heteroaromatski sistem prikondenziran benzenov obroč, na mestu 1 pa se nahaja dušik, ki je zelo šibko bazičen. Za indol obstajata samo 2 resonančni strukturi, ne da bi pri tem porušili benzenoidni 6π -elektronski sistem, kar je tudi razlog, da je mesto 3 najbolj reaktivno mesto na indolu za elektrofilno aromatsko substitucijo (35).

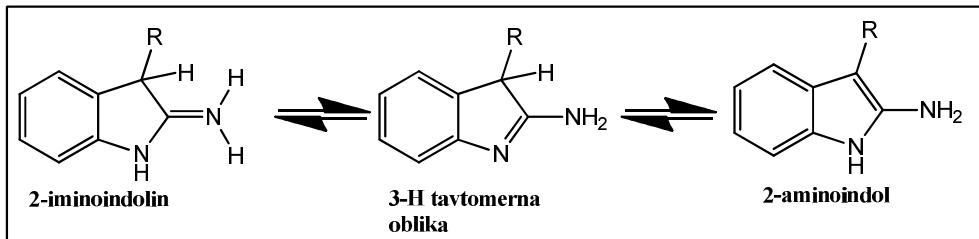
Indoli so najpogosteje substituirani na mestu 2 ali 3 in jih kot takšne lahko sintetiziramo z znano Fischerjevo sintezo indolov (36) ali Sundbergovo sintezo indolov (37,38), ter jih dalje pretvorimo do želene skupine. Same 2-aminoindole lahko direktno sintetiziramo s pomočjo različnih, že poznanih postopkov. Eden takšnih postopkov je Hantzsch-eva estrska kataliza s pomočjo katalizatorja (paladij na ogljiku), kjer izhajamo iz 2-ciano-2-(2-nitrofenil)acetata (39). Uspešno tvorbo 2-aminoindolnega obroča ob prisotnosti vodika ter katalizatorja (paladij na ogljiku) pa daje tudi reakcija, kjer izhajajo iz 2-nitrofenilacetonitrila (40) in 2-aminobenzilcianida. (41). Prav tako pa lahko 2-aminoindole pridobimo s pomočjo Curtiusove prenestitve iz indol-2-karboksilne kisline (42). (Slika 8)



Slika 8: Sintezni pristopi za 2-aminoindole

Zaščita 2-aminoindolov v obliki soli je zelo primerna, saj so ti največkrat nestabilni in podvrženi avtoksidaciji (40) in hidrolizi (43), ter so posledično tudi precej neraziskani (44). V obliki soli pa jih lahko vedno rekristaliziramo in imajo neomejeno stabilnost (41). 2-aminoindoli, ki so nesubstituirani na dušiku se najpogosteje nahajajo v 3-H tautomeri obliki, značilno pa je tudi, da se protonirajo do 2-iminoindolinov, še posebej, če sta na mestu 3 (R) vezana dva vodika ali vodik in fenil. (Slika 9) Sledеča protonacija na amino skupini (2-aminoindol) povzroči destabilizacijo kationa, vendar ne vpliva na aromatsko

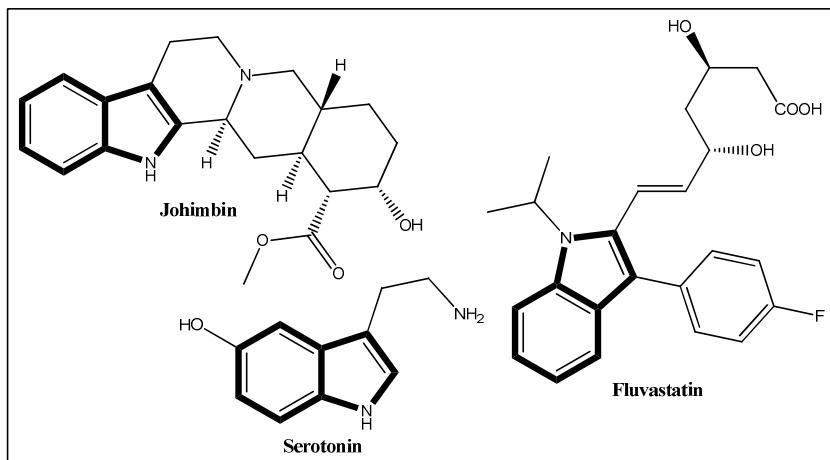
značilnost indolnega obroča (40). 2-iminoindolinska tautomerina oblika pa največ doprinese k relativno visokem pKa, ki znaša 8,5 (45).



Slika 9: Tautomerne strukture na mestu 3 substituiranih 2-aminoindolov

1.4.1. INDOL KOT OGRODJE POTENCIJALNIH UČINKOVIN

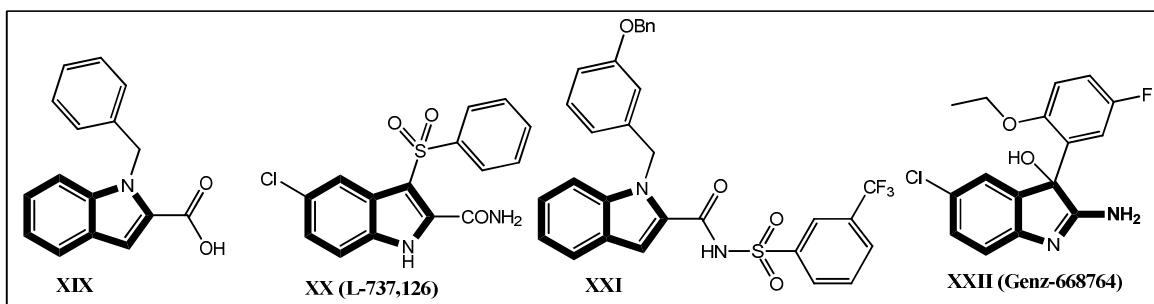
Indolni obroč je v zadnjih letih dobil oznako »privilegirana struktura«, saj so ga uporabili za razvoj potencialnih agonistov in antagonistov najrazličnejših receptorjev. Njegov skelet najdemo v alkaloidih (johimbin, rezerpin, strihnin itd.), v metabolitih živih bitij (pennigritrem je metabolit *Penicillium nigricans*; toksin argiotoksin je obrambni produkt avstralskega pajka *Atracinae*; serotonin je nevrotransmiter v živčnem sistemu; L-triptofan je esencialna aminokislina ter prekurzor serotonina), v že znanih zdravilnih učinkovinah (fluvastatin, indometacin, tadalafil, sumatriptan, tropisetron) ter modernih materialih (indol-5-karboksilna kislina je del elektropolimeriziranega filma, ki se uporablja v mikro-pH senzorjih) (46,47). (Slika 10)



Slika 10: Strukture spojin z indolnim skeletom

Indol in njegovi derivati imajo tako številne potencialne terapevtske aktivnosti. Kot potencialne protimikrobne učinkovine so se pokazali *N*-substituirani 3-metil-5-metiltriptani (49), kot potencialni antagonisti receptorja CCR2b, na katerega se veže kemokin MCP-1, pa *N*-benzilindol-2-karboksilne kisline (XIX). MCP-1 je glavni kemotaktični in

aktivacijski faktor za monocite in spominske celice pri vnetju in imunskem odzivu, kar se kaže v povečani ekspresiji citokinov (IL-1 in IL-6), povečani koncentraciji superoksidnega aniona, pospešeni vezavi levkocitov na endotelij. MCP-1 ima tako pomembno vlogo pri začetnih fazah ateroskleroze (52), revmatoidnega artritisa, astme, psoriaze in pri zavrnitvah organov (53). Manjše spojine z indolnim skeletom pa imajo tudi potencialno protivirusno delovanje. Tako so ugotovili, da je spojina XX (L-737,126) najmočnejši in najbolj selektiven nenukleozidni zaviralec reverzne transkriptaze (NNRTI) virusa HIV tipa 1 (54). Derivat *N*-sulfonil-2-indol karboksiamida, natančneje spojino XXI, so ovrednotili kot spojino z močno afiniteto do receptorja, aktiviranega s proliferatorjem peroksisomov γ (PPAR γ) (56). Le-ta spada v skupino transkripcijskih faktorjev, ima ključno vlogo pri diferenciaciji adipocitov ter posledično pri uravnavanju kostne hemostaze. (Slika 11)



Slika 11: Potencialne učinkovine z indolnim skeletom

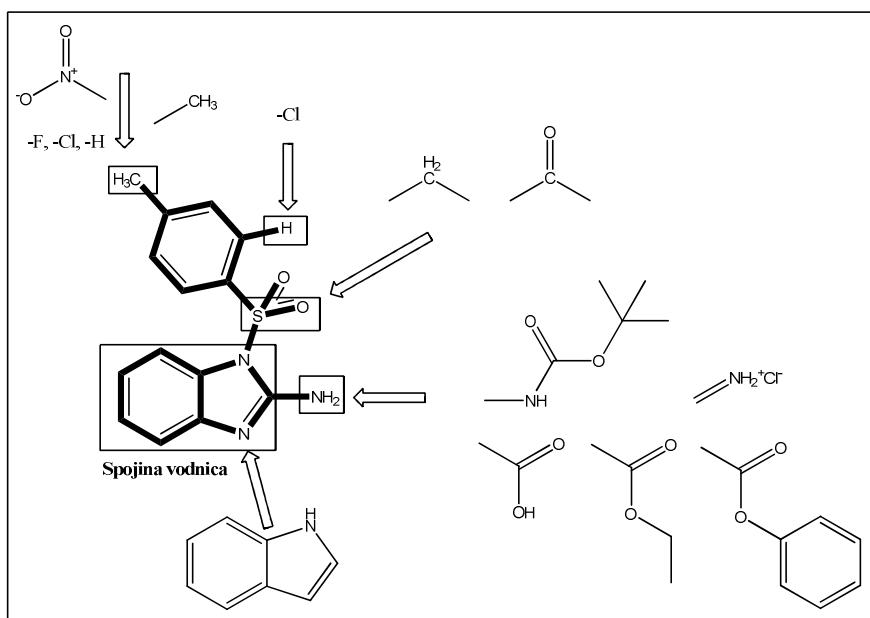
Med indoli pa so prav tako prisotni tudi 2-aminoindoli, ki so lahko prekurzorji mnogih farmakološko aktivnih spojin, na primer 2-diazoindol in 2-triazenoindol (39). Njihov skelet pa so našli v alkaloidu flustraminu C (48). Kot potencialne protimikrobnne učinkovine so se izkazali *N*-substituirani 2-aminoindoli, ki so potencialni zaviralcji 5-lipoksiogenaze (50), ter nesubstituirani 2-aminoindoli, natančneje spojina XXI (Genz-668764). (Slika 11). Slednja se je izkazala kot odličen kandidat za predklinično testiranje, saj je izkazovala močno aktivnost proti *Plasmodium falciparum*, tolerirale so jo tudi miške in podgane, izkazalo pa se je tudi, da lahko pozdravi infekcije *Plasmodium berghei* (51).

2. NAČRT ZA DELO

Glede na že znane strukture zaviralcev receptorja NOD1 bomo v okviru našega diplomskega dela sintetizirali različne derivate 2-aminoindola kot potencialne zaviralce receptorjev NOD1, jih ustrezzo spektroskopsko in fizikalno-kemijsko ovrednotili ter jim nazadnje določili njihovo zaviralno aktivnost.

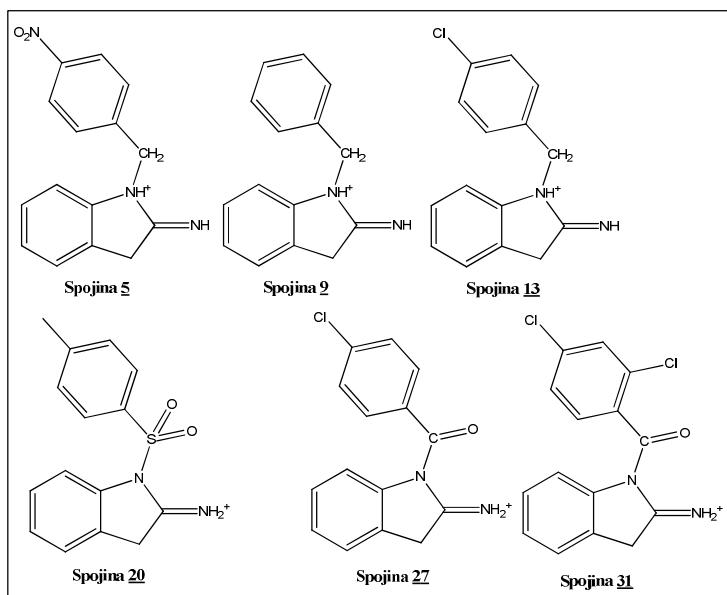
Pri načrtovanju spojin bomo izhajali iz spojine 1-(4-toluensulfonil)1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amin (**ML130**), ki se je izkazala kot močan in selektivni zaviralec NOD-1. Pri tem bomo uporabili »scaffold hopping« - kombinacijo bioizosterne zamenjave z iskanjem na podlagi podobnosti (ligand-based design). Spremembe spojine vodnice (ML130) nam bodo pomagale ugotoviti povezavo med strukturo in delovanjem potencialnih zaviralcev proteina NOD1. V ta namen bomo iz indol-2-karboksilne kisline z linearnim sinteznim pristopom sintetizirali različne soli 2-aminoindolov. Na spojnini vodnici (ML130) bomo naredili naslednje spremembe (Slika 12) :

- nadomestili 1*H*-benzimidazolni obroč z 1*H*-indolnim obročem
- uvedli različne substituente na mesto 2 in 4 na aromatskem obroču (klor, fluor in nitro ter metilno skupino)
- namesto sulfonilne skupine kot distančnik skušali uvesti še karbonilno in metilno skupino.



Slika 12: Spremembe na spojini vodnici (ML130)

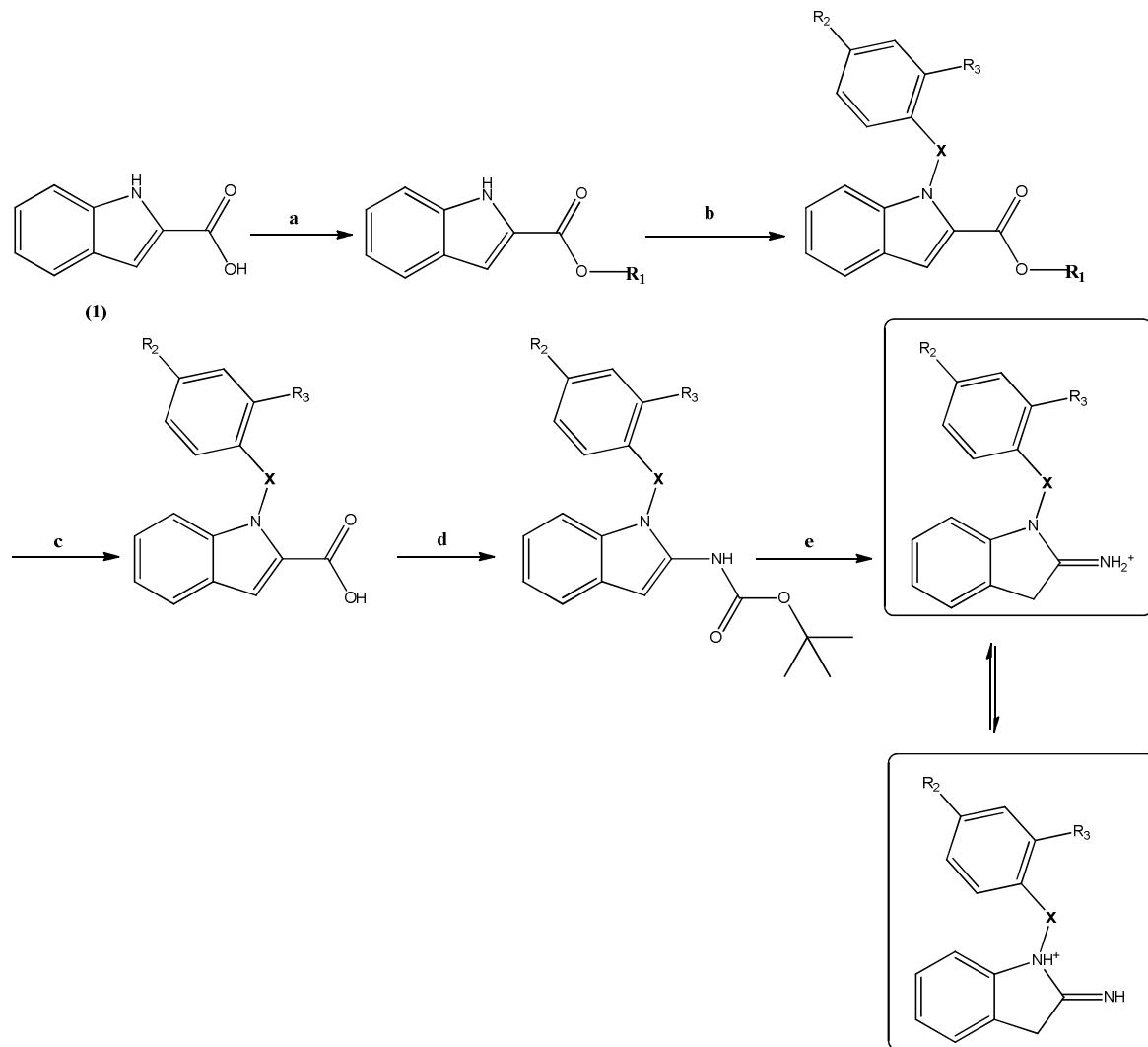
V okviru diplomskega dela bomo poskusili sintetizirati 6 končnih spojin (Slika 13). Po končanem eksperimentalnem delu bomo spojine biološko ovrednotili glede na stopnjo zaviralnega učinka $5 \mu\text{M}$ agonista NOD1 C12iE-DAP. Namen našega dela bo ugotoviti, kako bodo predlagane spremembe v strukturi spojine vodnica pripomogle k zaviranju receptorjev NOD1.



Slika 13: Končne spojine

2.1. REAKCIJSKE SHEME

Shema 1: Potek celotnega eksperimentalnega dela.



a : i) tionični klorid, etanol (etilni ester)

ali

ii) CDI, benzilalkohol, THF (benzilni ester)

b: i) K-*terc*-butoksid, 18-Crown-6, THF, RSO_2Cl in RCOCl

ii) Cs_2CO_3 ali K_2CO_3 , aceton in RCH_2Y ($\text{Y} = \text{Cl}$ ali Br)

c: i) 1M KOH, Etanol, THF (etilni ester)
ali

ii) $\text{H}_2\text{(g)}$, Pd/C , etanol (benzilni ester)

d: *terc*-butanol, trietylamin, DPPA, molekulska sita (4\AA)

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

X: SO_2 , CO ali CH_2

R₁: - $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ali - $\text{CH}_2\text{-Ph}$

R₂: NO₂, F, Cl, CH₃, H

R₃: Cl, H

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: hidrazin hidrat, CH_3COCl , indol-2-karboksilna kislina, 4-toluensulfonil klorid, 4-nitrobenzil bromid, 4-fluorobenzilbromid, 4-klorobenzilklorid, benzilbromid, 4-klorobenzoil klorid, benzilni alkohol, 2,4-diklorobenzojska kislina, tionil klorid, oksalil klorid, *terc*-butanol, kalijev *terc*-butoksid, 18-Crown-6, hidrazin monohidrat, CDI, kalijev hidroksid, DPPA, K_2CO_3 , Cs_2CO_3 , NaNO_2 , trietilamin, nasičena raztopina HCl, nasičena raztopina KOH, nasičeno raztopino NaCl ter paladij.

Pri sinteznem delu ter izolaciji pa smo potrebovali še naslednja topila: aceton, diklorometan, dimetilformamid, dietileter, etanol, etilacetat, heksan, metanol, nasičena raztopina NaCl (aq), ocetna kislina, petroleter, piridin, tetrahidrofuran, triklorometan, 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
- tehnicka : Mettler Toledo PG 803
- analitska tehnicka : 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 ploščicah Silica gel 60 F₂₄₅, z 0,22 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu velikosti 20 x 20 cm, proizvajalca Merck (Nemčija). Kot mobilno fazo smo uporabili različna topila. S pomočjo tankoplastne kromatografije smo pri eksperimentalnem delu spremljali poteka reakcij, izolacij le-teh ter jih neposredno uporabljali pri kolonski kromatografiji. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabili UV svetilko, z valovnima dolžinama $\lambda=254$ nm in $\lambda=366$ nm, in orostitvena reagenta ninhidrin ter bromkrezolno zeleno. S pomočjo ninhidrina smo detektirali amine in karbamate, s pomočjo bromkrezolno zelenega pa kisline.

▪ Kolonska kromatografija

Kolonsko kromatografijo smo izvajali s pomočjo steklenih kolon različne velikosti. Kot stacionarno fazo smo uporabili Silikagel 60 (Kieselgel 60), s premerom delcev 0,04-0,063 mm (flash silikagel), proizvajalca Merck (Nemčija), kot mobilno fazo pa smo uporabili različna topila. Pri delu smo potrebovali še vato Cik-cak podjetja Tosama (Slovenija), pesek ter sušilno sredstvo Na₂SO₃, proizvajalca Merck (Nemčija).

▪ Mobilne faze

Pri kolonski in tankoplastni kromatografiji smo uporabili naslednje mobilne faze:

MF 1 : Heksan/etilacetat : 1/1	MF 7 : Heksan/etilacetat : 5/1 + 1%
MF 2 : Heksan/etilacetat : 1/1 + 1% ocetne kisline	ocetne kisline
MF 3 : Heksan/etilacetat : 2/1	MF 8 : Heksan/etilacetat : 9/1
MF 4 : Heksan/etilacetat : 3/1	MF 9 : Heksan/etilacetat : 9/1 + 1%
MF 5 : Heksan/etilacetat : 3/1 + 1% ocetne kisline	ocetne kisline
MF 6 : Heksan/etilacetat : 5/1	MF 10 : Etilacetat/heksan : 2/1
	MF 11 : Diklorometan/heksan : 3/1

MF 12 : Diklorometan/metanol : 20/1 + 1% ocetne kisline	MF 14 : Triklorometan/metanol : 5/1 + 1% ocetne kisline
MF 13 : Triklorometan/metanol : 20/1 + 1% ocetne kisline	MF 15 : Petroleter/etilacetat : 30/1 MF 16 : Etilacetat

3.2.2. Spektroskopske metode

- Jedrska magnetna resonanca (NMR)**

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

- Infrardeča spektroskopija (IR)**

IR spektri so bili posneti na spektrometu Nexus FT-IR na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Dobljene 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 spektrometu 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)**

Elementna analiza 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

Tališča spojin smo določali s talilnim mikroskopom z ogrevalno mizico Wagner & Munz Polytherm A ter 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 dr. Martine Gobec, mag. farm. Za testiranje so uporabili celice Ramos-BlueTM in reagent QUANTI-BlueTM proizvajalca InvivoGen (ZDA).

3.2.4.1. Priprava celične linije Ramos-BlueTM

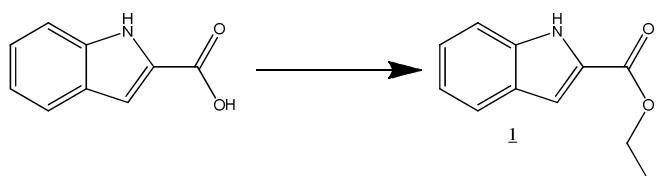
Celična linija Ramos-BlueTM je bila pripravljena iz 180 µL suspenzije celic (\approx 400000 celic), ki ji je bilo dodanih 20 µL 25 µM raztopine naših spojin in 5 µM raztopine C12-iE-DAP, kot gojitveni medij pa je bilo uporabljen topilo. Pri negativni kontroli (brez (NT)) je bil suspenziji celic dodan le gojitveni medij. Celice so bile po pripravi skupaj z ustreznimi slepimi 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.

4. EKSPERIMENTALNI DEL

4.1. SINTEZA 1-(4-NITROBENZIL)INDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (**5**)

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

Reakcija:



Postopek:

V 500 ml bučko smo natehtali 23,1 g (143,0 mmol) indol-2-karboksilne kisline ter jo raztopili v 20 ml etanola. Reakcijsko zmes smo na ledeni kopeli ohladili na 0 °C ter nato s pomočjo kapalnika dodali 11,4 ml (1,1 eq; 157,3 mmol) tionil klorida. Po dodatku le-tega smo bučko prenesli na oljno kopel ter segrevali pri temperaturi refluksa (79 °C). Po 10 h smo s TLC zaznali konec reakcije, bučko odstranili iz oljne kopeli ter pustili, da se je vsebina ohladila na sobno temperaturo (20 °C). Pri tem je izpadla rumeno-oranžna oborina, ki smo jo odfiltrirali z odsesavanjem. Bučko smo sprali z matičnico in suspenzijo še enkrat odfiltrirali, da smo kvantitativno prenesli vso oborino. Preostanek matičnice smo postavili v hladilnik, kjer je po 2 h izpadla še preostala oborina, ki smo jo ponovno odfiltrirali. Postopek filtracije z odsesavanjem smo ponovili. Produkt smo zbrali na petrijevki in ga 4,5 h sušili v sušilniku do konstantne mase pri temperaturi 40 °C.

Rezultati:

Izgled: rumeni kristali

Izkoristek: 86,96 % (22,774 g)

Rf: 0,78 (MF 12 : Diklorometan/metanol : 20/1 + 1% ocetne kisline)

T_{tališča}: 116,4-120,5 °C, lit. 122-125 °C (58)

IR (cm⁻¹): 3307, 1686, 1525, 1381, 1339, 1307, 1247, 1200, 1144, 1020, 820, 771, 743, 663, 607, 580

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1,45 (t, 3H, J=7,1 Hz, -CH₃), 4,44 (k, 2H, J=7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 7,16 – 7,20 (m, 1H, indol-H), 7,26 - 7,27 (m, 1H, indol-H), 7,33 – 7,37 (m,

1H, indol-H), 7,44 – 7,46 (m, 1H, indol-H), 7,71 – 7,73 (m, 1H, indol-H), 8,92 (s, 1H, indol-NH)

MS (ESI): 190,1 [M+H]⁺

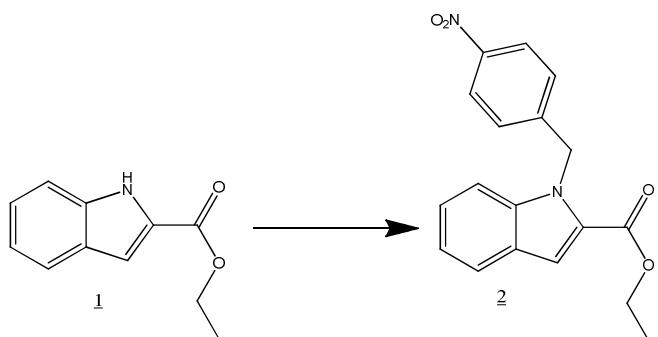
Mr (izračunana): 189,21

HR-MS: 190,0865 (izračunana: 190,0868)

Elementna sestava: C₁₁H₁₁NO₂

4.1.2. SINTEZA ETIL 1-(4-NITROBENZIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILATA (2)

Reakcija:



Postopek:

V 50 ml bučko smo natehtali 945,8 mg (5,0 mmol) etil 1*H*-indol-2-karboksilata (**1**) ter ga raztopili v 20 ml THF. V bučko smo dodali še 132,5 mg (0,1 eq; 0,5 mmol) kronskega etra (18-Crown-6) ter 785,5 mg (1,4 eq; 7 mmol) kalijevega *terc*-butokksida. Reakcijsko zmes smo najprej mešali 15 min na sobni T, nato pa bučko prestavili na ledeno kopel, do ohladitve na 0 °C. Nato smo dodali 1,3 g (1,2 eq; 6 mmol) 4-nitrobenzilbromida, ki smo ga predhodno raztopili v 15 ml THF, ter bučko odstavili iz ledene kopeli. Po 10 h smo s TLC zaznali konec reakcije, prekinili reakcijo ter topilo odpareli pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s prekristalizacijo iz etanola (6 ml). Po 1 h v hladilniku so izpadli rumeni kristali, ki smo jih odfiltrirali z odsesavanjem. Produkt smo zbrali na petrijevki in ga 5 h sušili v sušilniku do konstantne mase pri temperaturi 40 °C.

Rezultati:

Izgled: rumeni kristali

Izkoristek: 70,61 % (1,145 g)

Rf: 0,2 (MF 6 : Heksan/etilacetat : 5/1)

T_{tališča}: 66,2-71,0 °C

IR (cm⁻¹): 3307, 2928, 1694, 1600, 1517, 1458, 1411, 1371, 1341, 1318, 1256, 1193, 1168, 1141, 1098, 1023, 933, 899, 855, 841, 818, 797, 769, 741, 683, 648, 568

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 1,27 (t, 3H, J=7,2 Hz, -CH₃), 4,26 (k, 2H, J=7,2 Hz, -CH₂-CH₃), 5,99 (s, 2H, Ar-CH₂), 7,18 – 7,20 (m, 3H, indol-H in Ar-H), 7,32 – 7,35 (m, 1H, indol-H), 7,43 (d, 1H, J=8,2 Hz, indol-H), 7,55 – 7,58 (m, 1H, Ar-H), 7,75 – 7,78 (m, 1H, indol-H), 8,15 (d, 2H, J=8,8 Hz, Ar-H)

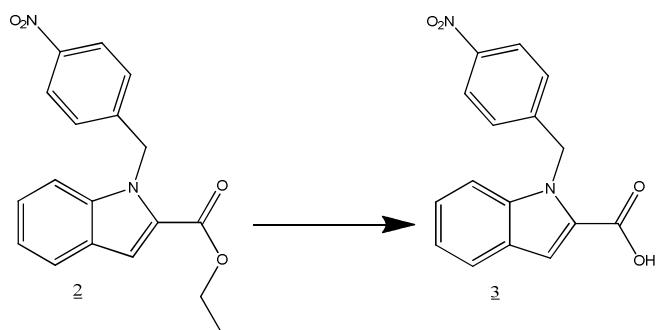
MS (ESI): 325,1 [M+H]⁺

Mr (izračunana): 324,33

HR-MS: 325,1184 (izračunana: 325,1188) **Elementna sestava:** C₁₈H₁₆N₂O₄

4.1.3. SINTEZA 1-(4-NITROBENZIL)-1*H*-INDOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (3)

Reakcija:



Postopek:

V 25 ml bučko smo natehtali 460 mg (1,4 mmol) etil 1-(4-nitrobenzil)-1*H*-indol-2-karboksilata (2) ter ga raztopili v 5 ml etanola. Po kapljicah smo dodali 1,7 ml 1M raztopine KOH. Reakcijo smo najprej pustili potekati 30 min na sobni T, nato pa smo bučko segrevali 1 h na oljni kopeli s povratnim hladilnikom pri temperaturi refluksa (79 °C). Po 90 min smo s TLC zaznali, da je reakcija potekla. Reakcijsko zmes smo nakisali z 1M raztopino HCl, da je izpadel želeni produkt. Oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem, produkt prenesli na petrijevko in ga 2 h sušili v sušilniku do konstantne mase pri temperaturi 40 °C.

Rezultati:

Izgled: svetlo rumeni kristali

Izkoristek: 91,74 % (386 mg)

Rf: 0,62 (MF 2 : Heksan/etilacetat : 1/1 + 1% ocetne kisline; bromkrezolno zeleno)

T_{tališča}: 218,6-222,9 °C

IR (cm^{-1}): 2607, 1674, 1604, 1518, 1484, 1458, 1432, 1339, 1323, 1306, 1273, 1248, 1198, 1164, 1137, 1106, 1014, 928, 895, 868, 856, 816, 798, 764, 743, 725, 967, 639, 609, 854, 560

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO – d_6): δ [ppm] = 6,01 (s, 2H, Ar-CH₂), 7,14 – 7,17 (m, 1H, indol-H), 7,18 – 7,21 (m, 2H, Ar-H), 7,29 – 7,33 (m, 1H, indol-H), 7,38 (d, 1H, $J=0,8$ Hz, indol-H), 7,54 (dd, 1H, $J=0,7$ Hz, $J=8,4$ Hz, indol-H), 7,73 – 7,76 (m, 1H, indol-H), 8,15 – 8,17 (m, 2H, Ar-H), 13,06 (s, 1H, -COOH)

MS (ESI): 295,1 [M-H]⁻

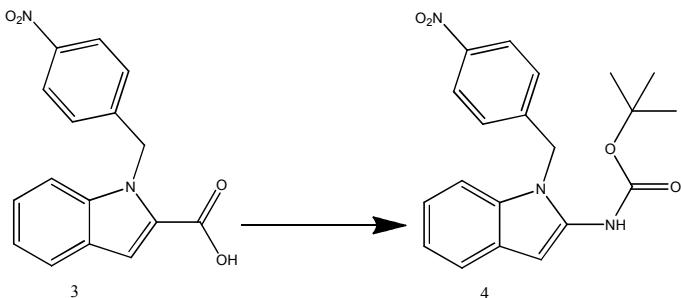
Mr (izračunana): 296,28

HR-MS: 295,0721 (izračunana: 295,0719)

Elementna sestava: C₁₆H₁₂N₂O₄

4.1.4. SINTEZA TERC-BUTIL (1-(4-NITROBENZIL)-1*H*-INDOL-2-IL)KARBAMATA (4)

Reakcija:



Postopek:

V 50 ml bučko smo natehtali 291 mg (1,0 mmol) 1-(4-nitrobenzil)-1*H*-indol-2-karboksilne kislin (3), ki smo jo raztopili v 6 ml *terc*-butanol, ter dodali še 100 mg zdrobljenih molekulskih sit (4 Å). Po 20 min mešanja na sobni T smo reakcijski zmesi po kapljicah dodali še 0,2 ml (1,5 mmol) trietilamina in 0,3 ml (1,5 mmol) DPPA. Bučko smo prenesli na oljno kopel ter segrevali pri temperaturi refluks (82 °C). Po 17 h smo s TLC zaznali konec reakcije ter topilo odpareli pod znižanim tlakom. Spojino smo očistili s pomočjo kolonske kromatografije (MF 3 : Heksan/etilacetat : 2/1).

Rezultati:

Izgled: rdeči kristali

Izkoristek: 59,25 % (214 mg)

Rf: 0,58 (MF 3 : Heksan/etilacetat : 2/1; ninhidrin)

T_{tališča}: 115,3 - 116,7 °C

IR (cm^{-1}): 3291, 1701, 1605, 1517, 1462, 1391, 1367, 1343, 1288, 1249, 1155, 1111, 1062, 998, 859, 778, 736, 682, 649, 623, 594

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO – d_6): δ [ppm] = 1,41 (s, 9H, (-CH₃)₃), 5,53 (s, 2H, Ar-CH₂), 6,40 (s, 1H, indol-H), 7,01 – 7,03 (m, 2H, Ar-H), 7,21 – 7,23 (m, 3H, indol-H), 7,48 – 7,50 (m, 1H, indol-H), 8,15 – 8,18 (m, 2H, Ar-H), 9,38 (s, 1H, -NH-CO-)

MS (ESI): 368,2 [M+H]⁺

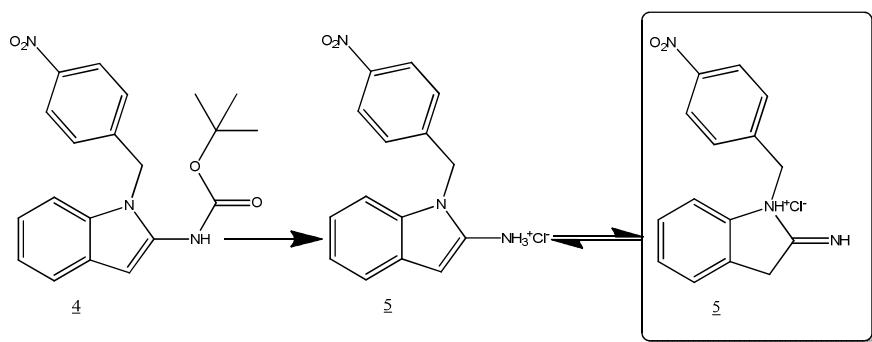
Mr (izračunana): 367,40

HR-MS: 368,1606 (izračunana: 368,1610)

Elementna sestava: C₂₀H₂₁N₃O₄

4.1.5. SINTEZA 1-(4-NITROBENZIL)-INDOLIN-2-IMININIJEVEGA KLORIDA (5)

Reakcija:



Postopek:

V 25 ml bučko smo natehtali 73 mg (0,2 mmol) *terc*-butil (1-(4-nitrobenzil)-1*H*-indol-2-il)karbamata (4) ter ga raztopili v 2,6 ml dietiletra. Bučko smo postavili na ledeno kopel za 10 min, nato dodali 4 ml dietiletra, ki smo ga predhodno prepihal s HCl, ter pustili reakcijo potekati na ledeni kopeli. Po 40 min smo s TLC zaznali konec reakcije ter odpareli topilo pod znižanim tlakom. Vsebino bučke smo 4 x suspendirali v 4 ml dietiletra ter topilo odpareli. Nato smo dodali 6 ml dietiletra ter bučko postavili v hladilnik. Po 16 h je izpadel želeni produkt, ki smo ga odfiltrirali z odsesavanjem.

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 79,41 % (48 mg)

Rf: 0 (MF 3 : Heksan/etilacetat : 2/1)

T_{tališča}: preko 250 °C

IR (cm^{-1}): 2248, 2161, 2030, 1979, 1943, 1121, 1090, 896, 624, 569

¹H-NMR (400 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm]= 4,38 (s, 2H, -indolin-CH₂-), 5,49 (s, 2H, Ar-CH₂), 7,11 – 7,13 (m, 1H, indol-H), 7,21 – 7,25 (m, 1H, indol-H), 7,33- 7,35 (m, 1H, indol-H), 7,52 – 7,54 (m, 1H, indol-H), 7,63 - 7,64 (m, 2H, Ar-H), 8,25 – 8,27 (m, 2H, Ar-H), 10,21 (s, 1H, =NH), 10,61 (s, 1H, -NH-CH₂-Ar)

MS (ESI): 269,1 [M-Cl]⁺

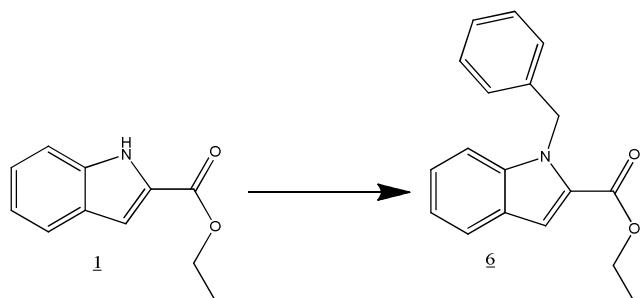
Mr (izračunana): 303,74

HR-MS: 268,1079 (izračunana: 268,1086 brez Cl) **Elementna sestava:** C₁₅H₁₄N₃O₂Cl

4.2. SINTEZA 1-BENZILINDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (9)

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

Reakcija:



Postopek:

V 50 ml bučko smo natehtali 945,8 mg (5,0 mmol) etil 1*H*-indol-2-karboksilata (1) ter ga raztopili v 20 ml THF. Reakcijski zmesi smo dodali še 132,5 mg (0,1 eq; 0,5 mmol) kronskega etra (18-Crown-6) ter 785,5 mg (1,4 eq; 7 mmol) kalijevega *terc*-butoksiда. Vsebino bučko smo najprej mešali 15 min na sobni T, nato pa bučko prestavili na ledeno kopel do ohladitve na 0 °C. Nato smo po kapljicah dodali 0,7 ml (1,2 eq; 6 mmol) benzilbromida ter bučko odstavili iz ledene kopeli. Po 29 h smo s TLC zaznali konec reakcije, prekinili reakcijo ter topilo odpareli pod znižanim tlakom. Produkt smo dodatno očistili s prekristalizacijo iz etanola (6 ml). Po 1h v hladilniku so izpadli rumeni kristali, ki smo jih filtrirali z odsesavanjem. Ves produkt smo zbrali na petrijevki in ga 1 h sušili v sušilniku do konstantne mase pri temperaturi 60 °C.

Rezultati:

Izgled: rumeni kristali

Izkoristek: 76,25 % (1,065 g)

Rf: 0,44 (MF 6 : Heksan/etilacetat : 5/1)

T_{tališča}: 52,5-55,5 °C, lit. 55-56 °C (57)

IR (cm⁻¹): 1704, 1513, 1457, 1350, 1315, 1251, 1191, 1136, 1095, 1025, 811, 743, 423, 964, 605, 593, 569

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 1,39 (t, 3H, J=7,2 Hz, -CH₃), 4,36 (k, 2H, J=7,2 Hz, -CH₂-CH₃), 5,88 (s, 2H, Ar-CH₂), 7,07 - 7,08 (m, 2H, Ar-H), 7,17 – 7,40 (m, 6H, indol-H in Ar-H), 7,43 (d, 1H, J=0,8 Hz, indol-H), 7,73 – 7,75 (m, 1H, indol-H)

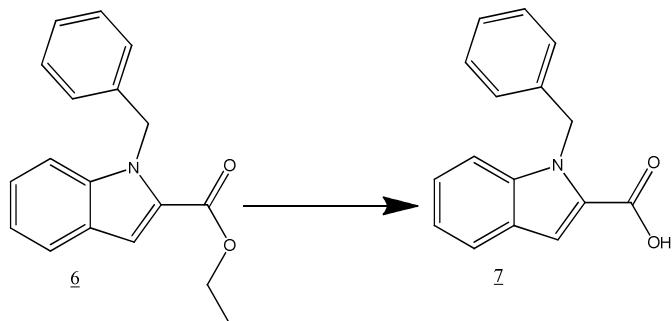
MS (ESI): 280,1 [M+H]⁺

Mr (izračunana): 279,33

HR-MS: 280,1339 (izračunana: 280,1338) **Elementna sestava:** C₁₈H₁₇NO₂

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

Reakcija:



Postopek:

V 25 ml bučko smo natehtali 453 mg (1,6 mmol) etil 1-benzil-1H-indol-2-karboksilata (**6**) ter ga raztopili v 5 ml etanola. Po kapljicah smo dodali 1M raztopino KOH. Reakcijo smo najprej pustili potekati 75 min na sobni T, nato pa smo reakcijsko zmes segrevali še 70 min na oljni kopeli s povratnim hladilnikom pri temperaturi refluksa (79 °C). Po skupnih 2 h 25 min smo s TLC zaznali, da je reakcija potekla. Zmes smo nakisali z 1M raztopino HCl, da je izpadel želeni produkt. Oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem, produkt prenesli na petrijevko in ga 2 h sušili v sušilniku do konstantne mase pri temperaturi 40 °C.

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 95,81 % (390 mg)

Rf: 0,70 (MF 2 : Heksan/etilacetat : 1/1 + 1% ocetne kisline; bromkrezolno zeleno)

T_{tališča}: 198,0-202,0 °C, lit. 197-199 °C (57)

IR (cm^{-1}): 2870, 1665, 1514, 1484, 1456, 1423, 1354, 1322, 1266, 1202, 1133, 885, 816, 745, 732, 719, 694, 583, 567

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO – d_6): δ [ppm] = 5,89 (s, 2H, Ar-CH₂), 7,02- 7,04 (m, 2H, Ar-H), 7,11 – 7,15 (m, 1H, Ar-H), 7,18 - 7,22 (m, 1H, indol-H), 7,24 – 7,29 (m, 3H, indol-1H in Ar-H), 7,30 – 7,33 (m, 1H, indol-H), 7,54 (dd, 1H, $J=8,6$ Hz, $J=0,8$ Hz, indol-H), 7,70 - 7,72 (m, 1H, indol-H), 12,99 (s, 1H, -COOH)

MS (ESI): 252,1 [M+H]⁺

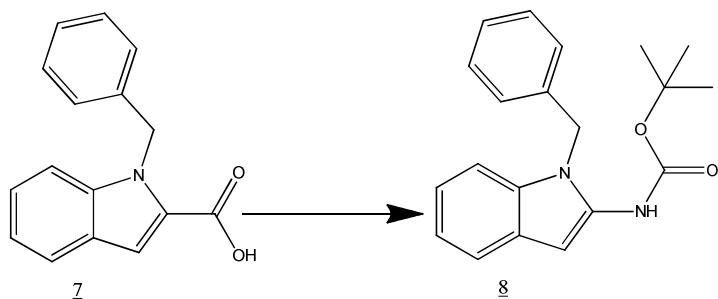
Mr (izračunana): 251,28

HR-MS: 252,1015 (izračunana: 252,1025)

Elementna sestava: C₁₆H₁₃NO₂

4.2.3. SINTEZA TERC-BUTIL (1-BENZIL-1*H*-INDOL-2-IL)KARBAMATA (8)

Reakcija:



Postopek:

V 50 ml bučko smo natehtali 306 mg (1,2 mmol) 1-benzil-1*H*-indol-2-karboksilne kisline (7), ki smo jo raztopili v 7 ml *terc*-butanol ter dodali še 100 mg zdrobljenih molekulskih sit (4 Å). Po 20 min mešanja na sobni T smo po kapljicah dodali 0,5 ml (2,0 mmol) trietilamina. Po dodatnih 30 min mešanja smo dodali še 0,4 ml (1,8 mmol) DPPA. Bučko smo prenesli na oljno kopel ter segrevali pri temperaturi refluksa (82 °C). Po 18 h smo s TLC zaznali konec reakcije ter topilo odpareli pod znižanim tlakom. Spojino smo očistili s pomočjo kolonske kromatografije (MF 3 : Heksan/etilacetat : 2/1).

Rezultati:

Izgled: rjavi kristali

Izkoristek: 75,00 % (295 mg)

Rf: 0,56 (MF 3 : Heksan/etilacetat : 2/1; ninhidrin)

T_{ališča}: 147,0-152,2 °C

IR (cm^{-1}): 3284, 1693, 1553, 1460, 1395, 1369, 1334, 1313, 1148, 1060, 775, 746, 732, 709, 692

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO – d_6): δ [ppm] = 1,44 (s, 9H, (-CH₃)₃), 5,37 (s, 2H, Ar-CH₂), 6,35 (s, 1H, indol-H), 6,96 – 7,04 (m, 4H, Ar-H), 7,18 – 7,22 (m, 4H, indol-H), 7,44 – 7,46 (m, 1H, indol-H), 9,36 (s, 1H, -NH-CO-)

MS (ESI): 323,2 [M+H]⁺

Mr (izračunana): 322,40

HR-MS: 323,1747 (izračunana: 323,1760)

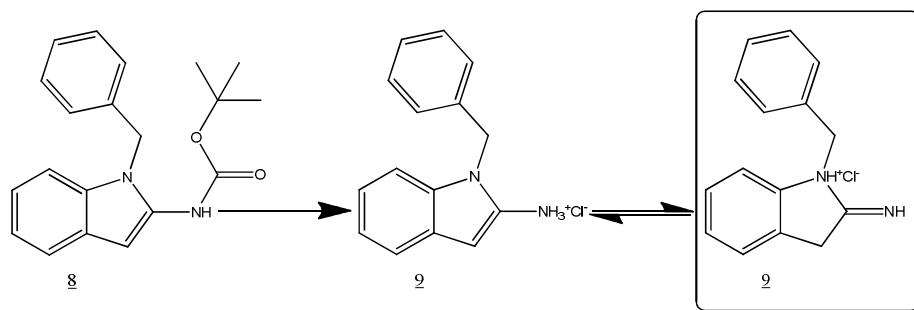
Elementna sestava: C₂₀H₂₂N₂O₂

Elementna analiza za C₂₀H₂₂N₂O₂:

Izračunane vrednosti	Ugotovljene vrednosti
% C 74,51	% C 74,34
% H 6,88	% H 6,65
% N 8,69	% 8,56

4.2.4. SINTEZA 1-BENZILINDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (9)

Reakcija:



Postopek:

V 25 ml bučko smo natehtali 47 mg (0,1 mmol) *tert*-butil (1-benzil-1*H*-indol-2-il)karbamata (8) ter ga raztopili v 1,5 ml dietiletra. Reakcijsko zmes smo postavili na ledeno kopel za 10 min, nato dodali 4 ml dietiletra, ki smo ga predhodno prepigli s HCl, ter pustili reakcijo potekati na ledu. Po 30 min smo s TLC zaznali konec reakcije ter odpareli topilo pod znižanim tlakom. Vsebino bučko smo 4 x suspendirali v 4 ml dietiletra ter ga odpareli. Nato smo dodali 6 ml dietiletra ter bučko postavili v hladilnik. Po 20 h je izpadel želeni produkt, ki smo ga odfiltrirali z odsesavanjem.

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 82,05 % (31 mg)

Rf: 0 (MF 3 : Heksan/etilacetat : 2/1)

T_{tališča}: 246,9-250,1 °C

IR (cm⁻¹): 2943, 1681, 1601, 1493, 1468, 1443, 1376, 891, 746, 731, 709, 694, 662, 580

¹H-NMR (400 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm] = 4,38 (s, 2H, -indolin-CH₂-), 5,38 (s, 2H, Ar-CH₂), 7,14 (d, 1H, J=8,0 Hz, Ar-H), 7,19 – 7,21 (m, 1H, indol-H), 7,33 – 7,37 (m, 6H, indol-H in Ar-H), 7,49 (d, 1H, J=7,2 Hz, indol-H), 10,36 (s, 1H, =NH), 10,71 (s, 1H, -NH-CH₂-Ar)

MS (ESI): 223,1 [M-Cl]⁺

Mr (izračunana): 258,75

HR-MS: 223,1231 (izračunana: 223,1235 brez Cl) **Elementna sestava:** C₁₅H₁₅N₂Cl

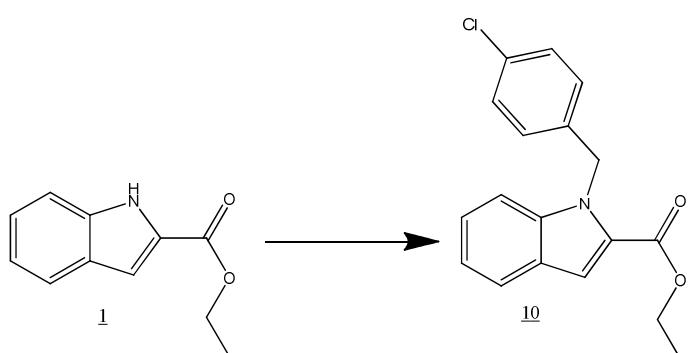
Elementna analiza za C₁₅H₁₅N₂Cl:

Izračunane vrednosti	C ₁₅ H ₁₅ N ₂ Cl x 0,1 HCl	Ugotovljene vrednosti
% C 69,63	% C 68,66	% C 68,95
% H 5,84	% H 5,80	% H 5,40
% N 10,83	% N 10,68	% N 10,57

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

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

Reakcija:



Postopek:

V 50 ml bučko smo natehtali 896 mg (4,7 mmol) etil 1*H*-indol-2-karboksilata (1) ter ga raztopili v 20 ml acetona. Reakcijski zmesi smo dodali še 767 mg (4,7 mmol) 4-klorobenzil klorida ter 644 mg (4,7 mmol) K₂CO₃, ki smo ju predhodno raztopili v 10 ml acetona. Bučko smo prestavili na oljno kopel ter segrevali pri temperaturi refluksa (56 °C).

Po 16 h smo s TLC zaznali konec reakcije, prekinili reakcijo ter topilo odpareli pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s prekristalizacijo iz etanola (3 ml). Po 1 h v hladilniku so izpadli rumeni kristali, ki smo jih odfiltrirali z odsesavanjem. Produkt smo zbrali na petrijevki in ga 2 h sušili v sušilniku do konstantne mase pri temperaturi 40 °C.

Rezultati:

Izgled: rumeni kristali

Izkoristek: 77,21 % (1,145 g)

Rf: 0,42 (MF 6 : Heksan/etilacetat : 5/1)

T_{tališča}: 97,4-99,7 °C

IR (cm⁻¹): 1709, 1517, 1488, 1456, 1410, 1259, 1219, 1182, 1139, 1117, 1012, 825, 798, 760, 742

¹H-NMR (400 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm]= 1,29 (t, 3H, J=7,2 Hz, -CH₃), 4,29 (k, 2H, J=7,2 Hz, -CH₂-CH₃), 5,85 (s, 2H, Ar-CH₂), 7,03 (d, 2H, J=8,0 Hz, Ar-H), 7,17 (t, 1H, J=8,0 Hz, Ar-H), 7,31 – 7,39 (m, 4H, indol-H in Ar-H), 7,58 (dd, 1H, J=7,2 Hz, J=0,4 Hz, indol-H), 7,76 (d, 1H, J=8,0 Hz, indol-H) , lit. (60)

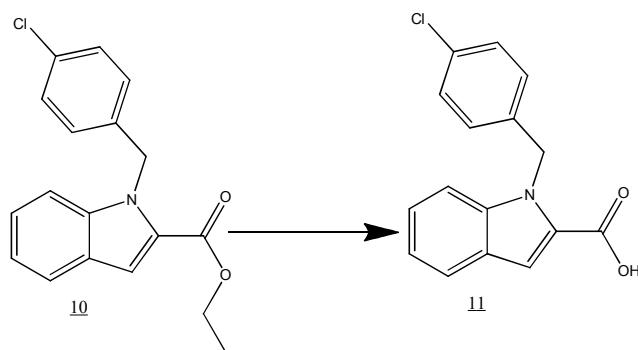
MS (ESI): 314,1 [M+H]⁺

Mr (izračunana): 313,33

HR-MS: 314,0951 (izračunana: 314,0948) **Elementna sestava:** C₁₈H₁₆ClNO₂

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

Reakcija:



Postopek:

V 25 ml bučko smo natehtali 980 mg (3,1 mmol) etil 1-(4-klorobenzil)-1H-indol-2-karboksilata (10) ter ga raztopili v 6 ml etanola in 6 ml THF. Po kapljicah smo dodali 5,2 ml 1M raztopine KOH. Reakcijo smo najprej pustili potekati 30 min na sobni T, nato pa

smo bučko segrevali še 16 h na oljni kopeli s povratnim hladilnikom pri temperaturi refluksa (79 °C). Po skupnih 16 h smo s TLC zaznali, da je reakcija potekla. Zmes smo nakisali z 1M raztopino HCl, da je izpadel želeni produkt. Oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem, produkt prenesli na petrijevko in ga 1 h sušili v sušilniku do konstantne mase pri temperaturi 50 °C.

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 99,38 % (886 mg)

Rf: 0,70 (MF 2 : Heksan/etilacetat : 1/1 + 1% ocetne kisline; bromkrezolno zeleno)

T_{tališča}: 197,9-201,8 °C

IR (cm⁻¹): 2690, 1675, 1520, 1485, 1459, 1438, 1269, 1206, 1164, 1183, 1089, 1014, 898, 840, 825, 803, 747, 582, 564

¹H-NMR (400 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm]= 5,87 (s, 2H, Ar-CH₂), 7,03 – 7,05 (m, 2H, Ar-H), 7,12 – 7,15 (m, 1H, Ar-H), 7,28 – 7,34 (m, 4H, indol-1H in Ar-H), 7,53 – 7,56 (m, 1H, indol-H), 7,70 - 7,72 (m, 1H, indol-H), 13,00 (s, 1H, -COOH), lit. (60)

MS (ESI): 284,0 [M-H]⁻

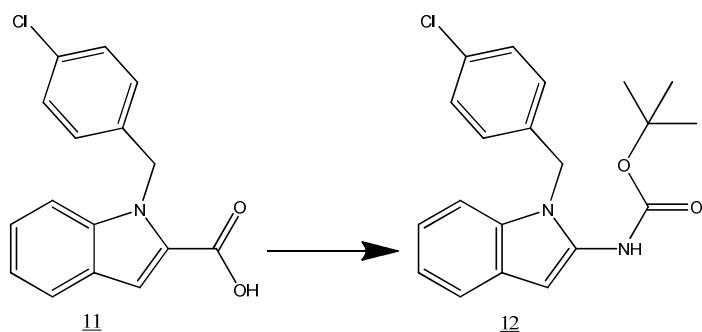
Mr (izračunana): 285,72

HR-MS: 284,0490 (izračunana: 284,0478)

Elementna sestava: C₁₆H₁₂ClNO₂

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

Reakcija:



Postopek:

V 50 ml bučko smo natehtali 876 mg (3,1 mmol) 1-(4-klorobenzil)-1H-indol-2-karboksilne kisline (11) ter jo raztoplili v 21 ml *terc*-butanola. V bučko smo dodali še 100 mg zdrobljenih molekulskih sit (4 Å), 0,5 ml (1,2 eq; 3,7 mmol) trietylamina in 0,8 ml (1,3 eq; 3,8 mmol) DPPA. Reakcijsko zmes smo prepihavali z argonom, nato pa smo bučko

prenesli na oljno kopel ter segrevali pri temperaturi refluksa ($82\text{ }^{\circ}\text{C}$). Po 2 h smo s TLC zaznali konec reakcije ter topilo odpareli pod znižanim tlakom. Spojino smo očistili s pomočjo kolonske kromatografije (MF 3 : Heksan/etilacetat : 2/1).

Rezultati:

Izgled: oranžna viskozna snov

Izkoristek: 48,44 % (530 mg)

Rf: 0,32 (MF 6 : Heksan/etilacetat : 5/1; ninhidrin)

T_{tališča}: /

IR (cm⁻¹): 2910, 2166, 1684, 1588, 1486, 1368, 1335, 1298, 1269, 1202, 1180, 1156, 1093, 1057, 1024, 1010, 940, 762, 686, 597, 557

¹H-NMR (400 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm] = 1,34s (s, 9H, (-CH₃)₃), 5,36 (s, 2H, Ar-CH₂), 6,36 (s, 1H, indol-H), 6,97 - 7,05 (m, 2H, Ar-H), 7,32 – 7,36 (m, 4H, indol-H in Ar-H), 7,46 – 7,52 (m, 2H, indol-H), 9,36 (s, 1H, -NH-CO-)

MS (ESI): 357,1 [M+H]⁺

Mr (izračunana): 356,85

HR-MS: 357,1361 (izračunana: 357,1370)

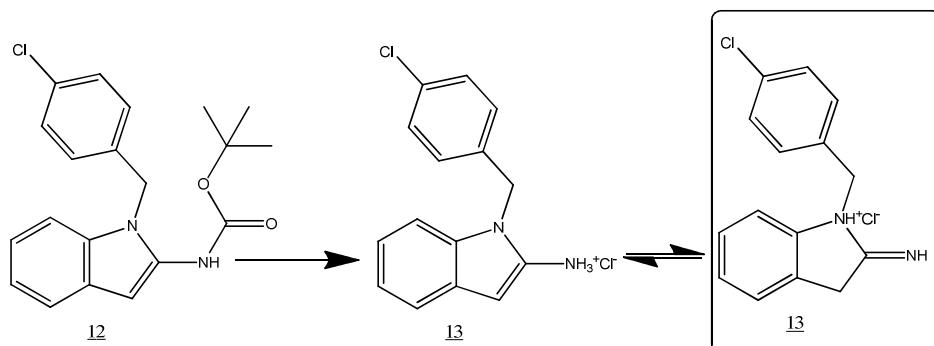
Elementna sestava: C₂₀H₂₁ClN₂O₂

Elementna analiza za C₂₀H₂₁ClN₂O₂:

Izračunane vrednosti	Ugotovljene vrednosti
% C 67,32	% C 63,22
% H 5,93	% H 3,72
% N 7,85	% N 9,22

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

Reakcija:



Postopek:

V 25 ml dvogrlo bučko smo natehtali 119 mg (0,3 mmol) *terc*-butil(1-(4-klorobenzil)-1*H*-indol-2-il)karbamata (12) ter ga raztopili v 15 ml dietiletra, ki smo ga predhodno 5 min prepihovali s HCl, ter pustili reakcijo potekati pri sobni T. Po 1 h smo s TLC zaznali konec reakcije in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Vsebino bučko smo 4x suspendirali v 4 ml dietiletra ter ga odpareli. Nato smo dodali 6 ml dietiletra ter bučko postavili v hladilnik. Po 16 h je izpadel želen produkt, ki smo ga odfiltrirali z odsesavanjem.

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 38,68 % (34 mg)

Rf: 0 (MF 6 : Heksan/etilacetat : 5/1)

T_{tališča}: 127,6-129,1 °C

IR (cm⁻¹): 2910, 1692, 1604, 1494, 1465, 1434, 1368, 1098, 885, 812, 799, 749, 663, 642, 598, 560

¹H-NMR (400 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm]= 4,37 (s, 2H, -indolin-CH₂-), 5,31 (s, 2H, Ar-CH₂), 7,14 (d, 1H, J=7,6 Hz, Ar-H), 7,23 (t, 1H, J=7,4 Hz, indol-H), 7,33 (t, 1H, J=7,4 Hz, indol-H), 7,38 (d, 2H, J=14,8 Hz, Ar-H), 7,41 – 7,52 (m, 3H, Ar-H in indol-H), 10,07 (s, 1H, indol-NH₂), 10,49 (s, 1H, indol-NH-CH₂-Ar)

MS (ESI): 257,0 [M-Cl-H]⁺

Mr (izračunana): 293,19

HR-MS: 257,0839 (izračunana: 257,0846 brez Cl) **Elementna sestava:** C₁₅H₁₄Cl₂N₂

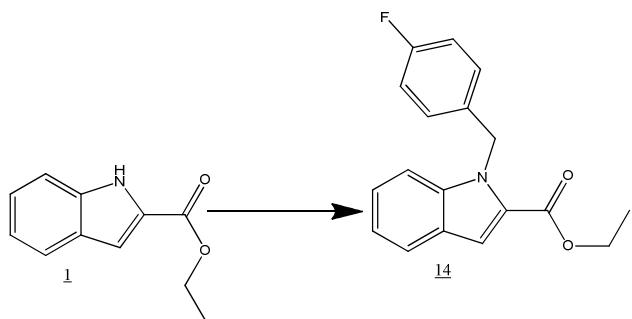
Elementna analiza za C₁₅H₁₄Cl₂N₂:

Izračunane vrednosti	Ugotovljene vrednosti
% C 61,45	% C 61,70
% H 4,81	% H 4,52
% N 9,55	% N 9,35

4.4. SINTEZA 1-(4-FLUOROBENZIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (15)

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

Reakcija:



Postopek:

V 50 ml bučko smo natehtali 849,0 mg (4,5 mmol) etil 1*H*-indol-2-karboksilata (1) ter ga raztopili v 20 ml acetona. Reakcijski zmesi smo dodali še 615 µL (4,9 mmol) 4-fluorobenzilbromida ter 2,9 g (2 eq; 9 mmol) Cs₂CO₃, ki smo ju predhodno raztopili v 10 ml acetona. Bučko smo prestavili na oljno kopel ter segrevali pri temperaturi refluksa (56 °C). Po 18 h smo s TLC zaznali konec reakcije, prekinili reakcijo ter topilo odpareli pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s prekrstalizacijo iz etanola (3 ml). Po 1 h v hladilniku so izpadli rumeni kristali, ki smo jih odfiltrirali z odsesavanjem. Produkt smo zbrali na petrijevki in ga 2 h sušili v sušilniku do konstantne mase pri temperaturi 40 °C.

Rezultati:

Izgled: rumeno-beli kristali

Izkoristek: 68,62 % (916 mg)

Rf: 0,44 (MF 6 : Heksan/etilacetat : 5/1)

T_{tališča}: 77,7-79,5 °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, Ar-CH₂), 7,09 – 7,16 (m, 5H, indol-H in Ar-H), 7,31 – 7,35 (m, 1H, indol-H), 7,38 (d, 1H, J=0,8 Hz, indol-H), 7,59 – 7,62 (m, 1H, indol-H), 7,72 – 7,74 (m, 1H, indol-H), lit. (60)

MS (ESI): 298,1 [M+H]⁺

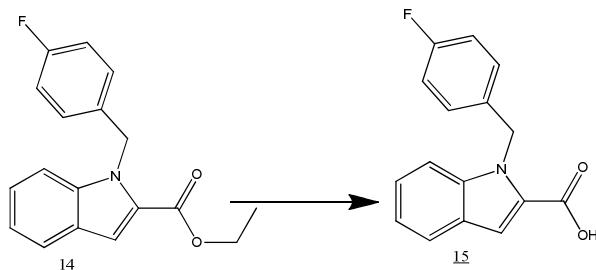
Mr (izračunana): 297,32

HR-MS: 298,1238 (izračunana: 298,1243)

Elementna sestava: C₁₈H₁₆FNO₂

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

Reakcija:



Postopek:

V 25 ml bučko smo natehtali 574 mg (2,6 mmol) etil 1-(4-fluorobenzil)-1*H*-indol-2-karboksilata (14) ter ga raztopili v 10 ml etanola. Po kapljicah smo dodali 1,7 ml 1M raztopine KOH. Reakcijo smo najprej pustili potekati 1 h na sobni T, nato pa smo bučko segrevali še 30 min na oljni kopeli s povratnim hladilnikom pri temperaturi refluksa (79 °C). Po skupnih 90 min smo s TLC zaznali, da je reakcija potekla. Zmes smo nakisali z 1M raztopino HCl, da je izpadel želeni produkt. Oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem, produkt prenesli na petrijevko in ga 2 h sušili v sušilniku do konstantne mase pri temperaturi 40 °C.

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 57,42 % (402 mg)

Rf: 0,50 (MF 2 : Heksan/etilacetat : 1/1 + 1% ocetne kisline; bromkrezolno zeleno)

T_{tališča}: 175,9-180,0 °C

IR (cm⁻¹): 2528, 1674, 1607, 1512, 1483, 1460, 1445, 1425, 1354, 1318, 1268, 1206, 117, 1134, 1091, 1016, 898, 826, 805, 768, 739, 615, 573

¹H-NMR (400 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm]= 5,86 (s, 2H, Ar-CH₂), 7,09 – 7,15 (m, 5H, indol-1H in Ar-H), 7,28 – 7,33 (m, 2H, indol-1H in Ar-H), 7,58 (dd, 1H, J=8,5 Hz, J=0,8 Hz, indol-H), 7,71 (d, 1H, J=7,8 Hz, indol-H), 13,01 (s, 1H, -COOH), lit. (60)

MS (ESI): 268,1 [M-H]⁻

Mr (izračunana): 269,27

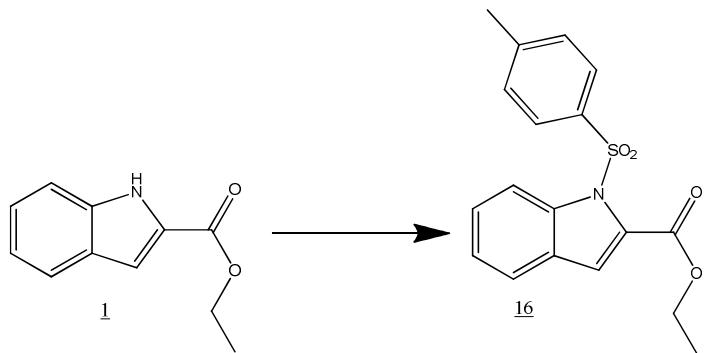
HR-MS: 268,0786 (izračunana: 268,0774)

Elementna sestava: C₁₆H₁₂FNO₂

4.5. SINTEZA 1-(4-TOLUENSULFONIL)INDOLIN-2-IMINA (20)

4.5.1. SINTEZA ETIL 1-(4-TOLUENSULFONIL)-1*H*-INDOL-2-KARBOKSILATA (16)

Reakcija:



Postopek:

V 100 ml bučko smo natehtali 1,9 g (10 mmol) etil 1*H*-indol-2-karboksilata (1) ter ga raztopili v 20 ml THF. V bučko smo dodali še 265 mg (1 mmol) kronskega etra (18-Crown-6) ter 1,5 g (1,35 eq; 13,5 mmol) 1M raztopine kalijevega *tert*-butokksida v THF po kapljicah. Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni T 10 min, nato smo bučko prestavili na ledeno kopel. Po ohladitvi na 0 °C smo mešali še 15 min, nato pa dodali 2,3 g (1,2 eq; 12 mmol) *para*-toluensulfonilklorid ter pustili reakcijo potekati na sobni T. Po 20 h smo s TLC zaznali konec reakcije, prekinili reakcijo ter topilo odpareli pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF 8 : Heksan/etilacetat : 9/1).

Rezultati:

Izgled: oranžno-rumeni kristali

Izkoristek: 73,68 % (2,53 g)

Rf: 0,4 (MF 8 : Heksan/etilacetat : 9/1)

T_{tališča}: 94,8-97,5 °C

IR (cm⁻¹): 1729, 1366, 1337, 1264, 1191, 1175, 1147, 1129, 1092, 1042, 1017, 816, 758, 743, 676, 652, 579, 555

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1,42 (t, 3H, J=7,2 Hz, -CH₃), 2,40 (s, 3H, Ar-CH₃), 4,43 (k, 2H, J=7,2 Hz, -CH₂-CH₃), 7,27 - 7,29 (m, 4H, indol-H in Ar-H), 7,34 - 7,35 (m, 1H, indol-H), 7,42 - 7,44 (m, 1H, indol-H), 7,57 - 7,59 (m, 1H, Ar-H), 7,93 - 7,85 (m, 2H, Ar-H), 8,12 – 8,14 (m, H, Ar-H), lit. (61)

MS (ESI): 344,1 [M+H]⁺

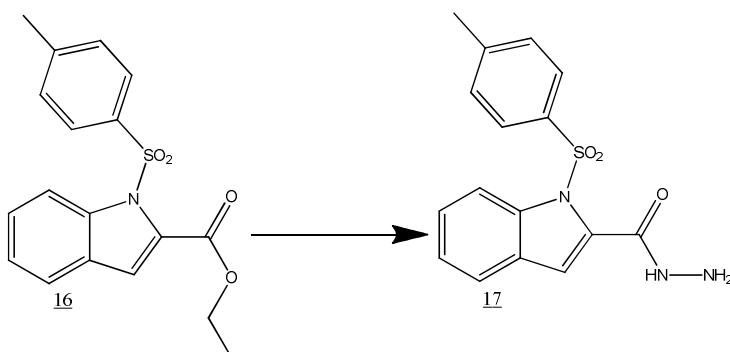
Mr (izračunana): 343,40

HR-MS: 344,0954 (izračunana: 344,0957)

Elementna sestava: C₁₈H₁₇NO₄S

4.5.2. SINTEZA 1-(4-TOLUENSULFONIL)-1*H*-INDOL-2-HIDRAZIDA (17)

Reakcija:



Postopek:

V 50 ml bučko smo zatehtali 1,1 g (3,2 mmol) etil 1-(4-toluensulfonil)-1*H*-indol-2-karboksilata (16) in ga raztopili v 13 ml etanola. Reakcijsko zmes smo segrevali na oljni kopeli do temperature 60 °C. Nato smo dodali 8 ml hidrazin hidrata ter segrevali na temperaturi refluksa (80 °C). Po 4 h smo s TLC zaznali konec reakcije, bučko smo odstavili iz oljne kopeli ter vsebino bučko ohladili na sobni T. Pri tem je izpadel želeni produkt. Oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem, produkt prenesli na petrijevko in ga 2 h sušili v sušilniku do konstantne mase pri temperaturi 40 °C.

Rezultati:

Izgled: oranžni kristali

Izkoristek: 82,73 % (872 mg)

Rf: 0,45 (MF 16 : Etilacetat)

T_{tališča}: 97,4-99,7 °C

IR (cm⁻¹): 2964, 1676, 1544, 1483, 1446, 1368, 1342, 1259, 1174, 1149, 1087, 1015, 926, 869, 796, 747, 669, 631, 581

¹H-NMR (400 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm]= 2,34 (s, 3H, Ar -CH₃), 4,56 - 4,59 (m, 2H, -NH-NH₂), 6,94 (s, 1H, indol-H), 7,26 – 7,28 (m, 1H, indol-H), 7,37 – 7,40 (m, 3H, indol-H), 7,62 – 7,64 (m, 1H, Ar-H), 7,94 – 7,97 (m, 1H, Ar-H), 8,06 (d, 2H, J=6,2 Hz, Ar-H), 9,96 (s, 1H, -NH-NH₂)

MS (ESI): 330,1 [M+H]⁺

Mr (izračunana): 329,37

HR-MS: 330,0918 (izračunana: 330,0912)

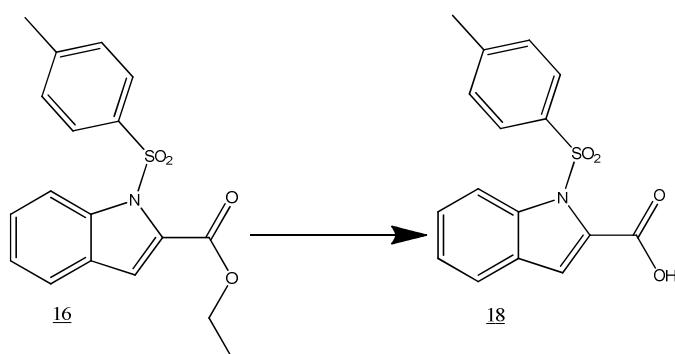
Elementna sestava: C₁₆H₁₅N₃O₃S

Elementna analiza za C₁₆H₁₅N₃O₃S:

Izračunane vrednosti	C ₁₆ H ₁₅ NO ₄ S x 0,65 C ₂ H ₆ O	Ugotovljene vrednosti
% C 58,34	% C 57,83	% C 57,76
% H 12,76	% H 5,30	% H 5,26
% N 4,59	% N 11,69	% 11,71

4.5.3. SINTEZA 1-(4-TOLUENSULFONIL)-1*H*-INDOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (18)

Reakcija:



Postopek:

V 100 ml bučko smo natehtali 1,4 g (4,0 mmol) etil 1-(4-toluensulfonil)-1*H*-indol-2-karboksilata (16) ter ga raztopili v zmesi 10 ml 1M KOH, 10 ml etanola in 10 ml THF. Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni T. Po 20 h smo s TLC zaznali konec reakcije ter odparili topilo. Produkt smo očistili s pomočjo kolonske kromatografije (MF 1 : Heksan/etilacetat : 1/1).

Rezultati:

Izgled: rožnati kristali

Izkoristek: 17,28 % (219 mg)

Rf: 0,50 (MF 2 : Heksan/etilacetat : 1/1 + 1% ocetne kisline; bromkrezolno zeleno)

T_{tališča}: 137,4-141,9 °C

IR (cm⁻¹): 2841, 1703, 1369, 1203, 1177, 1151, 1130, 1086, 816, 744, 672, 624, 570, 560

¹H-NMR (400 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm] = 2,33 (s, 3H, Ar-CH₃), 6,38 (s, 1H, indol-H), 7,14 – 7,17 (m, 1H, indol-H), 7,32 – 7,34 (m, 2H, indol-H), 7,43 – 7,45 (m, 1H, indol-H),

7,85 (d, 1H, $J=7,8$ Hz, Ar-H), 8,21 (d, 2H, $J=7,8$ Hz, Ar-H), 8,35 (s, 1H, Ar-H), 11,76 (s, 1H, -CO-OH)

MS (ESI): 316,1 [M+H]⁺

Mr (izračunana): 315,34

HR-MS: 316,0641 (izračunana: 316,0644)

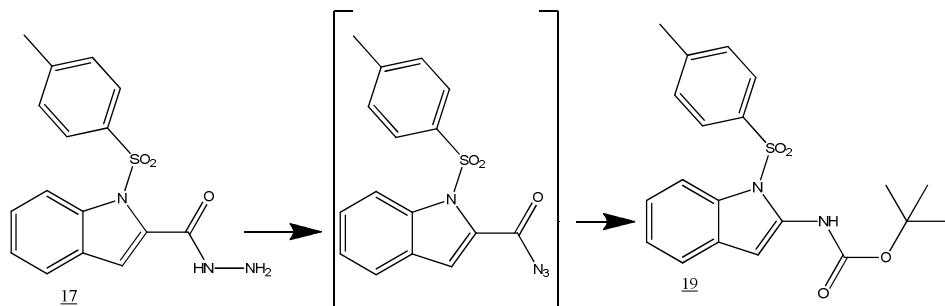
Elementna sestava: C₁₆H₁₃NO₄S

Elementna analiza za C₁₆H₁₃NO₄S:

Izračunane vrednosti	Ugotovljene vrednosti
% C 60,94	% C 60,66
% H 4,16	% H 3,82
% N 4,44	% 4,51

4.5.4. SINTEZA TERC-BUTIL (1-(4-TOLUENSULFONIL)-1*H*-INDOL-2-IL)KARBAMATA (19)

Reakcija:

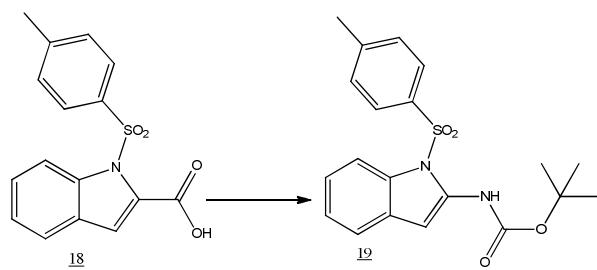


Postopek A:

V 50 ml bučko smo natehtali 390 mg (1,2 mmol) 1-(4-toluensulfonil)-1*H*-indol-2-hydrazida (17) ter ga raztopili v 5 ml destilirane vode in 4 ml koncentrirane HCl. Reakcijsko zmes smo ohladili na -10 °C ter dodali še 291 mg (4,2 mmol) NaNO₂, raztopljenega v 13 ml destilirane vode, ter pustili reakcijo potekati pri -10 °C. Po 30 min smo ponovno dodali 400 mg (5,8 mmol) NaNO₂, raztopljenega v 3 ml destilirane vode. Po 3 h smo s TLC zaznali konec reakcije ter reakcijsko zmes ekstrahirali z 20 ml toluena. Produkt 1-(4-toluensulfonil)-1*H*-indol-2-kislinski azid uporabimo naslednji stopnji.

V 50 ml bučko smo natehtali 408 mg (1,2 mmol) 1-(4-toluensulfonil)-1*H*-indol-2-kislinskega azida ter ga raztopili v 10 ml toluena. Dodali smo še 10 ml *terc*-butanola ter 100 mg zdrobljenih molekulskih sit (4 Å). Bučko smo prenesli na oljno kopel ter segrevali pri temperaturi refluksa (82 °C). Po 20 h smo s TLC zaznali konec reakcije ter topilo odpareli pod znižanim tlakom. Spojino smo očistili s pomočjo kolonske kromatografije (MF 1 : Heksan/etilacetat : 1/1).

Reakcija:



Postopek B:

V 50 ml bučko smo natehtali 189 mg (0,6 mmol) 1-(4-toluensulfonil)-1*H*-indol-2-karboksilne kisline (18) ter jo raztopili v 12 ml *terc*-butanola. V bučko smo dodali še 46 mg zdrobljenih molekulskih sit (4 Å), 100 µl (1,2 eq; 0,7 mmol) trietilamina in 160 µl (1,3 eq; 0,7 mmol) DPPA. Reakcijsko zmes smo prepihovali z argonom, nato pa smo bučko prenesli na oljno kopel ter segrevali pri temperaturi refluksa (82 °C). Po 18 h smo s TLC zaznali konec reakcije in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Spojino smo očistili s pomočjo kolonske kromatografije (MF 1 : Heksan/etilacetat : 1/1).

Rezultati:

Izgled: rjava viskozna snov

Izkoristek: 50,40 % (230 mg)

Rf: 0,87 (MF 1 : Heksan/etilacetat : 1/1; ninhidrin)

T_{tališča}: /

IR (KBr, cm⁻¹): 3384, 2977, 1733, 1597, 1513, 1453, 1336, 1297, 1243, 1213, 1144, 1086, 1019, 923, 850, 797, 743, 702, 633, 630, 571

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1,49 (s, 9H, (-CH₃)₃), 2,26 (s, 2H, Ar-CH₃), 6,67 (s, 1H, -NH-CO), 7,08 – 7,12 (m, 3H, indol-H in Ar-H), 7,24 – 7,26 (m, 1H, indol-H), 7,55 (d, 2H, J=8,4 Hz, indol-H), 7,90 – 7,92 (m, 1H, Ar-H), 8,45 (s, 1H, Ar-H)

MS (ESI): 387,1 [M+H]⁺

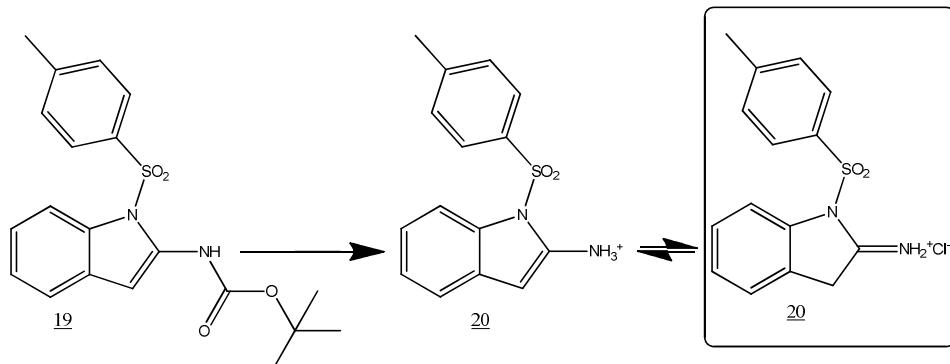
Mr (izračunana): 386,46

HR-MS: 387,1376 (izračunana: 387,1379)

Elementna sestava: C₂₀H₂₂N₂O₄S

4.5.4. SINTEZA 1-(4-TOLUENSULFONIL)INDOLIN-2-IMINJEVEGA KLORIDA (20)

Reakcija:



Postopek:

V 50 ml dvogrlo bučko smo natehtali 200 mg (0,5 mmol) *terc*-butil (1-(4-toluensulfonil)-1*H*-indol-2il)karbamata ter ga raztopili v 15 ml dietiletra, katerega smo predhodno 5 min prepihovali s HCl, ter jo pustili reakcijo potekati pri sobni T. Po 1 h smo s TLC zaznali konec reakcije in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Vsebino bučko smo 4x suspendirali v 4 ml dietiletra ter ga odpareli. Nato smo dodali 6 ml dietiletra ter bučko postavili v hladilnik. Po 16 h je izpadel želen produkt, ki smo ga odfiltrirali z odsesavanjem.

Rezultati:

Izgled: oranžna viskozna snov

Izkoristek: 90,36 % (182 mg)

Rf: 0,0 (MF 3 : Heksan/etilacetat : 2/1)

T_{tališča}: /

IR (KBr, cm⁻¹): 2961, 2359, 2341, 1660, 1406, 1327, 1258, 1012, 791, 668, 560

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 2,43 (s, 3H, -Ar-CH₃), 3,23 (s, 2H, indolin-CH₂-), 5,71- 5,73 (m, 1H, indol-H), 6,81 – 6,83 (m, 3H, indol-H), 7,89 – 7,92 (m, 4H, Ar-H), 8,89 (s, 1H, indol-NH₂)

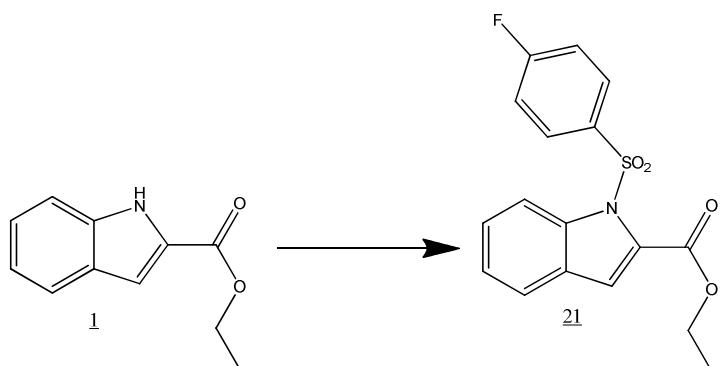
MS (ESI): 288,1 [M-Cl+H]⁺

Mr (izračunana): 322,81

HR-MS: 288,0938 (izračunana: 288,0932 brez Cl) Elementna sestava: C₁₅H₁₅N₂O₂SCl

4.6. SINTEZA ETIL 1-((4-FLUOROFENIL)SULFONIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILATA (21)

Reakcija:



Postopek:

V 100 ml bučko smo natehtali 1,9 g (10 mmol) etil 1*H*-indol-2-karboksilata (1) ter ga raztopili v 20 ml THF. V bučko smo dodali še 265 mg (1 mmol) kronskega etra (18-Crown-6) ter 13,5 ml (1,4 eq; 13,5 mmol) 1M raztopine kalijevega *terc*-butoksida v 20 ml THF po kapljicah. Zmes smo mešali pri sobni T 15 min, nato smo bučko prestavili na ledeno kopel. Po ohladitvi na 0 °C smo mešali še 15 min, nato pa dodali 2,5 g (1,2 eq; 12 mmol) 4-fluorobenzensulfonilklorid ter pustili reakcijo potekati na sobni T. Po 24 h smo s TLC zaznali konec reakcije, prekinili reakcijo ter topilo odpareli pod znižanim tlakom. Pričeli smo z ekstrakcijo, kjer smo dodali 200 ml diklorometana ter ga spirali s 3x 50 ml destilirane vode. Organsko fazo smo posušili nad Na₂SO₄ ter topilo odpareli pod znižanim tlakom. Produkt smo nato očistili s prekrstalizacijo iz etanola (5 ml). Po 12 h v hladilniku so izpadli rumeni kristali, ki smo jih odfiltrirali z odsesavanjem. Produkt smo zbrali na petrijevki in ga 2 h sušili v sušilniku do konstantne mase pri temperaturi 40 °C.

Rezultati:

Izgled: oranžno-rumeni kristali

Izkoristek: 57,87 % (2010 mg)

Rf: 0,41 (MF 4 : Heksan/etilacetat : 3/1)

T_{tališča}: 95,2-98,2 °C

IR (cm⁻¹): 1726, 1589, 1495, 1366, 1337, 1265, 1176, 1149, 1127, 1088, 920, 861, 846, 818, 757, 711, 682, 655, 579, 554

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 1,43 (t, 3H, J=7,1 Hz, -CH₃), 4,43 (k, 2H, J=7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 7,15 – 7,20 (m, 3H, indol-H in Ar-H), 7,32 – 7,34 (m, 1H, indol-H), 7,45 – 7,47 (m, 1H, indol-H), 7,59 – 7,60 (m, 1H, Ar-H), 8,09 - 8,11 (m, 3H, Ar-H)

MS (ESI): 348,1 [M+H]⁺

Mr (izračunana): 347,36

HR-MS: 348,0706 (izračunana: 348,0706)

Elementna sestava: C₁₇H₁₄FNO₄S

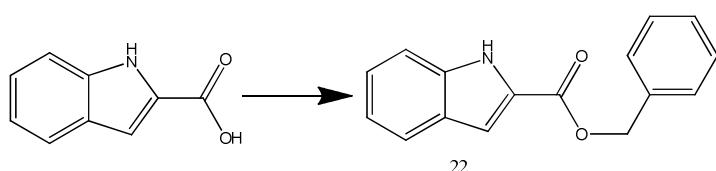
Elementna analiza za C₁₇H₁₄FNO₄S:

Izračunane vrednosti	Ugotovljene vrednosti
% C 58,78	% C 58,88
% H 4,06	% H 3,62
% N 4,03	% N 4,05

4.7. SINTEZA 1-(4-KLOROBENZOIL)INDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (27)

4.7.1. SINTEZA BENZIL 1H-INDOL-2-KARBOKSILATA (22)

Reakcija:



Postopek:

V 50 ml bučko smo natehtali 1,4 g (8,8 mmol) 1H-indol-2-karboksilne kisline (1) ter jo raztopili v 10 ml THF. Po kapljicah smo na sobni T dodali 1,6 g (1,1 eq; 9,7 mmol) CDI, ki smo ga predhodno raztopili v 12 ml THF. Po 1 h smo s TLC zaznali, da je aktivacija potekla, zato smo dodali 1 ml (1,1 eq; 9,7 mmol) benzilnega alkohola. Reakcijsko zmes smo preneseli na oljno kopel ter bučko opremili s povratnim hladilnikom in refruktirali. Po 24 h smo s TLC zaznali konec reakcije, nakar smo topilo odpareli pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo raztopili v 50 ml diklorometana ter ga spirali s 50 ml destilirane vode. Organsko fazo smo spirali še z nasičeno raztopino NaHCO₃ in jo posušili z natrijevim sulfatom. Topilo smo odpareli pod znižanim tlakom in dobili naš produkt.

Rezultati:

Izgled: rumeni kristali

Izkoristek: 75,36 % (1672 mg)

Rf: 0,74 (MF 14 : Triklorometan/metanol : 5/1 + 1% ocetne kisline)

T_{tališča}: 132,6-134,6 °C

IR (cm⁻¹): 3337, 1683, 1522, 1452, 1389, 1338, 1306, 1260, 1242, 1191, 1140, 1079, 1015, 974, 942, 923, 822, 770, 747, 732, 693, 657, 598, 576

¹H-NMR (400 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm]= 5,39 (s, 2H, O-CH₂-Ar), 7,06 – 7,11 (m, 1H, indol-H), 7,22 - 7,51 (m, 8H, indol-H in Ar-H), 7,66 (dd, 1H, J=8,0 Hz, J=0,8 Hz, indol-H), 11,94 (s, 1H, indol-NH-)

MS (ESI): 250,1 [M-H]⁻

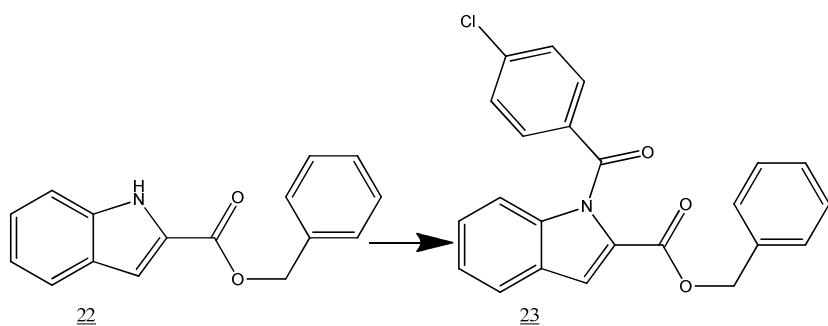
Mr (izračunana): 251,28

HR-MS: 250,0875 (izračunana: 250,0868)

Elementna sestava: C₁₆H₁₃NO₂

4.7.2. SINTEZA BENZIL 1-(4-KLOROBENZOIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILATA (23)

Reakcija:



Postopek:

V 50 ml bučko smo natehtali 1,3 g (5,0 mmol) benzil 1*H*-indol-2-karboksilata (22) ter ga raztopili v 25 ml THF. V bučko smo dodali še 132,5 mg (0,1 eq; 0,5 mmol) kronskega etra (18-Crown-6) ter 785,5 mg (1,4 eq; 7 mmol) kalijevega *tert*-butoksida. Vsebino bučko smo najprej mešali 15 min na sobni T, nato pa bučko prestavili na ledeno kopel, do ohladitve na 0 °C. Nato smo po kapljicah dodali 0,8 ml (1,2 eq; 6 mmol) 4-klorobenzoilklorida ter bučko odstavili iz ledene kopeli. Po 48 h smo s TLC zaznali konec reakcije, prekinili reakcijo ter topilo odpareli pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo raztopili v 30 ml diklorometana, ga spirali s 40 ml destilirane vode. Organsko fazo smo posušili nad Na₂SO₄ ter topilo odpareli. Produkt smo očistili s pomočjo kolonske kromatografije (MF 8 : Heksan/etilacetat : 9/1).

Rezultati:

Izgled: rumeni kristali

Izkoristek: 38,99 % (760 mg)

Rf: 0,34 (MF 8 : Heksan/etilacetat : 9/1)

T_{tališča}: 69,9 - 72,7 °C

IR (cm⁻¹): 1713, 1689, 1391, 1314, 1264, 1222, 1197, 1145, 1091, 1034, 1010, 986, 966, 902, 818, 748, 696, 632, 612, 592, 569

¹H-NMR (400 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm] = 5,04 (s, 2H, -CH₂-Ar), 7,22 – 7,43 (m, 11H, indol-H in Ar-H), 7,56 (d, 2H, J=8,4 Hz, Ar-H), 7,70 (d, 1H, J=8,0 Hz, Ar-H), 7,70 (d, 1H, J=8,8 Hz, Ar-H), 8,14 – 8,16 (m, 2H, Ar-H)

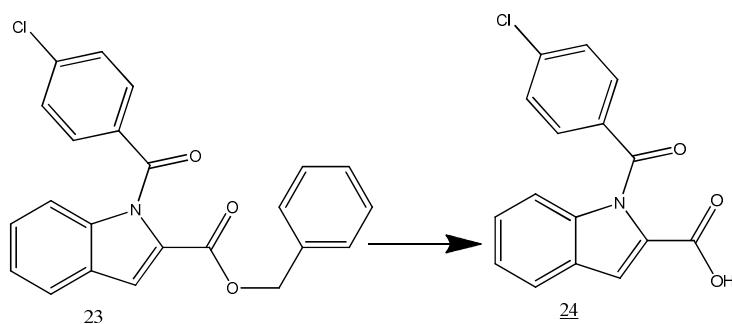
MS (ESI): 390,1 [M+H]⁺

Mr (izračunana): 389,88

HR-MS: 390,0895 (izračunana: 390,0897) **Elementna sestava:** C₂₃H₁₆NO₃Cl

4.7.3. SINTEZA 1-(4-KLOROBENZOIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (24)

Reakcija:



Postopek:

V 25 ml dvogrlo bučko smo natehtali 315 mg (0,8 mg) benzil 1-(4-klorobenzoil)-1H-indol-2-karboksilata (23) ter dodali 12 ml etanola. Reakcijsko zmes smo rahlo segrevali z žarilno pištolo, dokler se ni spojina raztopila. Bučko smo nato prepričovali z argonom 10 min, nato pa dodali konico paladija na ogljiku ter zmes prepričovali z vodikom. Po 90 min smo s TLC zaznali konec reakcije ter reakcijo prekinili. Paladij smo odfiltrirali, topilo pa odpareli pod znižanim tlakom.

Rezultati:

Izgled: rjavi kristali

Izkoristek: 81,26 % (197 mg)

Rf: 0,28 (MF 5 : Heksan/etilacetat : 3/1 + 1% ocetne kisline; bromkrezolno zeleno)

T_{tališča}: 51,8-55,3 °C

IR (cm^{-1}): 3021, 1710, 13636, 1486, 1385, 1309, 1266, 1234, 1216, 823, 457, 691, 654, 591, 557

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO – d_6): δ [ppm] = 7,33 – 7,37 (m, 1H, indol-1H), 7,44 – 7,48 (m, 2H, indol-H), 7,62 – 7,68 (m, 5H, indol-H in Ar-H), 7,82 (d, 1H, $J=7,6$ Hz, Ar-H), 13,35 (s, 1H, -CO-OH)

MS (ESI): 298,0 [M-H]⁻

Mr (izračunana): 299,31

HR-MS: 298,0278 (izračunana: 298,0271)

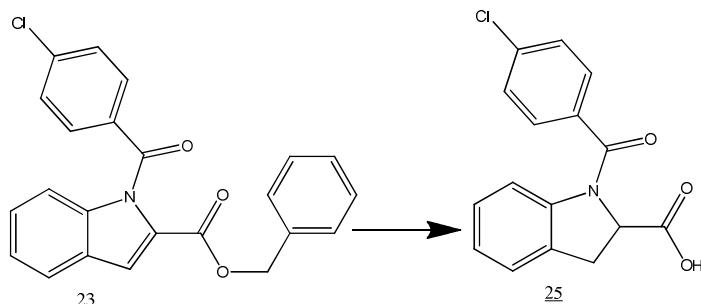
Elementna sestava: C₁₆H₁₀ClNO₃

Elementna analiza za C₁₆H₁₀ClNO₃:

Izračunane vrednosti	Ugotovljene vrednosti
% C 64,12	% C 63,92
% H 3,36	% H 3,40
% N 4,67	% 4,72

4.7.4. SINTEZA 1-(4-KLOROBENZOIL)INDOLIN-2-KARBOKSILNE KISLINE (25)

Reakcija:



Postopek:

V 25 ml dvogrlo bučko smo natehtali 57 mg (0,2 mmol) benzil 1-(4-klorobenzoil)-1H-indol-2-karboksilata (23) ter dodali 10 ml ocetne kisline. Bučko smo rahlo segrevali z žarilno pištolo, dokler se ni izhodna spojina raztopila. Reakcijsko zmes smo nato prepihovali z argonom 10 min, nato pa dodali konico paladija na ogljiku ter zmes prepihovali z vodikom. Po 90 min smo s TLC zaznali konec reakcije ter reakcijo prekinili. Paladij smo odfiltrirali, topilo pa odpareli pod znižanim tlakom.

Rezultati:

Izgled: rdeči kristali

Izkoristek: 90,92 % (40 mg)

Rf: 0,10 (MF 5 : Heksan/etilacetat : 3/1 + 1% ocetne kisline; bromkrezolno zeleno)

T_{tališča}: 174,4-175,6 °C, lit. :: 184–187 °C (62)

IR (cm⁻¹): 2925, 1713, 1634, 1592, 1484, 1461, 1382, 1307, 1264, 1159, 1091, 1015, 997, 914, 826, 782, 747, 694, 675, 655, 593, 559

¹H-NMR (400 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm]= 3,10 – 3,13 (m, 1H, indolin-CH_{2A}), 3,62 – 3,65 (m, 1H, indolin-CH_{2B}), 4,97 – 5,00 (m, 1H, indolin-CH-), 7,05 – 7,06 (m, 1H, Ar-H), 7,27 (d, 1H, J=7,2 Hz, Ar-H), 7,50 - 7,55 (m, 5H, indolin-H in Ar-H), 8,07 – 8,09 (m, 1H, Ar-H), 13,17 (s, 1H, -COOH)

MS (ESI): 300,0 [M-H]⁻

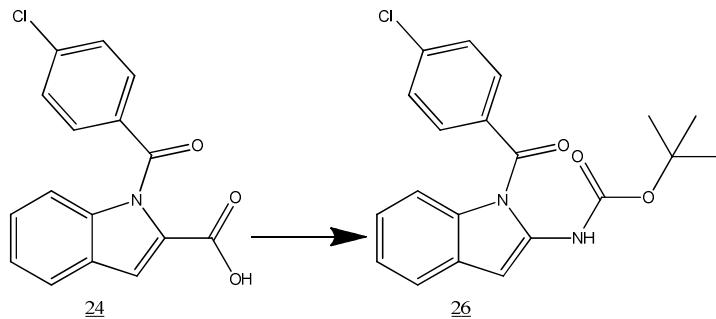
Mr (izračunana): 301,33

HR-MS: 300,0430 (izračunana: 300,0427)

Elementna sestava: C₁₆H₁₂CINO₃

4.7.5. SINTEZA TERC-BUTIL (1-(4-KLOROBENZOIL)-1H-INDOL-2-IL)KARBAMATA (26)

Reakcija:



Postopek:

V 50 ml bučko smo natehtali 78 mg (0,3 mmol) 1-(4-klorobenzoil)-1H-indol-2-karboksilne kisline (24), ki smo jo raztopili v 2 ml *terc*-butanola, ter dodali še 30 mg zdrobljenih molekulskih sit (4 Å). Po 10 min mešanja na sobni T smo po kapljicah dodali 0,4 µl (0,3 mmol) trietilamina. Po dodatnih 30 min mešanja smo dodali še 70 µl (0,3 mmol) DPPA ter vsebino bučke prepihali z argonom. Bučko smo prenesli na oljno kopel ter segrevali pri temperaturi refluksa (82°C). Po 20 h smo s TLC zaznali konec reakcije ter odpareli topilo pod znižanim tlakom. Spojino smo očistili s pomočjo kolonske kromatografije (MF 8 : Heksan/etilacetat : 9/1).

Rezultati:

Izgled: rumeni kristali

Izkoristek: 52,99 % (51 mg)

Rf: 0,54 (MF 8 : Heksan/etilacetat : 9/1; ninhidrin)

T_{tališča}: 73,1-76,7 °C

IR (cm⁻¹): 2917, 1730, 1671, 1592, 1499, 1455, 1364, 1310, 1250, 1144, 1088, 1053, 1014, 935, 886, 855, 835, 790, 736, 685, 647, 596

¹H-NMR (400 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm] = 1,58 (s, 9H, (-CH₃)₃), 6,39 (d, 1H, J= 7,6 Hz, indol-H), 6,86 – 6,89 (m, 1H, Ar-H), 7,14 – 7,16 (m, 1H, indol-H), 7,43 – 7,46 (m, 1H, indol-H), 7,50 -7,52 (m, 3H, indol-H in Ar-H), 7,68 – 7,69 (m, 2H, Ar-H), 9,07 (s, 1H, -NH-CO)

MS (ESI): 371,1 [M+H]⁺

Mr (izračunana): 370,11

HR-MS: 371,1160 (izračunana: 371,1162)

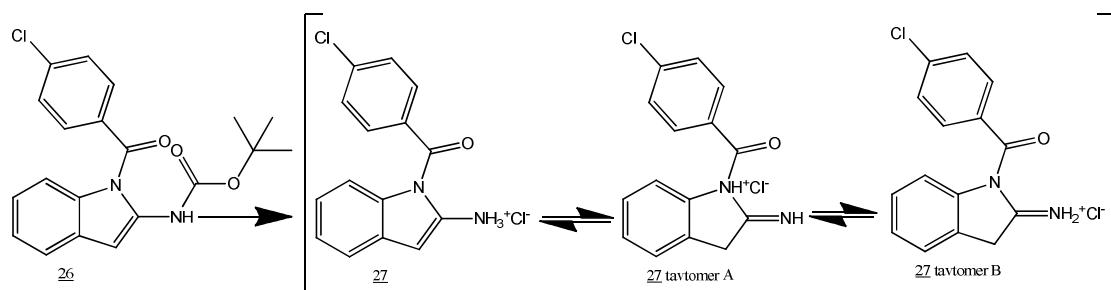
Elementna sestava: C₂₀H₁₉ClN₂O₃

Elementarna analiza za C₂₀H₁₉ClN₂O₃:

Izračunane vrednosti	C ₂₀ H ₁₉ ClN ₂ O ₃ x 0,25 C ₄ H ₁₀ O	Ugotovljene vrednosti
% C 64,43	% C 64,78	% C 64,51
% H 5,68	% H 5,57	% H 5,26
% N 7,51	% N 7,19	% 6,82

4.7.6. SINTEZA 1-(4-KLOROBENZOIL)-INDOLIN-IMINIJEVEGA KLORIDA (27)

Reakcija:



Postopek:

V 25 ml bučko smo natehtali 45 mg (0,1 mmol) *terc*-butil(1-(4-klorobenzoil)-1*H*-indol-2-il)karbamata (26) ter ga raztopili v 4 ml dietiletra. Bučko smo postavili na ledeno kopel, nato dodali 4 ml dietiletra, ki smo ga predhodno prepihalo s HCl, ter pustili reakcijo potekati na ledu. Po 1 h smo s TLC zaznali konec reakcije ter odpareli topilo pod znižanim tlakom. Vsebino bučko smo 4x suspendirali v 4 ml dietiletra ter ga odpareli. Nato smo dodali 4 ml dietiletra ter bučko postavili v hladilnik. Po 16 h je izpadel želeni produkt, ki smo ga odfiltrirali z odsesavanjem.

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 9,14 % (3 mg)

Rf: 0 (MF 8 : Heksan/etilacetat : 9/1; ninhidrin)

T_{tališča}: 129,3-132,2 °C

IR (cm⁻¹): zaradi nizkega izkoristka reakcije IR spektroskopije nismo izvajali

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3,57 (s, 1H, indolin-CH_{2A}), 3,80 (s, 1H, indolin-CH_{2B}), 6,90 – 6,91 (m, 1H, indol-H), 7,29 – 7,36 (m, 3H, indol-H), 7,62 – 7,65 (m, 2H, Ar-H), 8,03 – 8,05 (m, 2H, Ar-H), 10,18 (s, 1H, =NH tautomer A), 10,47 (s, 1H, -NH tautomer A), 11,34 (s, 1H, =NH₂ tautomer B) ?*

MS (ESI): 543,0 [2M-Cl]⁺ (dimer!)

Mr (izračunana): 271,27

HR-MS: Ni izračunana!

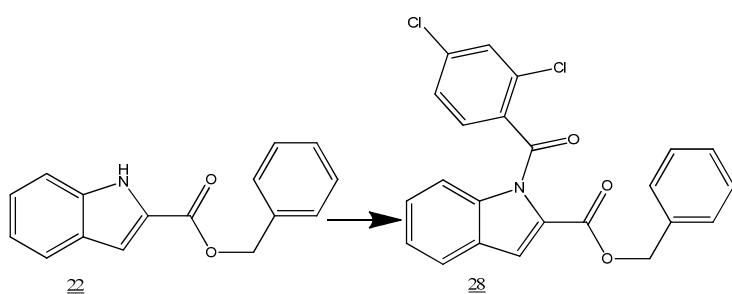
Elementna sestava: C₁₅H₁₂Cl₂N₂O

?* Kot končen produkt najverjetno dobimo zmes dveh tautomernih oblik, vendar zaradi nestabilnosti ne moremo z gotovostjo potrditi strukture.

4.8. SINTEZA 1-(2,4-DIKLOROBENZOIL)INDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (31)

4.8.1. SINTEZA BENZIL 1-(2,4-DIKLOROBENOZIL)1H-INDOL-2-KARBOKSILATA (28)

Reakcija:



Postopek:

V 50 ml bučko smo natehtali 2,2 g (9,0 mmol) benzil 1*H*-indol-2-karboksilata (22) ter ga raztopili v 32 ml THF. V reakcijsko zmes smo dodali še 455 mg (0,1 eq; 0,9 mmol) kronskega etra (18-Crown-6) ter 1,4 g (1,4 eq; 12,5 mmol) kalijevega *terc*-butokksida. Vsebino bučko smo najprej mešali 15 min na sobni T, nato pa bučko prestavili na ledeno kopel, do ohladitve na 0 °C. Nato smo po kapljicah dodali 2,3 mg (1,2 eq; 10,8 mmol) 2,4-diklorobenzoilklorida, raztopljenega v 20 ml THF. Po dodatku smo bučko odstavili iz

ledene kopeli. Po 24 h smo s TLC zaznali konec reakcije, prekinili reakcijo ter topilo odpareli pod znižanim tlakom. Suh preostanek smo raztopili v 100 ml diklorometana, ga prenesli v lij ločnik ter spirali s 60 ml destilirane vode. Organsko fazo smo posušili s sušili nad Na₂SO₄ ter topilo odpareli. Produkt smo očistili s pomočjo kolonske kromatografije (MF 8 : Heksan/etilacetat : 9/1).

Rezultati:

Izgled: rumeni kristali

Izkoristek: 19,10 % (740 mg)

Rf: 0,34 (MF 8 : Heksan/etilacetat : 9/1)

T_{tališča}: 71,1-75,1 °C

IR (cm⁻¹): 1717, 1694, 1581, 1366, 1311, 1257, 1240, 1207, 1191, 1159, 1120, 1097, 1047, 1022, 997, 925, 871, 828, 745, 720, 693, 573

¹H-NMR (400 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm] = 5,06 (s, 2H, -CH₂-Ar), 7,24 – 7,25 (m, 2H, -CH₂-Ar-H), 7,44 – 7,50 (m, 7H, indol-H in Ar-H), 7,63 (s, 1H, indol-H), 7,82 – 7,85 (m, 3H, Ar-H)

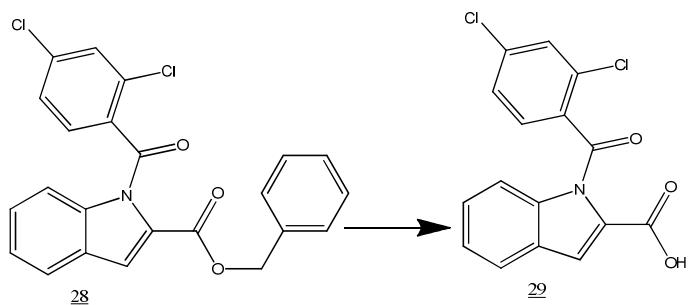
MS (ESI): 424,1 [M+H]⁺

Mr (izračunana): 423,42

HR-MS: 424,0512 (izračunana: 424,0507) **Elementna sestava:** C₂₃H₁₅NO₃Cl₂

4.8.2. SINTEZA 1-(2,4-DIKLOROBENZOIL)-1H-INDOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (29)

Reakcija:



Postopek:

V 50 ml dvogrlo bučko smo natehtali 316 mg (0,7 mg) benzil 1-(2,4-diklorobenzoil)-1H-indol-2-karboksilata (28) ter dodali 30 ml etanola in 5 ml THF. Reakcijsko zmes smo nato preprihovali z argonom 10 min, nato pa dodali konico paladija na ogljiku ter zmes

prepihovali z vodikom. Po 90 min smo s TLC zaznali konec reakcije ter reakcijo prekinili. Paladij smo odfiltrirali, topilo pa odpareli pod znižanim tlakom.

Rezultati:

Izgled: roza kristali

Izkoristek: 79,05 % (196 mg)

Rf: 0,18 (MF 9 : Heksan/etilacetat : 9/1 + 1% ocetne kisline; bromkrezolno zeleno)

T_{tališča}: 105,7-109,1 °C

IR (cm⁻¹): 3892, 1708, 1633, 1483, 1376, 1263, 1215, 1158, 1092, 1016, 914, 826, 744, 693, 677, 677, 621, 597, 582, 557

¹H-NMR (400 MHz, DMSO – d₆): δ [ppm] = 7,37 – 7,41 (m, 2H, indol-1H), 7,43 – 7,44 (m, 1H, indol-H), 7,49 - 7,53 (m, 2H, indol-H), 7,79 - 7,82 (m, 2H, Ar-H), 7,93 – 7,95 (m 1H, Ar-H), 13,35 (s, 1H, -COOH)

MS (ESI): 331,9 [M-H]⁻

Mr (izračunana): 333,25

HR-MS: 331,9884 (izračunana: 331,9881)

Elementna sestava: C₁₆H₉Cl₂NO₃

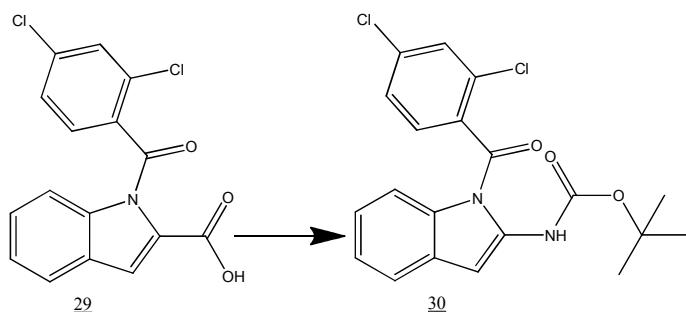
Elementna analiza za C₁₆H₉Cl₂NO₃:

Izračunane vrednosti	C ₁₆ H ₉ Cl ₂ NO ₃ x 0,6H ₂ O	Ugotovljene vrednosti
% C 57,51	% C 55,71	% C 55,71
% H 2,71	% H 2,98	% H 2,57
% N 4,19	% N 4,06	% N 3,65

* Vsebnost vode je vidna že na NMR spektru.

4.8.3. SINTEZA TERC-BUTIL (1-(2,4-DIKLOROBENZOIL)1H-INDOL-2-IL)KARBAMATA (30)

Reakcija:



Postopek:

V 50 ml bučko smo natehtali 172 mg (0,5 mmol) 1-(2,4-diklorobenzoil)-1H-indol-2-ikarboksilne kisline (29), ki smo jo raztopili v 8 ml *terc*-butanola, ter dodali še 50 mg

zdrobljenih molekulskeh sit (4 Å). Po 10 min mešanja na sobni T smo po kapljicah dodali 85 µl (0,6 mmol) trietilamina. Po dodatnih 30 min mešanja smo dodali še 138 µl (0,6 mmol) DPPA ter vsebino bučke prepigli z argonom. Bučko smo prenesli na oljno kopel ter segrevali pri temperaturi refluksa (82 °C). Po 24 h smo s TLC zaznali konec reakcije ter odpareli topilo pod znižanim tlakom. Spojino smo očistili s pomočjo kolonske kromatografije (MF 8 : Heksan/etilacetat : 9/1).

Rezultati:

Izgled: oranžni kristali

Izkoristek: 43,07 % (89 mg)

Rf: 0,29 (MF 8 : Heksan/etilacetat : 9/1; ninhidrin)

T_{tališča}: 108,2-111,2 °C

IR (cm⁻¹): 2977, 2169, 1729, 1674, 1585, 1505, 1457, 1367, 1330, 1304, 1243, 1148, 1100, 1053, 1024, 964, 938, 886, 853, 825, 783, 741, 687, 643, 603

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1,55 (s, 9H, (-CH₃)₃), 6,04 – 6,06 (m, 1H, indol-H), 6,82 – 6,86 (m, 1H, Ar-H), 6,94 (s, 1H, Ar-H), 7,12 – 7,15 (m, 1H, indol-H), 7,40 – 7,42 (m, 1H, indol-H), 7,43 – 7,45 (m, 2H, indol-H), 7,57 - 7,58 (m, 1H, Ar-H), 9,63 (s, 1H, -NH-CO)

MS (ESI): 405,1 [M+H]⁺

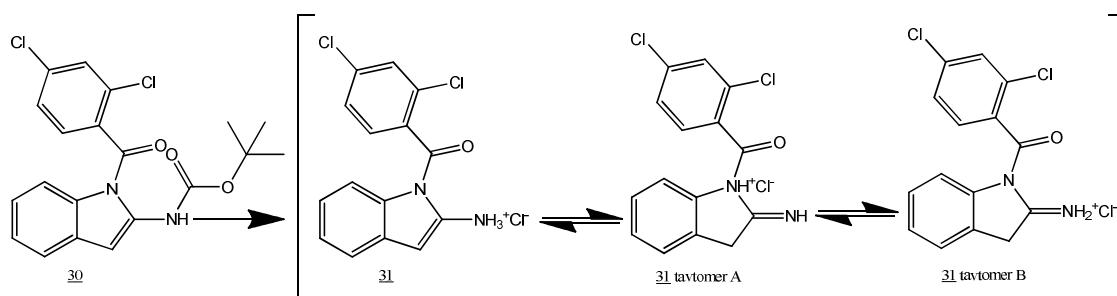
Mr (izračunana): 404,37

HR-MS: 405,0778 (izračunana: 405,0773)

Elementna sestava: C₂₀H₁₈Cl₂N₂O₃

4.8.4. SINTEZA 1-(2,4-KLOROBENOZIL)INDOLIN-2-IMINIJEVEGA KLORIDA (31)

Reakcija:



Postopek:

V 25 ml bučko smo natehtali 46 mg (0,1 mmol) *tert*-butil(1-(2,4-diklorobenzoil)-1*H*-indol-2-il)karbamata (31) ter ga raztopili v 6 ml dietiletra. Bučko smo postavili na ledeno kopel

za 10 min, nato dodali 4 ml dietiletra, ki smo ga predhodno prepihali s HCl, ter pustili reakcijo potekati na ledu. Po 2 h smo s TLC zaznali konec reakcije ter odpareli topilo pod znižanim tlakom. Vsebino bučko smo 4x suspendirali v 4 ml dietiletra ter ga odpareli. Nato smo dodali 4 ml dietiletra ter bučko postavili v hladilnik. Po 16 h je izpadel želeni produkt, ki smo ga odfiltrirali z odsesavanjem.

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 11,49 % (4 mg)

Rf: 0 (MF 8 : Heksan/etilacetat : 9/1; ninhidrin)

T_{tališča}: 139,5 - 144,3 °C

IR (cm⁻¹): zaradi nizkega izkoristka reakcije IR spektroskopije nismo izvajali

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3,57 (s, 1H, indolin-CH_{2A}), 3,89 (s, 1H, indolin-CH_{2B}), 6,90 – 6,92 (m, 1H, indol-H), 7,15 – 7,23 (m, 1H, indol-H), 7,29 – 7,33 (m, 2H, indol-H), 7,61 – 7,64 (m, 1H, Ar-H), 7,69 – 7,76 (m, 2H, Ar-NH), 9,85 (s, 1H, =NH_{tautomer A}), 10,10 (s, 1H, -NH_{tautomer A}), 10,51 (s, 1H, =NH_{2 tautomer B}) ?*

MS (ESI): 306,0 [M-Cl]⁻

Mr (izračunana): 341,62

HR-MS: Ni izračunana!

Elementna sestava: C₁₅H₁₂Cl₃N₂O

?* Kot končen produkt najverjetno dobimo zmes dveh tautomernih oblik, vendar zaradi nestabilnosti ne moremo z gotovostjo potrditi strukture.

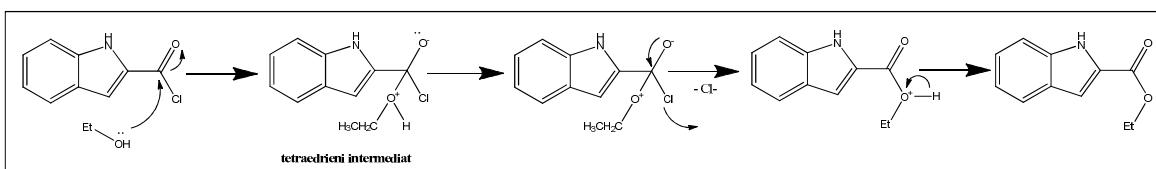
5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. SINTEZNI POSTOPKI

Tekom eksperimentalnega dela diplomske naloge smo uspešno sintetizirali 6 končnih spojin, v obliki 2-aminoindolov oziroma 2-iminoindolinov, saj je prišlo do tautomerije. Reakcijska pot je bila sestavljena iz petih sinteznih stopenj. V nadaljevanju bomo povzeli sintezne postopke, ki smo jih izvedli, in jih primerjali glede na načrtovanje različnih končnih spojin.

5.1.1. ZAŠČITA TER ODŠČITA INDOL-2-KARBOKSILNE KISLINE

Pri sintezi spojin smo izjahali iz indol-2-karboksilne kisline, ki ima dve reaktivni funkcionalni skupini (karboksilno kislino ter šibko bazičen dušik). Ker smo pri samem načrtovanju želeli na indolni dušik vezati različne substituente, smo morali karboksilno kislino ustrezno zaščititi ter tako zagotoviti selektiven potek reakcije. V prvi stopnji smo izhodno indol-2-karboksilno kislino zaščitili v obliki estra, in sicer etilnega estra. Estri veljajo za splošno uporabljeno zaščito za karboksilne kisline, zanje pa velja, da zlahka hidrolizirajo v alkalnem. Prav zaradi enostavne odščite in splošno uveljavljene reakcije smo se odločili za takšno obliko zaščite. Reakcijo O-aciliranja smo izvedli s tionil kloridom ter etanolom kot nukleofilom. Najprej smo *in situ* tvorili reaktivnejši kislinski klorid, katerega karbonilna skupina je bolj polarizirana in omogočili lažji nukleofilni napad etanola, kjer pride do nukleofilne substitucije. (Slika 14)

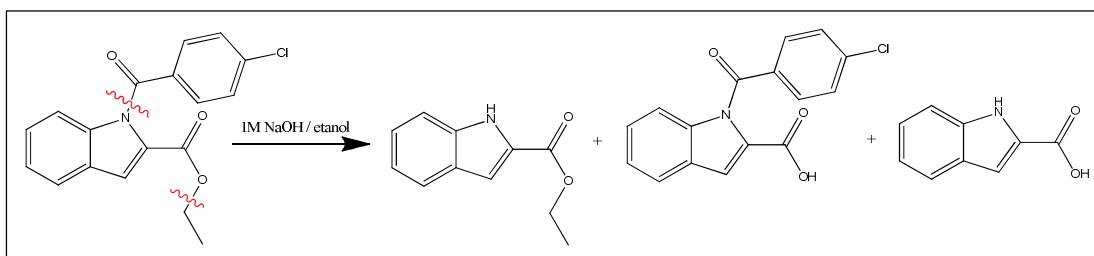


Slika 14 : Reakcija nukleofilne substitucije pri zaščiti indol-2-karboksilne kisline

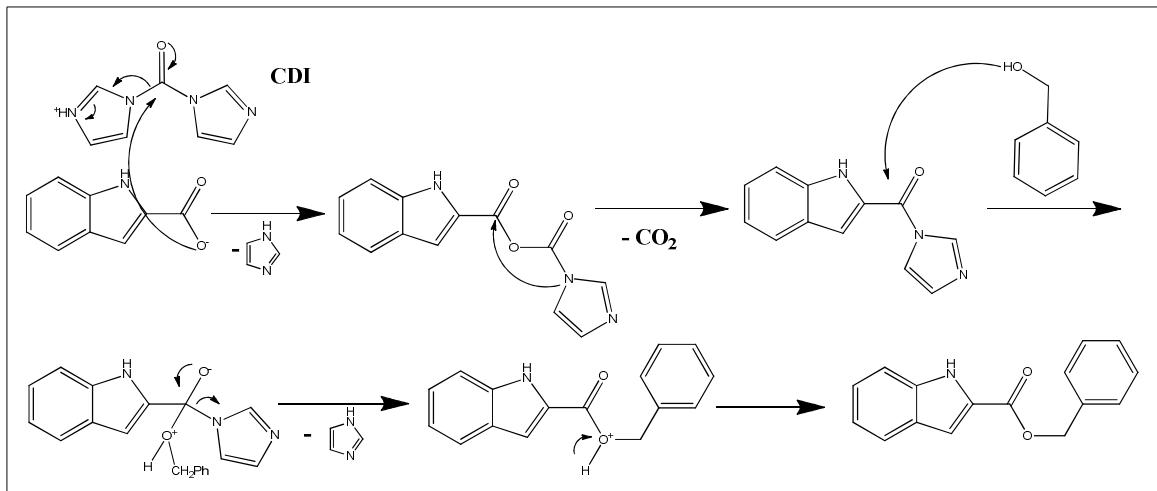
Po uvedbi različnih substituentov na indolni dušik smo odščito na karboksilni skupini odstranili. Poslužili smo se klasične odščite v alkalnem - 1M KOH ter etanol (54), ki se je izkazala za relativno dobro izbiro.

Izbrana odščita in zaščita karboksilne kisline sta bili odlična izbira za benzilne substituente na dušiku, nekoliko manj za fenilsulfonilne (izolacija s kolonsko kromatografijo) ter nikakor za benzoilne. Pri slednjih je pri odščiti etilnega estra v

prisotnosti 1M KOH/etanol prišlo tudi do hidrolize amidne skupine med indolnim in fenilnim obročem, dobili smo zmes treh produktov. (Slika 15) Karboksamidi so stabilne spojine, zato amidna vez načeloma hidrolizira pri daljšem segrevanju pod ostrejšimi pogoji v kislem ali alkalnem, vendar je v našem primeru prišlo do kisle hidrolize brez segrevanja, saj je negativni mezomerni efekt fenilne skupine doprinesel k večji reaktivnosti (35). Zato smo se odločili za alternativno metodo zaščite karboksilne skupine v obliki benzilnega estra. Tudi ta zaščita spada med splošne zaščite karboksilne kislino, vendar jo lahko selektivno odstranimo s katalitskim hidrogeniranjem, kar pa ne vpliva na amidno vez. Zaščito benzilne skupine smo izvedli s sklopitvenim reagentom karbonildiimidazolom (CDI), benzilnim alkoholom ter THF kot topilom. (Slika 16) CDI je selektivno aktiviral karboksilno kislino, v nadaljevanju pa je prišlo do O-aciliranja benzilnega alkohola (63).



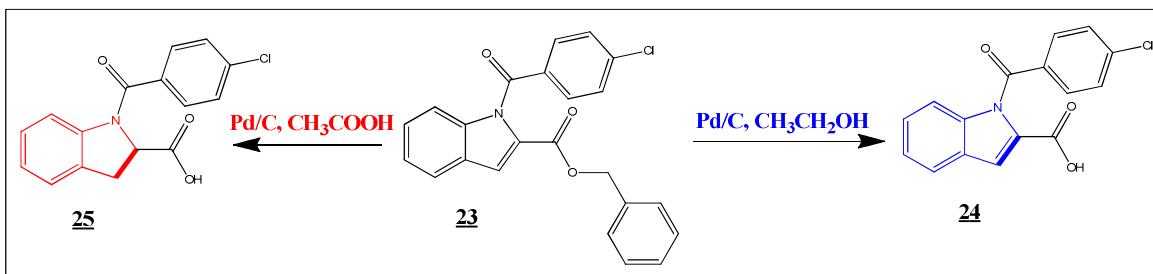
Slika 15: Hidroliza vezi



Slika 16: Zaščita kislino v obliki benzilnega estra

Po uvedbi benzoilne skupine na indolni dušik smo benzilno zaščito iz karboksilne kislino odstranili s katalitskim hidrogeniranjem (paladij na ogljiku/H₂). Sintezni postopek naveden v patentu smo nekoliko spremenili in kot topilo uporabili ocetno kislino ozziroma etanol, namesto dimetilformamida in etanola (63). Pri tem smo opazili, da lahko s samim topilom vplivamo na potek reakcije in končno spojino. Če kot topilo uporabimo ocetno

kislino, gre reakcija v smeri nastanka derivata indolin-2-karboksilne kisline, pri uporabi etanola kot topila pa v smeri derivata indol-2-karboksilne kisline, vendar samo v primeru 4-klorobenzoilnega substituenta na indolnem dušiku. (Slika 17)



Slika 17 : Vpliv topila pri katalitskem hidrogeniranju

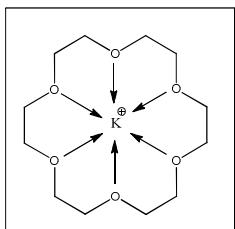
Obe izbrani topili sta polarni protični topili, vendar smo kot prvo izbiro izbrali ocetno kislino, predvsem zaradi njene dielektrične konstante (dobro raztaplja polarne in nepolarne spojine) (35) ter hitrejšega poteka reakcije (64). Z eksperimentalnim delom smo potrdili začetno hipotezo, da se obe spojini z benzoilnima substituentoma bolje topita v ocetni kislini, saj smo morali pri etanolu dodati še kakšen mililiter THF ali pa bučko segrevati, da sta se obe spojini raztopili. Za vpliv topila na hitrost reakcije pa lahko zaključimo, da je v našem primeru katalitsko hidrogeniranje prej poteklo v etanolu (20 min) kot ocetni kislini (2 h).

5.1.2. UVAJANJE SUBSTITUENTOV NA INDOLNI DUŠIK

Za uvajanje substituentov na indolni obroč obstaja kar nekaj sinteznih postopkov, ki ponavadi vključujejo bazo (NaOH) v polarnem aprotičnem topilu. Znane so še reakcije z uporabo n-butillitija v THF, tetraalkilamonijevih soli ali pa kronskeih etrov (65). Slednjih smo se poslužili mi z uporabo že poznanega sinteznega postopka Silvestri in sodelavcev (54). Etil 1H-indol-2-karboksilatu (1) smo na sobni temperaturi dodali kronske eter (18-Crown-6) ter kalijev *terc*-butoksid, raztopljen v THF, po aktivaciji pa na ledeni kopeli uvedli ustrezni substituent (sulfonilni ali benzoilni). Reakcija je v nadaljevanju potekala na sobni temperaturi kar 48 h, kar je dlje od predpisanega postopka v literaturi.

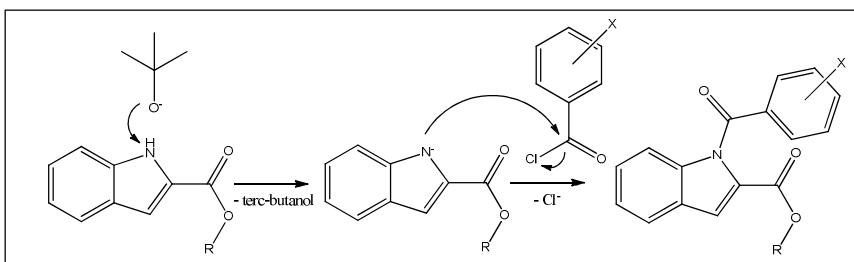
Kalijev *terc*-butoksid smo raztopili na sobni T, saj je njegova topnost v THF pod 0°C zelo slaba (66). Po dodatku kronskega etra (18-Crown-6) pride do tvorbe kompleksa [K(18-Crown-6)], saj ima 18-Crown-6 visoko afiniteto do kalijevega kationa (66). Struktura kronskega etra oziroma makrocikličnega polietra z 18 atomi v obroču določa afiniteto za kalijeve ione. (Slika 18) Kronske etre uvrščamo med katalizatorje faznega

prenosa, saj povečajo topnost soli s kationi v polarnih aprotičnih topilih (na primer THF), kjer nukleofilne substitucije lažje potekajo. S tem se poveča koncentracija ustreznih anionov, pospeši reakcijo v heterogenem sistemu, doseže višji izkoristek, izognemo se nastanku stranskih produktov ter dodatnim stroškom z nakupom dražjih topil (67).



Slika 18: Kompleks 18-Crown-6 in K^+ kation

Reakcija vezave substituentov na indolni dušik poteka najverjetneje po $\text{Sn}2$ (nukleofilna substitucija) mehanizmu (35). Najprej s pomočjo baze, kalijevega *terc*-butoksida, odcepimo proton na dušiku in ga tako pretvorimo v dober nukleofil, nato pa dušik aciliramo/sulfoniramo z ustreznim substituentom (kislinski klorid v primeru benzoilne skupine, benzensulfonil klorid v primeru sulfonilne skupine). (Slika 19)



Slika 19: N-aciliranje indolnega dušik

N-alkiliranje indola pa smo poiskusili še v prisotnosti cezijevega karbonata ali kalijevega karbonata v acetolu. Slednja sta se izkazala kot dobri bazi za N-alkiliranje $1H$ -indolov (67), vendar samo takrat, ko so bili indoli aktivirani z elektron privlačno skupino (65). V preteklih raziskavah je bilo opaženo, da je za N-alkiliranje boljše topilo ciklična sečnina (DMPU) in da je cezijev karbonat primernejša baza za sintezo, saj kalijev karbonat daje slabši izkoristek, reakcija pa traja dalj časa (65). Pri uvajanju 4-fluorobenzil bromida in 4-klorobenzil klorida na $1H$ -indol teh razlik nismo opazili, saj je bil izkoristek zelo primerljiv (okoli 70%), reakcija pa je trajala 16 - 18 h. Predvidevamo, da je ponovno šlo za nukleofilno substitucijo, kjer najprej z bazo odcepimo proton, indolni dušik spremenimo v boljši nukleofil, nato ga pa alkiliramo z benzilnim halogenidom, ki je dober elektrofil.

Na indolni obroč smo vezali 8 različnih substituentov, med njimi dva kislinska klorida, dva sulfonil klorida in štiri benzil halogenide (brom in klor).

Zaradi elektron privlačnega efekta Cl atoma so kislinski kloridi dobri elektrofili. Kloridni ion prispeva, da postane karbonilni ogljikov atom bolj elektro pozitiven in nanj lažje poteka nukleofilna adicija. Kislinski kloridi so izredno reaktivni in agresivni, zato smo z njimi rokovali izključno v digestoriju (35). Pri delu smo morali sami sintetizirati 2,4-diklorobenzoil klorid, saj omenjenega reagenta nismo imeli. Uporabili smo klasičen sintezni postopek za sintezo kislinskih kloridov z uporabo oksalil klorida. Kot topilo smo uporabili DKM in dodali 2 kapljici DMF, ki je služil kot katalizator. Oksalil klorid smo dodali na ledeni kopeli, nato pa reakcijsko zmes segrevali pri temperaturi refluksa s povratnim hladilnikom. Prebitnega oksalil klorida smo se po končani reakciji znebili z etrom, saj skupaj tvorita azeotropno zmes in tako vre pri nižji temperaturi.

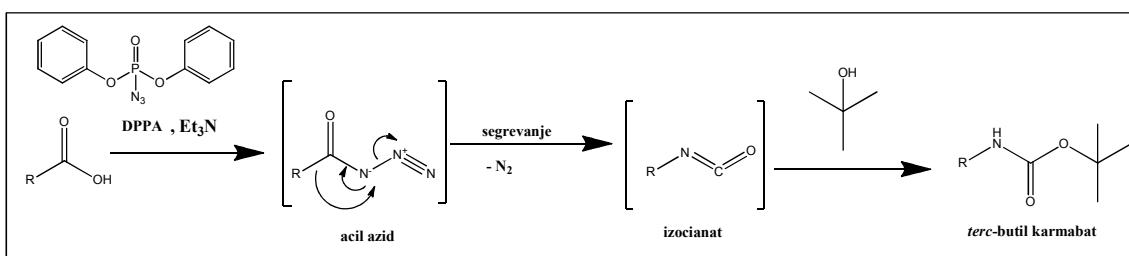
Sulfonilkloridi so manj reaktivni od predhodnih kislinskih kloridov. Zanje je značilno, da so slabo topni v vodi, in da se večinoma nahajajo v trdni obliki. Pri delu smo uporabili dva sulfonil klorida, eden je bolj poznan pod imenom tozil klorid in se pogosto uporablja za zaščito -OH skupin. Za vezavo na indolni obroč smo uporabili znan sintezni postopek (54), le da je reakcija trajala dlje, v povprečju 20 h. Po vezavi sta nastala sulfonamida, ki pa sta bila manj reaktivna od karboksamidov. Nukleofilni napad žvepla je tukaj oviran z vseh strani, saj sama SO₂ skupina, ki je elektron privlačna skupina, nudi resonančno stabilizacijo.

Najmanj reaktivno povezovalno vez (metilensko) pa dobimo z uvedbo benzil halogenida. Benzil halogenidi so zelo reaktivni substrati, saj tvorijo stabilne karbokatione, ki so ključni pri reakcijah Sn1. Karbokation tako ni lokaliziran na benzilni ogljikov atom, kar zmanjša skupno energijo in poveča stabilnost. Pri sinteznem postopku smo uporabili dva benzil bromida. Benzil bromid je bolj reaktivni od benzil klorida, zato reakcija Sn2 hitreje poteka z benzilnim bromidom. Razlog je v tem, da čim slabša baza je halogenidni ion, tem hitreje se odcepi. Dodatno bi lahko na hitrost reakcije vplivali še s polarnim protičnim topilom, vendar smo zaradi topnosti izbrali aprotično topilo (THF), kjer je slabša solvatacija in posledično daljša reakcija. Po uvedbi benzil halogenida dobimo za distančnik metilensko skupino, ki ni občutljiva na hidrolizo ali katalitsko hidrogeniranje, zato bi za spojine z benzilnimi funkcionalnimi skupinami lahko uporabili obe oblike zaščite karboksilne kisline.

5.1.3. UVEDBA *terc*-BUTIL KARBAMATNE SKUPINE TER

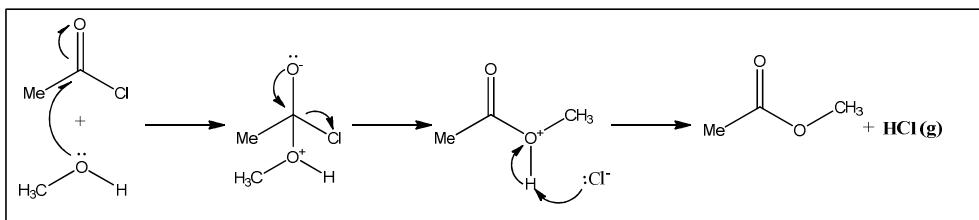
NJENA ODŠČITA DO AMINA

V četrti stopnji smo karboksilno kislino direktno pretvorili v *terc*-butil karbamatno skupino s sinteznim postopkom Jia in sodelavci (71). Reakcija poteče preko Curtiusove premestitve do karbamata, z uporabo DPPA kot kislinskega aktivatorja, trietylamina kot baze (72) in *terc*-butanolja kot nukleofila. (Slika 20) Karboksilna kislina reagira z DPPA v prisotnosti baze, pri čemer nastane acil azid, ki je pod vplivom topote podvržen Curtiusovi premestitvi direktno do izocianata. Z dodatkom *terc*-butanolja v nadaljevanju dobimo karbamat, natančneje *terc*-butil karbamat (73). *terc*-butil karbamat je tudi odlična zaščita za aminsko skupino, saj so amini odlični nukleofili in ob prisotnosti močnih radi reagirajo.



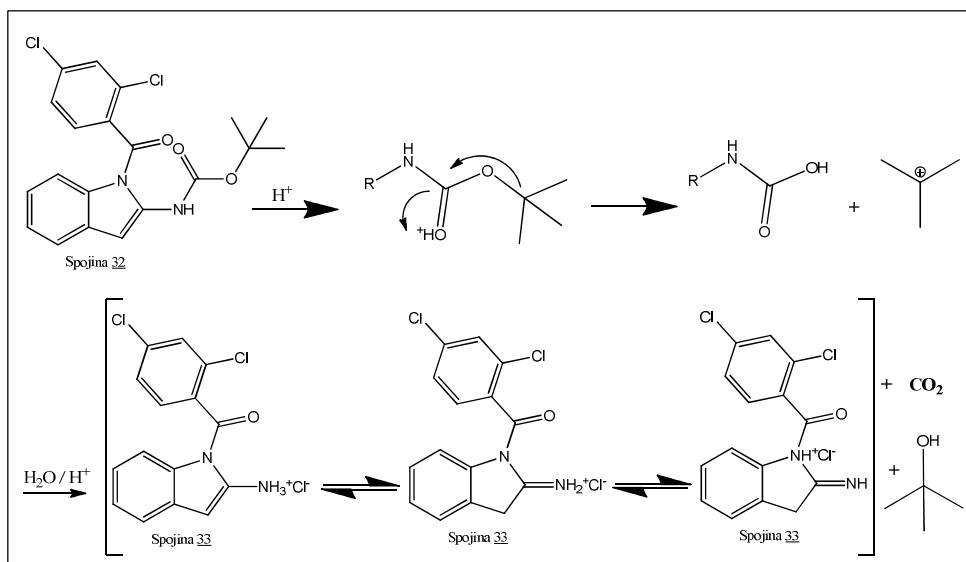
Slika 20: Uvedba *terc*-butil karbamatne skupine na karboksilno kislino

V zadnji stopnji sinteze smo BOC zaščito odstranili. Karbamati se selektivno odstranjujejo z acidolizo (naprimer s plinastim HCl v topilu ali s trifluoroacetno kislino), mi pa smo med drugim uporabili tudi prirejen postopek odščite s HCl v etru pri 0 °C (74). V bučko smo metanolu dodali acetilklorid, ki je z njim reagiral, pri čemer je *in situ* nastal vodikov klorid. Reakcija nastanka vodikovega klorida je potekla v dveh korakih, pri čemer smo jo zaradi njene eksotermnosti morali izvajati na ledeni kopeli. V prvem koraku pride do nukleofilnega napada na elektropozitivni karbonilni ogljikov atom s strani prostega elektronskega para na kisiku v molekuli metanola. V drugem koraku pa se najprej tvori vez med ogljikom in kisikom, ki izpodrine kloridni ion, nato pa še kloridni ion odstrani proton in nastane vodikov klorid. Kot produkt pri reakciji nastaja še metil acetat. (Slika 21)



Slika 21: Nastanek HCl (g) *in situ*

Kot alternativno metodo smo uporabili eter prepahan s HCl (g), ki smo dodali našim spojinam BOC zaščitenim spojinam, kar je povzročilo odščito aminske skupine ter nastanek soli. (Slika 22) Reakcija odščite je potekla popolno, saj na TLC ploščici nismo več zaznali izhodne spojine, temveč samo sol. Vendar je bil izkoristek reakcije slab zaradi samega postopka izolacije (največji izkoristek je bil 41,77 % za spojino 17), izobarjanja iz etra pri nizki temperaturi (0°C). Razlog za slabši izkoristek je v nizki začetni masi BOC zaščitenih spojin, zagotavljanju nasičene raztopine za kristalizacijo pri tako nizki masi ter seveda kvantitativnim izgubam pri filtriranju suspenzije s presesavanjem.



Slika 22: Odščita BOC zaščite (Spojina 33)

Naše končne spojine smo tako sintetizirali v obliki soli, saj so amini največkrat nestabilni, podvrženi avtoksidaciji (40) in hidrolizi (43). S tem smo aminsko skupino zaščitili, izboljšali stabilnost spojin, njihovo topnost ter si olajšali izolacijo produktov. Kot smo predvidevali so naše končne spojine v obliki bolj stabilnih tautomerov 2-iminoindolinov. Tega pa z gotovostjo ne moremo trditi za spojini 27 in 33, kjer predvidevamo, da smo dobili zmes dveh tautomernih oblik (dejansko so možno 3 tautomerne oblike). (Slika 22)

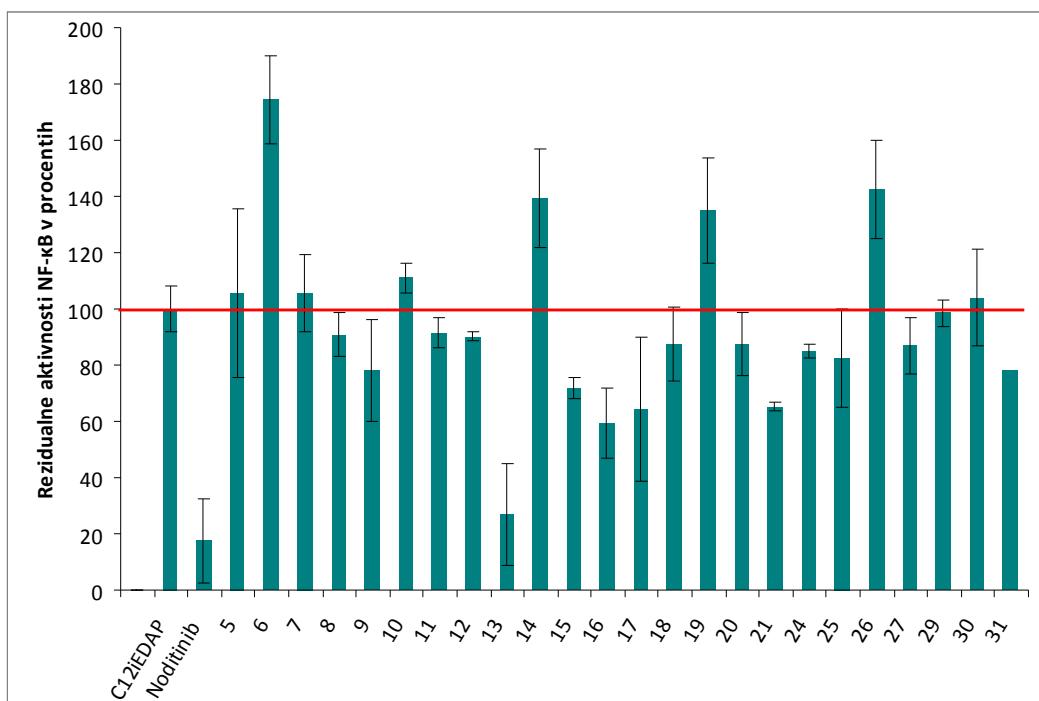
5.2. TESTIRANJE ZAVIRALNE AKTIVNOSTI SPOJIN

Med samim raziskovalnim delom smo dali narediti preliminarni test s katerim smo ugotavljali aktivnost že sintetiziranih spojin. Na podlagi 2 meritev na celični liniji Ramos-Blue™ smo na grobo ovrednotili potencialne spojine oziroma ugotovili v sintezi katerih spojin bi se še usmerili. Glede na agonist NOD1 TriDAP (10 µM) ter pozitivno kontrolo

(poznan zaviralec NOD1 Noditinib, ki smo ga sintetizirali na Katedri za farmacevtsko kemijo) so svojo zaviralno aktivnost izkazovale spojine: 7, 8, 9 in 19.

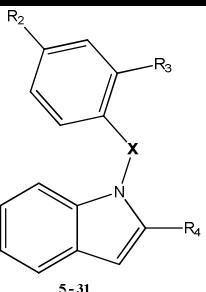
Po celotnem eksperimentalnem delu pa je bilo ponovno izvedeno testiranje na isti celični liniji. Ramos-BlueTM je linija limfocitov B, ki izražajo receptorje NOD1 in vsebujejo gen za "izločeno zarodno alkalno fosfatazo" (secreted embryonic alkaline phosphatase- SEAP), ki je inducibilen z NF-κB. Zaviralci receptorjev NOD1 v teh celicah zmanjšajo izražanje NF-κB, kar ima za posledico zaviranje transkripcije in translacije encima SEAP, ki je okrnjena oblika placentne alkalne fosfataze. Ta encim celice izločajo v supernatant in ga lahko enostavno pomerimo z reagentom QUANTI-BlueTM, ki ob reakciji z alkalnimi fosfatazami spremeni barvo iz rožnate v vijolično-modro (75).

Pri končnem testiranju, so bile celice stimulirane s C12iEDAP (5 µM) in Noditinibom (25 µM) ali našimi spojinami (25 µM). Po stimulaciji z reagentom QUANTI-BlueTM v supernatantu celičnega medija je bila spektrofotometrično pomerjena koncentracijo encima SEAP, s čimer je bila posredno izmerjena aktivnost NF-κB. Negativna kontrola so bile celice z dodanimi vsemi reagenti razen zaviralca. Vsem meritvam smo odšteli vrednost meritve pripadajočega slepega vzorca, ki je vseboval vse komponente vzorca razen celic. Naše rezultate testiranj smo podali kot procent rezidualne aktivnosti NF-κB glede na C12iEDAP, ki smo mu pripisali 100% aktivnost. (Priloga 1) (Grafikon 1) (Preglednica III)



Grafikon 1: Rezidualne aktivnosti NF-κB v celicah Ramos-BlueTM ob dodatku zaviralcev NOD1

Preglednica III: SAR analiza ligandov NOD1 z indolnim skeletom



5-31

Spojina	R2	R3	R4	X	RA [%]
<u>5</u>	NO ₂	H	NH ₃	CH ₂	105,83
<u>6</u>	H	H	COOEt	CH ₂	174,53
<u>7</u>	H	H	COOH	CH ₂	105,43
<u>8</u>	H	H	NHBoc	CH ₂	90,65
<u>9</u>	H	H	NH ₃	CH ₂	78,06
<u>10</u>	Cl	H	COOEt	CH ₂	111,11
<u>11</u>	Cl	H	COOH	CH ₂	91,42
<u>12</u>	Cl	H	NHBoc	CH ₂	90,28
<u>13</u>	Cl	H	NH ₃	CH ₂	26,87
<u>14</u>	F	H	COOEt	CH ₂	139,40
<u>15</u>	F	H	COOH	CH ₂	71,65
<u>16</u>	Me	H	COOEt	SO ₂	59,22
<u>17</u>	Me	H	CONHNH ₂	SO ₂	64,29
<u>18</u>	Me	H	COOH	SO ₂	87,37
<u>19</u>	Me	H	NHBoc	SO ₂	134,94
<u>20</u>	Me	H	NH ₃	SO ₂	87,72
<u>21</u>	F	H	COOEt	SO ₂	65,22
<u>24</u>	Cl	H	COOH	CO	84,99
<u>25</u>	Cl	H	COOH*	CO	82,50
<u>26</u>	Cl	H	NHBoc	CO	142,54
<u>27</u>	Cl	H	NH ₃	CO	86,97
<u>29</u>	Cl	Cl	COOH	CO	98,51
<u>30</u>	Cl	Cl	NHBoc	CO	104,05
<u>31</u>	Cl	Cl	NH ₃	CO	78,35

* indolin

Nobena izmed spojin v obliki karbamata ni izkazovala aktivnosti oziroma so izkazovale celo paradoksnogagonistično delovanje (najboljši agonist med karbamati je spojina 26). Tudi spojine v obliki estra so bile tako odlični agonisti, prav tako pa so se izkazale kot dobri zaviralcji. Zaviralo aktivnost sta izkazovali dve spojini, in sicer spojina 16 in spojina 21. Spojina 16 se je izkazala kot dokaj močan zaviralec, z rezidualno aktivnostjo 59,22 %. K aktivnosti je pripomogla elektron donorska skupina na mestu 4 aromatskega obroča - metilna skupina ter distančnik (sulfonilna skupina), saj so tudi ostale spojine iz te serije, razen karbamatne oblike, izkazovale dobro zaviralo aktivnost. Spojina 21 je izkazovala malce slabšo rezidualno aktivnost (65,22 %), zato menimo, da fluor na mestu 4 aromatskega obroča nekoliko zmanjša aktivnost. Še vedno pa je viden pozitiven vpliv sulfonilnega substituenta na indolu. Najmočnejši agonist v naši seriji spojin, ki spada v skupino estrov, je spojina 6, ki je imela kar 174,53 % aktivnost ter celo dodatno ojačala

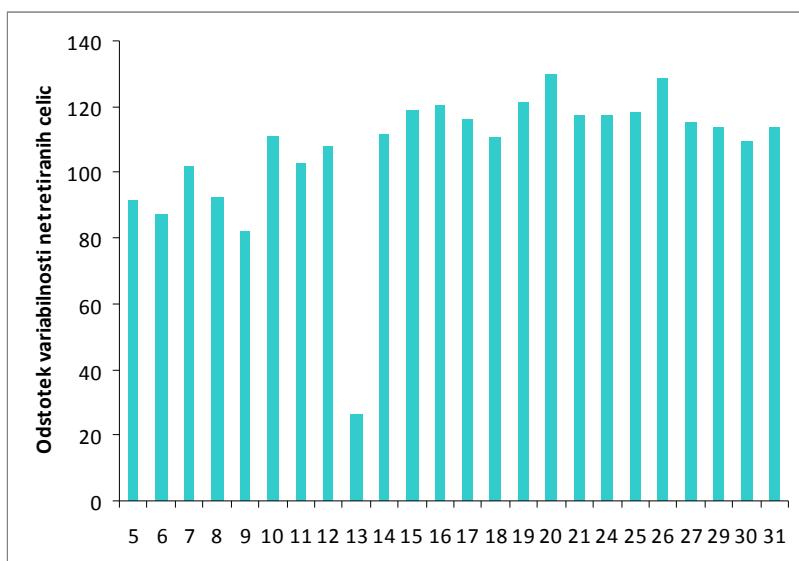
delovanje C12-iEDAP. Sklepamo, da se spojina 6 veže na alosterično mesto receptorja NOD1, kar se odraža v spremembni aktivnosti receptorja NOD1. Agonistično aktivnost spojine 6 smo dokazali tudi z dodatnim testom brez prisotnosti C12-iEDAP. K njenemu delovanju prispeva distančnik - metilenska skupina, ki se je že v seriji benzimidazolnih zaviralcev NOD1 izkazala kot slabša izbira za rezidualno aktivnost liganda (19). Šibko zaviralno delovanje na NOD1 so imele vse karboksilne kisline z rezidualno aktivnostjo okoli 90%, vendar ta razlika ni bila signifikantna. Še najboljši zaviralec je spojina 15 z aktivnostjo 71,65 %. Dober zaviralec glede na ostale spojine pa je bila tudi spojina 17, ki je edina v obliki hidrazida. Le-ta ima na indolnem obroču p-toluensulfonilni substituent, zato k zaviralni aktivnosti doprinese elektron donorska skupina na mestu 4 aromatskega obroča-metilna skupina ter distančnik sulfonilna skupina.

Kot uspešni zaviralci so se v naši seriji spojin izkazale spojine v obliki 2-iminoindolinov oziroma 2-aminoindolov, saj prihaja do tautomerije. Med njimi je bila najboljši zaviralec spojina 13, ki je imela najnižjo rezidualno aktivnost (28,87 %), le okoli 10 % manj kot najmočnejši zaviralec NOD1 (Noditinib). Vendar se je spojina izkazala kot citotoksična, zato smo testiranje ponovili pri nižjih koncentracijah (5 in 10 µM), kjer slednja ni bila več citotoksična. Pri 5 µM je imela spojina 13 87,9 % rezidualno aktivnost, Noditinib pa 90,0 %, pri 10 µM pa se je rezidualna aktivnost spojine 13 zmanjšala na 72,4 %, Noditinibu pa na 77,0 %. Rezultati dodatnega testiranja nam tako povedo, da je spojina zelo uspešen zaviralec NOD1, saj ima mogoče celo boljšo zaviralno aktivnost kot znan zaviralec Noditinib, vendar zaradi velike standardne deviacije ne moremo trditi, da je boljši zaviralec. Enako substituirana spojina (Preglednica II), vendar z benzimidazolnim skeletom, ki so jo objavili Khan in sodelavci izkazuje zaviralno aktivnost za NOD1 in NOD2 (19). K aktivnosti naše spojine 13 največ doprinese na mestu 4 vezan klor, v primerjavi s spojino 9, ki na aromatskem obroču nima substituenta. To dodatno potrjuje znanje o odnosu med strukturo in delovanjem za benzimidazolne zaviralce, kjer so za največjo zaviralno aktivnost potrebna klor ali metilna skupina na mestu 4 aromata (19). Drugi najboljši zaviralec med amini v naši seriji je spojina 9 (78,05 %). Aktivnost zaviranja NOD1 pa se čisto izgubi, če na mesto 4 benzilne skupine veženo nitro skupino (Spojina 5), čeprav gre za 2-aminoindole. Če primerjamo med sabo še substituente na indolinu med samimi končnimi spojinami (2-iminoindolini), vidimo, da je najuspešnejši benzilni substituent. Sledi mu sulfonilni (Spojina 20) in nazadnje benzoilni (Spojina 27 in 31). Razlika med slednjima spojinama je v substituciji benzoilnega dela, in sicer 2,4-

diklorosubstituiran benzoil (Spojina 31) ima boljšo zaviralno aktivnost za 8%, vendar je takšna razlika zanemarljiva. Ta podatek ponovno sovpada z že znanimi rezultati o odnosu med strukturo in delovanjem pri benzimidazolih, kjer so sintetizirali enako substituirano spojino z benzimidazolnim skeletom (Preglednica II) (19) .

Klor je klasična monovalentna bioizostera za brom, metil, tiol in druge manjše alkilne skupine (76), zato smo za vse skupine spojin s klorom na mestu 4 aromatskega obroča pričakovali tudi obetavne rezultate. Potrdili smo hipotezo, da sam klor na mestu 4 doprinese k največji zaviralni aktivnosti, dodaten klor na mestu 2 (2,4-dikloro derivati) pa tudi poveča zaviralno aktivnost spojin. Prav tako za naše spojine ugotavljamo, da je za zaviralno aktivnost na receptorje NOD1 pomembna prosta $-NH_2$ skupina, ki verjetno tvori vodikovo vez z aktivnim mestom encim. Manjšo vlogo imajo ionske interakcije, saj so bile najbolj aktivne spojine v obliki aminov/iminov in hidrazida, kjer je $-NH_2$ skupina donor vodikove vezi. Manj ustrezne vodikove interakcije za zaviralno aktivnost tvorita skupini $-O-$ in $C=O$ kot akceptorja vodikove vezi. Kot akceptor vodikove vezi pa je k zaviralni aktivnosti verjetno doprinesla tudi vodikova vez, ki jo tvori $-F$ na aromatskem obroču. Za distančnik med indolom/indolinom in aromatskim obročem se je najbolje izkazala sulfonilne skupine, kar sovpada z benzimidazolnimi zaviralcji (19).

Z MTS testom, kjer smo ugotavljali celično viabilnost oz. citotoksični učinek spojin smo potrdili smo citotoksičnost spojine 13 pri vrednosti $25\mu M$. Test citotoksičnosti smo za omenjeno spojino ponovili še v nižji koncentraciji, kjer smo ugotovili, da pri vrednosti $5\mu M$ in $10\mu M$ ni več citotoksična. (Priloga 2) (Grafikon 2)



Grafikon 2: MTS test citotoksičnosti

6. SKLEPI

V okviru diplomskega dela smo sintetizirali 6 končnih spojin z 2-iminoindolinskim skeletom ter jih ovrednotili glede na njihovo zaviralno aktivnost na receptor NOD1. Potek sinteznih reakcij, ki smo si jih zastavili se je izkazal za dobrega, saj smo le v primeru zaščite karboksilne kisline morali ubrati drugo obliko estra. Z optimizacijo reakcij smo sintetizirali čiste spojine, ki so bile primerne za biološko testiranje. Glavna pomanjkljivost postopka je bila raznolikost spojin (npr. vpliv distančnika pri hidrolizi estra), zato smo sintezne postopke malenkost prilagodili, hkrati pa smo tako prišli do nekaterih novih ugotovitev (npr. vpliv topila pri odstranitvi benzilne zaščite).

Zaščita za karboksilno kislino v oblika etilnega estra je bila glede na izkoristek in enostavno izolacijo optimalnejša od benzilnega estra, slednji pa je dal časovni hitrejši potek reakcije. Obliko benzilnega estra smo uporabili za benzoilne derivate, etilni ester pa za sulfonilne in benzilne.

Za uvajanje substituentov na indolni dušik se je za najbolj optimalen postopek izkazal sintezni postopek z kronskim etrom, 18-Crown-6 in kalijevim *terc*-butoksidom.

Etilni ester smo odščitili z alkalno hidrolizo z uporabo 1M KOH in etanola kot topila, benzilni ester pa s katalitskim hidrogeniranjem. Pri katalitskem hidrogeniraju je v prisotnosti ocetne kisline prišlo še do redukcije indolnega skeleta v indolin. Sam postopek katalitskega hidrogeniranja je bil hiter in enostaven, pomanjkljivost je bila le v manjši količini izhodne spojine, zato smo reakcije izvajali v večih ponovitvah z manjšo maso.

Eksperimentalni del nam je močno skrajšala sintezna pot, kjer smo iz karboksilne kisline s pomočjo Curtiusove premestitve tvorili karbamat. Pomembno pri tej reakciji je bilo, da je naprej potekla aktivacija karboksilne kisline z DPPA, ki se je pretvorila do azida, nadalje pa je prišlo do Curtiusove premestitve do izocianata in v prisotnosti *terc*-butanolata do ustreznega karbamata.

BOC zaščito za aminsko skupino smo tik pred koncem sintezne poti odstranili z acidolizo, z etrom prepihanim s HCl. Sam postopek je bil zelo enostaven in hiter, prav tako izolacija končne spojine v obliki soli. Amini so največkrat nestabilni, zato smo jih zaščitili in izboljšali njihovo stabilnost v obliki soli. Pri tem je prišlo do protonacije aminske skupine, kar pa ni vplivalo na aromatično značilnost indolnega obroča.

Za najbolj aktivno spojino se je izkazala končna spojina 13 (1-(4-klorobenzil)indolin-2-iminijev klorid), ki je imela pri nižjih koncentracijah celo boljšo

zaviralno aktivnost kot znan zaviralec Noditinib, vendar na podlagi rezultatov zaradi velike standardne deviacije tega ne moremo trditi. Da bi lahko natančno primerjali vpliv heterocikla na SAR NOD1 zaviralcev, bi morali primerjati aktivnost naše spojino 13 ter spojine I (Preglednica II) na isti celični kulturi, ali pa bi spojini 13 določili IC₅₀ (koncentracija zaviralca, pri kateri pada aktivnost za 50%). Vsekakor pa bi bilo potrebno spojinam z indolnim skeletom posvetiti večjo pozornost, saj naši rezultati kažejo, da bi lahko imeli indolni zaviralci NOD1 boljšo zaviralno aktivnost od že znanih benzimidazolnih. Rezultate naših meritev bi lahko dodatno izboljšali še z drugo celično linijo, in sicer s HEK-Blue NOD1 (proizvajalec InvivoGen), ki selektivno izraža receptor NOD1 (77) ter tako dobili optimalnejše, bolj selektivne rezultate biološkega testiranja.

7. LITERATURA

1. Abbas AK, Lichtman AH, Ramič Z: Osnovna imunologija, Data status, Beograd, 2006, 1 – 39.
2. Abbas AK, Lichtman AH: Cellular and Molecular Immunology, 5th edition, Saunders, Philadelphia, 2003, 267 – 297.
3. Vozelj M: Imunologija: enciklopedijski priročnik; DZS, Ljubljana, 2006, 148 – 230.
4. Lemke TL, Williams DA: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 6th edition, LWW, Baltimore, 2008, 1028 – 1082.
5. http://en.wikipedia.org/wiki/Bacterial_cell_structure (januar 2013).
6. McCoy AJ, Maurelli AT: Building the invisible wall: updating the chlamydial peptidoglycan anomaly; Trends in Microbiology 2006, 14, 70 -76.
7. <http://en.wikipedia.org/wiki/Peptidoglycan> (januar 2013).
8. Barreteau H, Sosič I, Turk S et al.: MurD enzymes from different bacteria: Evaluation of inhibitors; Biochemical Pharmacology 2012, 84, 625 – 632.
9. Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program, National Center for Biotechnology Information, ZDA 2010; Poglavje: Magnuson G, Khan P, Yuan H et al.: High Throughput Screening Assays for NOD1 Inhibitors - Probe 2, NOD1 pathway selective inhibitors.
10. Born TL, Blanchard JS.: Structure/function studies on enzymes in the diaminopimelate pathway of bacterial cell wall biosynthesis, Curr Opin Chem Biol. 1999, 5, 607 – 613.
11. Heidrich C, Ursinus A, Beger J et al.: Effects of Multiple Deletions of Murein Hydrolases in Viability, Septum Cleavage and Sensitivity to Large Toxic Molecules in Escherichia coli, J Bacteriol 2002, 184, 6093 – 6099.
12. Herve M, Boniface A, Gobec S et al.: Biochemical characterization and physiological properties of Escherichia coli UDP-N-acetylmuramate: L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelate ligase, J Bacteriol 2007, 189, 3987 – 3995.
13. <http://www.invivogen.com/m-tridap> (januar 2013).
14. Franchi L, Warner N, Viani K et al.: Function of Nod-like Receptors in Microbial Recognition and Host Defense; Immunol Rev. 2009, 227, 106 - 128.

15. Geddes K, Magalhaes JG, Girardin SE: Unleashing the therapeutic potential of NOD-like receptors; *Nat Rev Drug Discov.* 2009, 8, 456 – 479.
16. Jenny P, Lovering RC, Alnemri ES et al.: The NLR gene family: An official nomenclature; *Immunity.* 2008, 28, 285 – 287.
17. Fernández-Velasco M, Prieto P, Terron V et al.: NOD1 Activation Induces Cardiac Dysfunction and Modulates Cardiac Fibrosis and Cardiomyocyte Apoptosis, *PLoS One.* 2012, 7, 9.
18. Tohno M, Shimazu T, Hishashi A et al.: Molecular cloning and functional characterization of porcine nucleotide-binding oligomerization domain-1 (NOD1) recognizing minimum agonists, meso-diaminopimelic acid and meso-lanthionine; *Molecular Immunology* 2008, 45, 1807 – 1817.
19. Swaan PW, Bensman T, Bahadduri PM et al.: Bacterial Peptide Recognition and Immune Activation Facilitated by Human Peptide Transporter PEPT2; *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2008, 39, 536 – 542.
20. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y et al.: Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract; *Science* 2005, 307, 731 – 734.
21. Khan PM, Correa RG, Divlionska DB et al.: Identification of Inhibitors of NOD1-Induced Nuclear Factor- κ B Activation; *ACS Med. Chem. Lett.* 2011, 2, 780 – 785.
22. Kutikhin AG: Role of NOD1/CARD4 and NOD2/CARD15 gene polymorphisms in cancer etiology; *Hum Immunol.* 2011, 72, 955 – 968.
23. Schertzer JD, Tamrakar AK, Magalhaes JG et al: NOD1 activators link innate immunity to insulin resistance; *Diabetes.* 2011, 60, 2206 – 2215.
24. Correa RG, Khan PM, Askari N et al.: Discovery and Characterization od 2-aminobenzimidazole Derivatives as Selective NOD1 Inhibitors; *Chemistry & Biology* 2011, 18, 825 – 832.
25. Cartwright N, Murch O, McMaster SK et al.: Selective NOD1 agonists cause shock and organ injury/dysfunction in vivo; *Am J Respir Crit Care Med.* 2007, 175, 595-603.
26. Berrington WR, Iyer R, Wells RD et al.: NOD1 and NOD2 regulation of pulmonary innate immunity to Legionella pneumophila, *Eur. J. Immunol.* 2010, 40, 3519 – 3527.
27. Ramanpreet W, Hedaitullah MD, Naaz SF et al.: Benzimidazole derivatives – an overview; *IJRPC* 2011, 1, 2231 – 2781.

28. Böhm HJ, Flohr A, Stahl M: Scaffold hopping; Drug Discovery Today: Technologies 2004, 1, 217 – 224.
29. Ramesh D, Gopinath C et al.: Reactivity of novel substituted benzimidazole derivatives, IJAPN 2011, 2231 – 3966.
30. Beaulieu PL, Gillard L, Bykowski D et al.: 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 – 4993.
31. Delang L, Froeyen M, Herdewijn P et al.: Identification of a novel resistance mutation for benzimidazole inhibitors of the HCV RNA-dependent RNA polymerase; Antiviral Research 2012, 93, 30 – 38.
32. Merino G, Jonker JW, Wagenaar E et al.: Transport of anthelmintic benzimidazole drugs by breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2); Drug metabolism and disposition 2005, 33, 614 – 618.
33. Schneider EH, Strasser A, Thurmond RL et al: 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 – 521.
34. Beaulieu PL, Gillard L, Bykowski D et al.: 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 – 4993.
35. Tišler M: Organska kemija, tretja, popravljena in dopolnjena izdaja, DZS, Ljubljana 1991.
36. Wagaw S, Yang BH, Buchwald SL: A Palladium-Catalyzed Strategy for the Preparation of Indoles: A Novel Entry into the Fischer Indole Synthesis, J. Am. Chem. Soc., 1998, 120, 6621 – 6622.
37. Sujata R, Gribble GW: A convenient synthesis of 2-nitroindoles; Tetrahedron Letters 2005, 46, 1325 – 1328.
38. Pelkey ET, Gribble GW: Synthesis of 2-nitroindoles via the Sundberg Indole Synthesis; Tetrahedron Letters 1997, 38, 5603 – 5606.
39. Ruiguang X, Qiuping T, Qiang L et al.: Synthesis of 2-Aminoindole Derivatives with Hantzsch Ester Catalyzed by Pd/C; Chin. J. Chem. 2012, 20, 1 – 4.

40. Diana P, Barraja P, Lauria A et al.: Protonation of Aminoindoles; Tetrahedron 2000, 56, 5177 – 5183.
41. Hoffmann K, Kebrle J et al.: Process of preparing certain 2-amino indoles; United States Patent, Patent number: 2,875,212, date of patent Feb. 24, 1959.
42. Rinderknecht H, Koechlin H, Niemann C: J.Org. Chem. 1953, 18, 971.
43. Witulski B, Alayrac C, Tevzadze-Saeftel L: Palladium-Catalyzed Synthesis of 2-aminoindoles by a Heteroanulation Reaction; Angew. Chem. Int. Ed. 2003, 42, 4257 – 4260.
44. Sujata R, Sudipta R, Gribble GW: Efficient reductive acylation of 3-nitroindoles; Tetrahedron Letters 2008, 49, 1531 – 1533.
45. Houlihan WJ: Chemistry of Heterocyclic Compounds: Indoles, Part One, Volume 25, Chemistry of Heterocyclic Compounds: Indoles, Part One, 25, John Wiley & Sons, New York, 1972: 13.
46. de Sa Alvers FR, Barreiro EJ, Manssour Fraga CA: From Nature to Drug Discovery: The Indole Scaffold as a »Privileged Structure«; Mini Rev Med Chem, 2009, 9, 782 – 793.
47. Li JJ, Gribble GW: Tetrahedron Organic Chemistry Series, 20: Palladium in heterocyclic chemistry a guide for the synthetic chemist; Pergamon 2000, Chapter 3 Indoles, 81 – 188.
48. Ishida T, Tsukano C, Takemoto Y: Synthesis of 2-Iminoindolines via Samarium Diiodide. Mediated Reductive Cyclization of Carbodiimides, Chem. Lett. 2012, 41, 44 – 46.
49. Derouaux A, Turk S, Olrichs NK et al.: Small molecule inhibitors of peptidoglycan synthesis targeting the lipid II precursor; Biochem Pharmacol. 2011, 81, 1098 – 105.
50. Mangette JE, Chen X, Krishnamoorthy R et al.: 2-Trifluoroacetyl aminoindoles as useful intermediates for the preparation of 2-acylamino indoles; Tetrahedron Letters 2011, 52, 1292 -1295.
51. Barker RH, Urgaonkar S, Mazitschek R et al.: Aminoindoles, a Novel Scaffold with Potent Activity against Plasmodium falciparum; Antimicrobial agents and chemotherapy, 2011, 2612 – 2622.
52. Harrington JR: The Role of MCP-1 in Atherosclerosis: Stem Cells 2000, 18, 65 – 66.

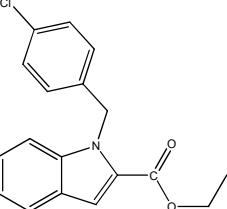
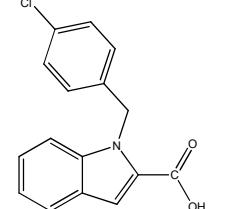
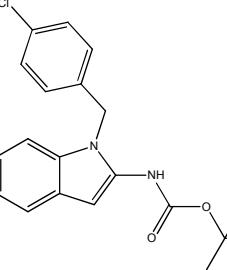
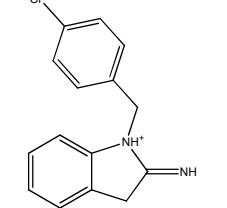
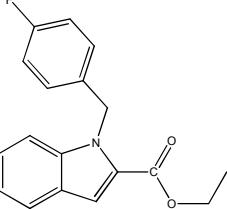
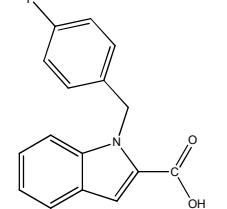
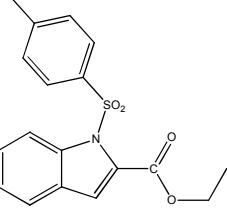
53. Kettle JG, Faull AW, Barker AJ et al.: N-Benzylindol-2-carboxylic acids: potent functional antagonists of the CCR2b chemokine receptor; Bioorganic&Medicinal Chemistry Lett. 2004, 14, 405 – 408.
54. Silvestri R, De Martino G, La Regina G et al.: Novel Indolyl Aryl Sulfones Active against HIV-1 Carrying NNRTI Resistance Mutations: Synthesis and SAR Studies; J. Med. Chem 2003, 46, 2482 – 2493.
55. Ragno R, Artico M, De Martino G et al.: Docking and 3-D QSAR Studies on Indolyl Aryl Sulfones. Binding Mode Exploration at the HIV-1 Reverse Transcriptase Non-Nucleoside Binding Site and Design of Highly Active N-(2-Hydroxyethyl)carboxamide and N-(2-Hydroxyethyl)carbohydrazide Derivatives; J. Med. Chem., 2005, 48, 213 – 223.
56. Hopkins CR, O'neil SV, Laufersweiler MC et al.: Design and synthesis of novel N-sulfonyl-2-indole carboxamides as potent PPAR- γ binding agents with potential application to the treatment of osteoporosis; Bioorg.Med. Chem. Lett., 2006, 16, 5659 – 5663.
57. Sechi M, Derudas M, Dallocchio R et al.: Design and Synthesis of Novel Indole β -Diketo Acid Derivatives as HIV-1 Integrase Inhibitors, J. Med. Chem., 2004, 47, 5298 – 5310.
58. <http://www.chemicalbook.com> (avgust 2012).
59. Wilson N in Vaughan D: Synthetic Approaches to Uleine and Apparicine, 1969.
60. Larsen S, Sindac J et al: Preparation of pyrrolyl (or imidazolyl) piperidinyl methanone derivatives as arbovirus inhibitors; United States Patent, Patent number: 20120252807 A1 20121004, Appl. Publ. 2012.
61. Farina V, Krishnamurthy V, Scott WJ: The Stille reaction; Organic Reactions, Hoboken, Ney York, 1997, 50.
62. Kakadiya R, Dong H, Lee PC, Kapuriya N et al: Potent antitumor bifunctional DNA alkylating agents, synthesis and biological activities of 3a-aza-cyclopenta[a]indenes; Bioorg. Med. Chem., 2009, 17, 5614 – 5626.
63. Nazare M, Eerich M et al.: Indole-2-Carboxamides as factor XA Inhibitors; European patent, Patent number: EP2002012500, date of patent: Nov. 8, 2002: 170.
64. Maxted EB, Stone V: The solvent factor in catalytic hydrogenation; J. Chem. Soc., 1938, 454 – 455.

65. Fink DM: Cesium Carbonate Promoted N-Alkylation of Indoles; *Synlett* 2004, 13, 2394 – 2396.
66. Astruc D, Djankovitch L, Aranzaes JR: Can t-BuOK be a good nucleophile? An ion-pairing answer. Cleavage of aryl ethers in their cationic iron complexes; Commemorative Issue in Honor of Prof. Armand Lattes 2006, 4, 173-188.
67. Kleeberg C: Synthesis and Characterisation of [K(18-Crown-6)(OtBu)]: An Useful Reagent in Nonpolar Solvents; *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie* 2011, 637, 1790–1794.
68. Charles J. Pedersen: Macroyclic Polyethers: Dibenzo-18-Crown-6 Polyether and Dicyclohexyl-18-Crown-6 Polyether; *Org. Synth.* 1988, 6, 395.
69. Jorapura YR in Jeongb JM: Potassium carbonate as a base for the N-alkylation of indole and pyrrole in ionic liquids; *Tetrahedron Lett.* 2006, 47, 2435 – 2438.
70. Yates M, Kallman NJ, Ley CP et al.: Development of an Acyl Sulfonamide Anti-Proliferative Agent, LY573636·Na; *Org. Process Res. Dev.* 2009, 13, 255 – 262.
71. Jia. G, Lown JW: Design, synthesis and cytotoxicity evaluation of 1-chloromethyl-5-hydroxy-1,2-dihydro-3H-benz[e]indole (seco-CBI) dimers; *Bioorg. Med. Chem.* 2000, 8, 1607 – 1617.
72. Katritzky AR, Widyan K: Preparation of Polyfunctional Acyl Azides, *J. Org. Chem.* 2007, 72, 5802 – 5804.
73. Shioiri T: Diphenyl Phosphorazidate (DPPA) – More Than Three Decades Later; (<http://www.tcichemicals.com/en/us/support-download/tcimail/backnumber/article/134drE.pdf>; marec 2013).
74. Kozhushkov S, Khlebnikov AF, de Meijere A et al.: Scalable synthesis of (1-cyclopropyl)cyclopropylamine hydrochloride; *J Org Chem.* 2011, 7, 1003 – 1006.
75. <http://www.invivogen.com/ramos-blue-cell> (maj 2013).
76. Patani GA, LaVoie EJ: Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design; *Chem. Rev.* 1996, 96, 3147 – 3176.
77. <http://www.invivogen.com/hek-blue-nod1> (marec 2013).

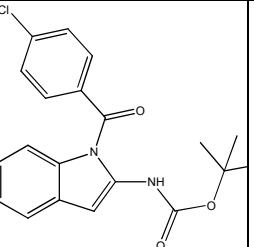
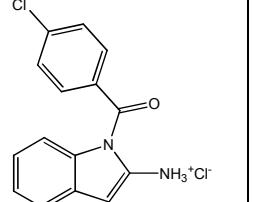
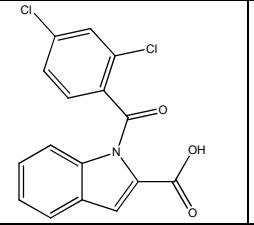
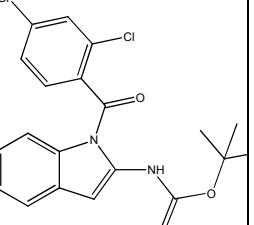
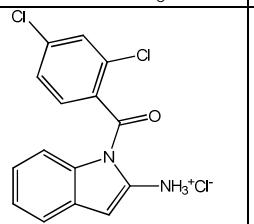
PRILOGE

Priloga 1: Biološko testiranje spojin na celični liniji Ramos Blue

Spojina	Struktura Spojine	C (μM)	Test A	Test B	Test C	% inhibicije	SD
Nod-itinib		25	23,33	11,63	/	17,48	8,28
5		25	117,5	88,96	111,04	105,83	14,97
6		25	203,33	176,74	143,51	174,53	29,98
7		25	123,33	99,42	93,54	105,42	15,78
8		25	95,83	75	101,12	90,65	13,81
9		25	69,17	83,72	81,29	78,06	7,80

10		25	129,17	111,04	93,10	111,11	18,03 1
11		25	97,5	89,53	87,22	91,49	5,39
12		25	84,17	94,19	92,48	90,28	5,36
13		25	25,83	27,91	/	26,87	1,47
14		25	159,17	136,05	122,99	139,40	18,32
15		25	52,5	86,05	76,41	71,65	17,27
16		25	60	55,23	62,43	59,22	3,66

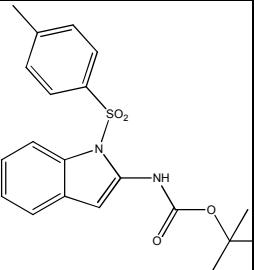
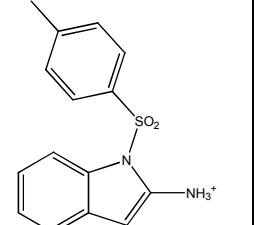
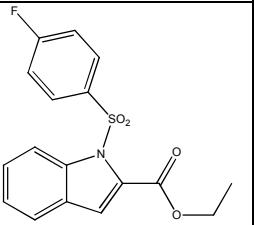
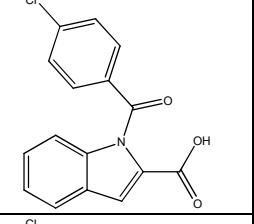
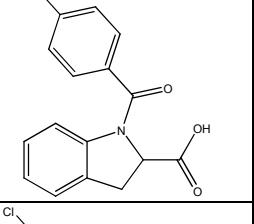
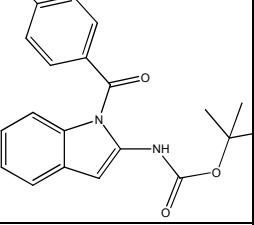
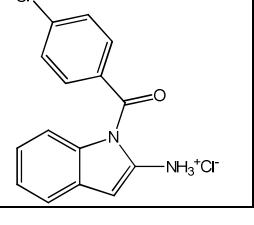
17		25	52,5	63,08	77,29	64,29	12,44
18		25	62,5	113,95	85,67	87,37	25,77
19		25	128,33	150	126,50	134,94	13,07
20		25	65,83	98,26	99,07	87,72	18,96
21		25	55	63,37	77,3	65,22	11,26
24		25	86,67	84,30	84,01	84,99	1,46
25		25	80	82,56	84,95	82,50	2,48

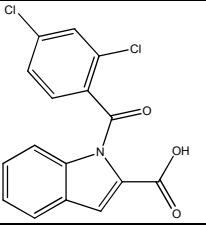
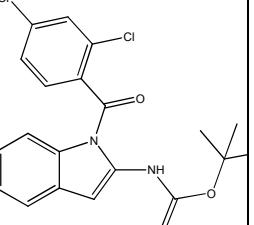
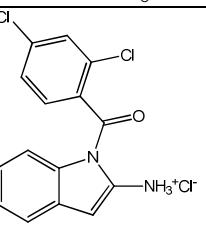
26		25	160	142,44	125,18	142,54	17,41
27		25	67,5	93,02	100,39	86,97	17,26
29		25	87,5	101,16	106,87	98,51	9,95
30		25	109,17	100	102,99	104,05	4,68
31		25	60	94,767 44	80,276 3	78,347 92	17,463 76

Priloga 2: MTS test citotoksičnosti

Spojina	Struktura Spojine	C (μM)	Test A	Test B	% NT
NT		25	1,04	0,85	100,00
5		25	0,97	0,78	91,65
6		25	0,93	0,74	87,06
7		25	1,06	0,86	101,65
8		25	0,98	0,79	92,59
9		25	0,89	0,70	82,00
10		25	1,14	0,94	110,94
11		25	1,07	0,87	102,71

12		25	1,11	0,92	108,12
13		25	0,42	0,22	26,35
14		25	1,14	0,95	111,53
15		25	1,20	1,01	118,82
16		25	1,22	1,02	120,47
17		25	1,18	0,99	116,12
18		25	1,13	0,94	110,35

19		25	1,22	1,03	121,18
20		25	1,29	1,10	129,41
21		25	1,19	1,00	117,41
24		25	1,19	1,00	117,41
25		25	1,20	1,01	118,47
26		25	1,29	1,09	128,59
27		25	1,17	0,98	115,29

29		25	1,16	0,97	113,53
30		25	1,13	0,93	109,76
31		25	1,16	0,96	113,41