

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETER ZAJC

**SINTEZA IN VREDNOTENJE PIRIMIDINO-  
GVANIDINSKIH ANTAGONISTOV TOLL-U PODOBNEGA  
RECEPTORJA 4**

MAGISTRSKA NALOGA  
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETER ZAJC

**SINTEZA IN VREDNOTENJE PIRIMIDINO-  
GVANIDINSKIH ANTAGONISTOV TOLL-U PODOBNEGA  
RECEPTORJA 4**

**SYNTHESIS AND EVALUATION OF PYRIMIDINO-  
GUANIDINE ANTAGONISTS OF TOLL-LIKE RECEPTOR 4**

Ljubljana, 2013

Magistrsko delo sem opravljal na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sov, mag. farm. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo in Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani (Center za masno spektrometrijo). Teste na celičnih linijah je opravil doc. dr. Urban Švajger, mag. farm., na Zavodu za transfuzijsko medicino Republike Slovenije.

### **Zahvala**

Zahvaljujem sem doc. dr. Mateju Sovi, mag. farm., za vso predano strokovno znanje, pomoč, nasvete in potrpežljivost pri izdelavi magistrskega dela. Posebej se zahvaljujem tudi strokovnim sodelavcem, ki so opravili teste na celičnih linijah in posneli masne spektre. Na koncu se zahvaljujem še družini in prijateljem, ki so mi vedno stali ob strani, me spodbujali in ustvarili čudovite trenutke v času mojega študija.

### **Izjava**

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

Peter Zajc

Ljubljana, 2013

Predsednica komisije: prof. dr. Irena Mlinarič-Raščan, mag. farm.

Član komisije: asist. dr. Matjaž Ravnikar, mag. farm.

# VSEBINA

SLIKOVNO KAZALO .....	i
POVZETEK.....	iii
ABSTRACT .....	iv
SEZNAM OKRAJŠAV.....	v
1 UVOD.....	1
1.1 Imunski sistem .....	1
1.2 Receptorji TLR .....	2
1.3 Receptor TLR4.....	5
1.4 Antagonizem TLR4 .....	7
1.4.1 Vloga antagonistov TLR4 pri posameznih boleznih.....	7
1.4.2 Razvoj antagonistov TLR4.....	8
2 NAMEN DELA .....	12
3 MATERIALI IN METODE .....	13
4 EKSPERIMENTALNI DEL .....	16
4.1 Sinteza spojine 1 .....	16
1. stopnja: sinteza spojine 2.....	16
2. stopnja: sinteza spojine 3.....	17
3. stopnja: sinteza spojine 1.....	18
4.2 Sinteza spojine 4 .....	19
4.3 Sinteza spojine 5 .....	21
4.4 Sinteza spojine 8 .....	22
1. stopnja: sinteza spojine 6.....	22
2. stopnja: sinteza spojine 7.....	23
3. stopnja: sinteza spojine 8.....	24
4.5 Sinteza spojine 9 .....	25

4.6 Sinteza spojina 12 .....	26
1. stopnja: sinteza spojine 10.....	26
2. stopnja: sinteza spojine 11.....	27
3. stopnja: sinteza spojine 12.....	28
5 REZULTATI IN RAZPRAVA .....	29
5.1 Razlaga sinteznih postopkov.....	29
5.2 Rezultati biološkega testiranja .....	36
6 SKLEP .....	37
7 LITERATURA .....	38
PRILOGA .....	I
1 Metode biološkega testiranja .....	I
1.1 Preverjanje topnosti.....	I
1.2 Preverjanje citotoksičnost .....	I
1.3 Določanje antagonistične aktivnosti.....	II
2 Ovrednotenje rezultatov biološkega testiranja.....	III

# SLIKOVNO KAZALO

Slika1: Strukturni prikaz TLR4 na celični membrani .....	3
Slika 2: Prikaz vezave agonista LPS na TLR4, vse od vstopa v polno kri do končne dimerizacije in internalizacije kompleksa LPS-TLR/MD-2 v notranjost celice, ki vodi v začetek signalne kaskade .....	6
Slika 3: Struktura eritorana .....	9
Slika 4: Struktura TAK-242 .....	10
Slika 5: Strukturna formula za $\beta$ -aminoalkoholne derivate .....	11
Slika 6: Struktura spojine 1 .....	11
Slika 7: Struktura spojine 1 .....	12
Slika 8: Reakcijska shema sinteze spojine 2 .....	16
Slika 9: Reakcijska shema sinteze spojine 3 .....	17
Slika 10: Reakcijska shema sinteze spojine 1 .....	18
Slika 11: Reakcijska shema sinteze spojine 4 .....	19
Slika 12: Reakcijska shema sinteze spojine 5 .....	21
Slika 13: Reakcijska shema sinteze spojine 6 .....	22
Slika 14: Reakcijska shema sinteze spojine 7 .....	23
Slika 15: Reakcijska shema sinteze spojine 8 .....	24
Slika 16: Reakcijska shema sinteze spojine 9 .....	25
Slika 17: Reakcijska shema sinteze spojine 10 .....	26
Slika 18: Reakcijska shema sinteze spojine 11 .....	27
Slika 19: Reakcijska shema sinteze spojine 12 .....	28
Slika 20: Tvorba Vilsmeirjevega reagenta .....	29
Slika 21: Mehanizem reakcije prve stopnje sinteznega postopka .....	29
Slika 22: Mehanizem nukleofilnega napada v drugi stopnji sinteznega postopka .....	31
Slika 23: Mehanizem nukleofilne adicije v tretji stopnji sinteznega postopka .....	32
Slika 24: Prikaz nastalih in neuspelih končnih spojin, tvorjenih iz istega izhodnega reagenta 2-hidroksi-5-metoksiacetofenona.....	33
Slika 25: Prikaz uspelih končnih spojin iz istega izhodnega reagenta 2-hidroksi-6-metoksiacetofenona .....	34
Slika 26: Prikaz neuspele končne spojine 12 iz izhodnega reagenta 2,6-dihidroksiacetofenona.....	35

Slika 27: Prikaz reakcije MTS, v kateri pod vplivom mitohondrijske reduktaze nastane tetrazolijev barvilo.....	II
Slika 28: Prikaz citotoksičnosti spojin 4 in 9 pri koncentraciji 20 $\mu\text{M}$ in 100 $\mu\text{M}$ .....	IV
Slika 29: Prikaz citotoksičnosti spojine 8 pri koncentracijah 10 $\mu\text{M}$ , 50 $\mu\text{M}$ , 100 $\mu\text{M}$ in 250 $\mu\text{M}$ .....	IV
Slika 30: Prikaz odvisnosti absorbance od logaritma koncentracije, za spojino 8 .....	V

# POVZETEK

Toll-u podobni receptorji (TLR) so pomemben del prirojenega imunskega sistema, ki deluje kot prva linija obrambe ob vdoru mikroorganizmov v telo. Od desetih poznanih humanih TLR, ki so udeleženi pri mnogih bolezenskih stanjih, je pomemben predvsem Toll-u podoben receptor 4 (TLR4). Ta transmembranski protein z vezavno domeno na površini celične membrane, kjer prepoznavajo izvencične, za patogene značilne molekulske motive (PAMP), je pomembna potencialna tarča pri iskanju novih zdravilnih učinkovin za zdravljenje bolezni povezanih z vnetjem, ki je posledica prekomerne ekspresije in aktivacije receptorja (sepsa, ateroskleroza, kronična bolečina ...), ali bolezni povezanih s pomanjkljivim odzivom imunskega sistema na ne-fiziološko stanje organizma (rak, multipla skleroza, nalezljive bolezni). Kljub obsežnim raziskavam in razvoju na tem področju v zadnjih 20 letih, na tržišču še vedno ni nobenega antagonista TLR4.

V sklopu raziskav, ki so del te magistrske naloge, smo uspeli postaviti delno sintezo spojine zadetka, ki je bila najdena s pomočjo virtualnega rešetanja na Fakulteti za farmacijo, z dokazano antagonistično aktivnostjo na TLR4. V tristopenjski sintezi smo sintetizirali tudi derivate spojine zadetka in optimizirali nekatere stopnje sinteze, kar nam je omogočilo varnejše reakcije, krajše reakcijske čase in boljše izkoristke. Poleg tega smo se pri nekaterih spojinah uspeli izogniti čiščenju s kolonsko kromatografijo, saj smo izolirali čist produkt reakcije z metodo kristalizacije.

Sintetiziranim spojinam je bila preverjena tudi topnost v celičnem mediju (RPMI 1640), citotoksičnost na celicah HEK 293 in ovrednoteno antagonistično delovanje na TLR4. Ugotovljeno je bilo, da so sintetizirane spojine v veliki meri citotoksične nad koncentracijo  $100 \mu\text{M}$ , kar je verjetno posledica nekaterih funkcionalnih skupin v molekuli (gvanidinski del, keto skupina). Ugotovljeno je bilo tudi, da sprememba položaja metoksi skupine na fenilnem obroču iz mesta 5 na mesto 6 zmanjša antagonistično delovanje spojine, zamenjava 4-fluorofenilnega substituenta na gvanidinskem delu z 1-(piridin-3-ilmetil)piperazinom pa celo vodi do izgube delovanja. Na podlagi dobljenih rezultatov zaključimo, da so za močnejše antagonistično delovanje na TLR4 in zmanjšano citotoksičnost potrebne dodatne strukturne spremembe.

# **ABSTRACT**

Toll-like receptors (TLR) are an important part of the innate immune system, acting as a first-line defence mechanism against invading microorganisms. Of the ten known human TLR that are associated with numerous diseases, probably the most important is the Toll-like receptor 4 (TLR4). This transmembrane protein with the binding domain on the surface of the cell membrane recognizes the extracellular pathogen-associated molecular patterns (PAMP). It presents an important potential new drug target, especially whilst studying the treatment of diseases associated with inflammation due to excessive expression and receptor activation (sepsis, atherosclerosis, chronic pain, ...), or diseases associated with deficient immune responses, when the organism is in a non-physiological state (cancer, multiple sclerosis, infectious diseases). Despite extensive research and development in this area in the last twenty years, there have still not been any new drugs registered as the TLR4 antagonist.

Within the research, as part of this master's thesis, we have succeeded in setting up partial synthesis of the hit compound found by virtual screening at the Faculty of Pharmacy in Ljubljana and with proven TLR4 antagonist activity. In the three-step synthesis we synthesized the hit compound derivates and optimized some synthetic procedures, which enabled safer reactions, shorter reaction times and better yields. In addition, we managed to avoid purification by column chromatography for some compounds, obtaining the pure product by crystallization process.

Furthermore, the synthesized compounds were tested for solubility in cell medium (RPMI 1640), cytotoxicity on the HEK 293 cells and TLR4 antagonist properties. It was found that the synthesized compounds, to a large extent, show cytotoxicity at concentrations greater than 100 µM, probably due to of certain functional groups presented in the molecule (guanidine or ketone group). It was also found that the change in position of methoxy group on the phenyl ring from position 5 to position 6 reduces antagonistic activity of the compounds and the replacement of 4-fluorophenyl substituent on guanidine to 1-(pyridin-3-ylmethyl)piperazine even leads to loss of activity. To conclude, in order to achieve better TLR antagonistic effects and reduce cytotoxicity, further structural changes are needed.

# SEZNAM OKRAJŠAV

angl.:	angleško
APC:	antigen predstavitevne celice (angl. antigen-presenting cells)
Ar-H:	aromatski vodikov atom
br s:	široki singlet (angl. broad singlet)
bRNA:	bakterijska RNA (angl. bacterial RNA)
BTC:	bis(triklorometil)karbonat - trifosgen
CDCl <sub>3</sub> :	devteriran kloroform
CD14:	označevalec pripadnosti 14 (angl. cluster of differentiation 14)
CLR:	receptorji lektina tipa C (angl. C-type lectin receptors)
CŽS:	centralno-živčni sistem
d:	dublet
DAMP:	s poškodbami povezani molekulski motivi (angl. damage-associated molecular patterns)
DC:	dendritične celice (angl. dendritic cells)
dd:	dublet dubleta
DMF:	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO:	dimetilsulfoksid
dsRNA:	dvojno-vijačna RNA (angl. double-stranded RNA)
dt:	dublet tripleta
ESI-MS:	masna spektrometrija z ionizacijo z elektrorazprševanjem
GABA:	γ-aminomaslena kislina (angl. γ-aminobutyric acid)
HEK 293:	trajna celična kultura iz človeških embrionalnih ledvičnih celic (angl. human embryonic kidney cell line)
HPLC:	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HRMS:	visoko ločljiva masna spektrometrija
HSP:	stresni proteini (angl. heat-shock proteins)
IC <sub>50</sub> :	srednja inhibitorna koncentracija (angl. median inhibition concentration)
IFN:	interferon
IL-1β:	interlevkin-1β

IL-6:	interlevkin-6
iPrOH:	izopropanol
IRF3:	IFN-regulacijski faktor 3 (angl. IFN-regulatory factor 3)
IUPAC ime:	ime določeno po predpisanem sistemu Mednarodne zveze za čisto in uporabno kemijo
LBP:	LPS-vezavni protein (angl. LPS-binding protein)
LPS:	lipopolisaharid, tudi endotoksin (angl. lipopolysaccharide)
LRR:	z levcinom bogata ekstracelularna domena (angl. leucin rich repeats domane)
m:	multiplet
MAPK:	mitogen aktivirana proteinska kinaza (angl. mitogen-activated protein kinase)
MD-2:	diferenciacijski mielodni protein 2 (angl. myeloid differentiation protein 2)
MF:	mobilna faza
MHC:	glavni histokompatibilni kompleks (angl. major histocompatibility complex)
MMP-9:	matriksna metaloproteaza 9
MMTV:	tumorski virus mišje mlečne žleze (angl. mouse mammary tumor virus)
mol. ekv.:	molarni ekvivalent
MS:	masna spektrometrija
MyD88:	diferenciacijski mielodni protein 88 (angl. myeloid differentiation primary-response protein 88)
NF $\kappa$ B:	jedrni dejavnik kapa B
NK-celice:	celice naravne ubijalke (angl. natural killer cells)
NLR:	NOD-u podobni receptorji (angl. NOD-like receptors)
NMDA:	<i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartat (angl. <i>N</i> -methyl- <i>D</i> -aspartate)
NMR:	jedrska magnetna resonanca (angl. nuclear magnetic resonance)
PAMP:	za patogene značilni molekulski motivi (angl. pathogen-associated molecular patterns)
pH:	negativni logaritem molarne koncentracije $[H_3O]^+$ ionov
PRR:	receptorji, ki prepoznavajo določene molekulske vzorce (angl. pattern-recognition receptors)
Rf:	retencijski faktor
RLR:	RIG-1 podobni receptorji (angl. RIG-1-like receptors)

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

# 1 UVOD

## 1.1 Imunski sistem

Človeško telo je neprestano v stiku z mikroorganizmi, ki bi lahko škodljivo vplivali na homeostazo organizma. Kot obrambo pred mikroorganizmi, ima telo razvit imunski sistem, ki posreduje ob okužbah, z namenom čimprejšnje vzpostavitev normalnega fiziološkega stanja. Delimo ga na naravno (prirojeno) in specifično (pridobljeno) imunost (1).

Naravni imunski odziv je prva linija obrambe ob vdoru mikroorganizmov. Gre za evolucijsko razvit sistem, ki prepoznava za patogene značilne molekulske motive patogenov (PAMP) in s poškodbami povezane molekulske motive (DAMP) ter sproži takojšen, hiter vnetni odziv (nespecifičen za točno določen patogen). To stori preko posebnih receptorjev, ki prepoznavajo specifične molekulske vzorce (PRR) in mednje prištevamo Toll-u podobne receptorje (TLR), RIG-1 podobne receptorje (RLR), NOD-u podobne receptorje (NLR) in receptorje lektina tipa C (CLR). PRR so enakomerno razporejeni tako po zunajceličnem kot po znotrajceličnem prostoru. TLR in receptorji lektina tipa C so transmembranski receptorji, ki prepoznavajo mikroorganizme v območju celične membrane (nekateri TLR se nahajajo tudi v lumnu intracelularnih endosomov in lizosomov). RLR in NLR pa so citosolni receptorji, ki prepoznavajo intracelularne PAMP. Pomembna je tudi ugotovitev, da posamezni PAMP hkrati aktivirajo več različnih PRR in tako ustvarijo kompleksni dražljaj imunskemu sistemu, ki se pokaže kot hitra in obsežna reakcija proti mikroorganizmom (prikazano v preglednici I). PRR predstavljajo tudi povezavo med naravnim in specifičnim imunskim odzivom, saj njihova aktivacija preko različnih PAMP (a nikoli DAMP, saj ne sme priti do imunskega odziva na telesu lastne celice) privede do razvoja specifičnega imunskega odziva (1-6).

Za razliko od naravnega imunskega odziva, specifičen imunski odziv ni evolucijsko razvit. Ob stiku z novim antigenom, predstavljenem na površini APC (ponavadi dendritične celice), se sproži klonska ekspanzija limfocitov B, kar vodi v nastanek plazmatk, ki proizvajajo specifična protitelesa, in spominskih celic za ta antigen. Ob ponovni okužbi z istim antigenom, bodo spominske celice poskrbele za hitrejši odziv s specifičnimi protitelesi (prvi odziv na nov antigen je počasnejši). Specifičen imunski odziv obsega humoralno in celično imunost. Humoralna imunost se nanaša na okužbe z mikroorganizmi

zunajceličnega izvora, torej v krvi in ostalih telesnih tekočinah. Pri tem gre za usklajeno delovanje APC, sistema komplementa in protiteles, pod vplivom limfocitov B. Celična imunost, pa za razliko od humorale imunosti, ne vključuje obrambe s protitelesi, temveč gre za usklajen odziv aktiviranih fagocitov, citotoksičnih limfocitov T in različnih citokinov, ki sodelujejo pri obrambi proti mikroorganizmom, ki so že napadli znotrajcelično okolje in grozijo obstoju celic (1, 2, 5).

**Preglednica I: Prikaz različnih PRR, ki prepoznavajo specifične PAMP ter prikaz od kod PAMP izvirajo; povzeto po (6-8)**

<i>PRR</i>	<i>PAMP</i>	<i>Aktivni del molekule</i>	<i>Mikroorganizem</i>
TLR4	LPS	Lipid A	Večina Gram-negativnih bakterij
NLR1, NLR2	Peptidoglikan	<i>N</i> -acetilglukozamin, <i>N</i> -acetilmuraminska kislina	Večina bakterij
RLR, TLR3	dsRNA	dsRNA	Virusi
Dectin-1 (CLR)	Beta-glukan	Celična stena	Glive

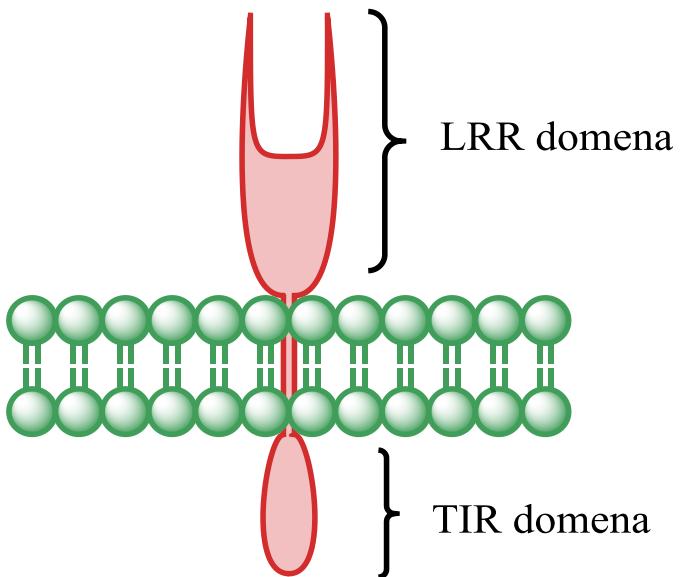
## **1.2 Receptorji TLR**

Receptorji TLR so bili odkriti pred skoraj 20 leti, ob preučevanju patogeneze sepse, povzročene z Gram-negativnimi bakterijami. Ugotovljeno je bilo, da imajo zelo podobno homologno zaporedje receptorju, najdenem pri muhi *Drosophila melanogaster*, imenovanem »Toll«, ki je odgovoren za sprožitev imunskega odziva ob glivičnih okužbah. Z bioinformacijskim pristopom je bilo kasneje odkritih 13 Toll-u podobnih receptorjev, od tega deset pri ljudeh in trije dodatni pri miših. Med seboj se razlikujejo po lokaciji, v celici: prisotni na membrani celic prepoznavajo dele mikroorganizmov, medtem ko tisti, prisotni znotraj celic (endoplazemski retikulum, endosomi, lizosomi, endolizosomi), prepoznavajo predvsem nukleinske kisline mikroorganizmov. Različni so tudi ligandi, ki jih aktivirajo, in pa sama efektorska funkcija receptorja v okviru imunskega sistema, kar je razvidno iz preglednice II (6, 9).

Receptorji TLR spadajo med transmembranske proteine tipa 1. Zgrajeni so iz z levcinom bogate ekstracelularne domene – LRR (kjer so tudi vezavna mesta za ligande; N-terminalni del), transmembranske domene in citoplazemske domene TIR (C-terminalni del), kar je razvidno iz slike 1. TIR domena je zgrajena iz 135 – 160 aminokislin dolgega zaporedja in je po sestavi zelo podobna družini receptorjev

interlevkina-1 (IL-1), zato receptorje TLR uvrščamo v naddružino TLR/IL-1R (poleg receptorjev TLR in receptorjev IL-1 spadajo sem še adaptorne molekule, uporabljene za signaliziranje). TIR domena je tudi ključni del za začetek imunskega odziva, saj se tu, z aktivacijo adaptornih molekul (skoraj vsi TLR aktivirajo MyD88, le TLR3 uporabi TRIF), začne signalna kaskada, ki vodi v proizvajanje vnetnih mediatorjev in aktivacijo makrofagov ter dendritičnih celic (5, 13, 14).

TLR so odgovorni tudi za začetek in mediacijo specifičnega imunskega odziva. To dosežejo predvsem s povečanjem izražanja glavnega histokompatibilnega kompleksa (MHC) in posledičnim večjim predstavljanjem antigenov. Prav tako vplivajo na dozorevanje DC in proliferacijo limfocitov B, njihovo klonsko ekspanzijo ter proizvajanje protiteles. Pomembni so tudi za razvoj limfocitov Th1 (TLR2 je večinsko prisoten na samih limfocitih T) (15, 16).



Slika 1: Strukturni prikaz TLR4 na celični membrani; povzeto po (5)

**Preglednica II: Pregled TLR na podlagi lokacije nahajanja, funkcije in najpomembnejšega liganda posameznega receptorja; povzeto po (4, 6, 10, 11, 12)**

Receptor	Lokacija	Efektorska funkcija	Najpomembnejši ligandi
<i>TLR1</i>	Na membrani celic	Obramba proti <i>Mycobacteria</i> in organizmom, ki izražajo triacilirane lipoproteine	Triacilirani lipoproteini
<i>TLR2</i>	Na membrani celic	Obramba proti <i>Mycobacteria</i> , <i>Mycoplasma</i> , praživalim, glivam; prepozna oksidativni stres in celično nekrozo, aktivacija in degranulacija mastocitov, indukcija apoptoze	Peptidoglikan (lipoteiholska kislina)
<i>TLR3</i>	Znotraj celic	Protivirusna obramba	dsRNA
<i>TLR4</i>	Na membrani celic	Obramba proti Gram-negativnim bakterijam, virusom in glivam; indukcija apoptoze	LPS
<i>TLR5</i>	Na membrani celic	Obramba proti bičkastim bakterijam; dozorevanje DC	Flagelin
<i>TLR6</i>	Na membrani celic	Obramba proti bakterijam, glivam, <i>Mycoplasma</i> in praživalim	Diacilirani lipoproteini
<i>TLR7</i>	Znotraj celic	Protivirusna in protitumorna obramba, dozorevanje DC, aktivacija eozinofilcev in NK-celic, proliferacija limfocitov B, razvoj limfocitov Th1	Imidazokinolini, ssRNA
<i>TLR8</i>	Znotraj celic	Protivirusna in protitumorna obramba, dozorevanje DC, aktivacija eozinofilcev in NK-celic, proliferacija limfocitov B, razvoj limfocitov Th1	Imidazokinolini, ssRNA
<i>TLR9</i>	Znotraj celic	Protivirusna in protibakterijska obramba; dozorevanje DC, proliferacija limfocitov B, razvoj limfocitov Th1	Ne-metilirana citidin-gvanin DNA
<i>TLR10</i>	Na membrani celic	Vloga pri kemotaksi nevtrofilcev	
<i>TLR11*</i>	Na membrani celic	Obramba proti uropatogenim bakterijam in bakteriji <i>Toxoplasma gondii</i>	Profilin
<i>TLR12*</i>		Obramba proti bakteriji <i>Toxoplasma gondii</i>	Profilin
<i>TLR13*</i>	Znotraj celic	Prepozna bakterijsko RNA	bRNA

\*prisotni pri miših

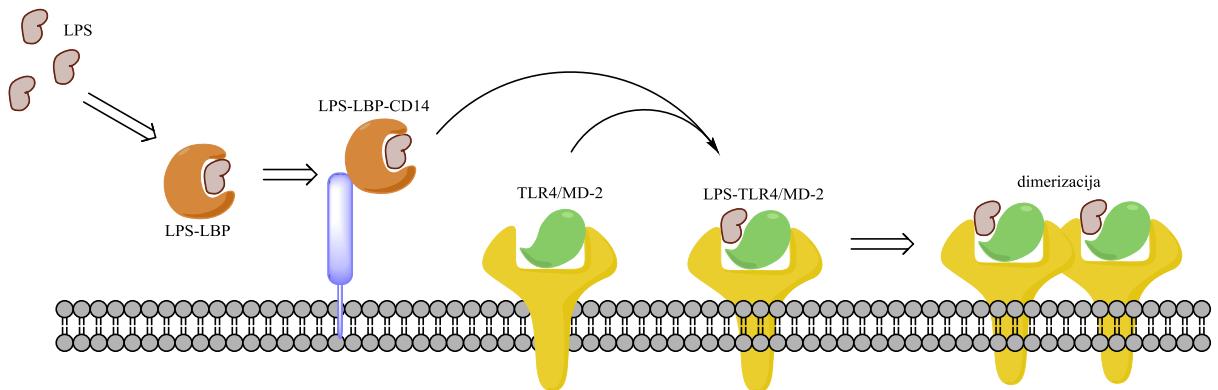
## **1.3 Receptor TLR4**

Toll-u podoben receptor 4 je transmembranski protein, katerega vezavna domena se nahaja na površini celične membrane in tam prepoznavata izvencelične PAMP. Najden je predvsem na monocitih, makrofagih, dendritičnih celicah in mastocitih ter na črevesnem epiteliju. Z genetskimi študijami je bil prvi odkrit prav ligand TLR4, in sicer LPS. Kasneje je bilo odkrito, da TLR 4 prepoznavata več eksogenih strukturnih vzorcev ter prav tako nekatere endogene snovi, kar je prikazano v preglednici III (5).

**Preglednica III: Pregled eksogenih in endogenih agonistov TLR4; povzeto po (6, 8, 13)**

<i>Prepoznavni eksogeni strukturni vzorci</i>	<i>Endogeni agonisti</i>
Lipopolisaharid	Fibrinogen
Glikoproteini virusne ovojnice	Ekstra A domena fibrinonektina
Fuzijski protein RSV	Proteini topotnega šoka (HSP60, HSP70)
Proteini ovojnice MMTV	HMGB1
	Heparan sulfat
	Beta-defenzin 2
	Fragmenti hialuronske kisline

Za aktivacijo TLR4 ni potreben samo ustrezni ligand, temveč usklajeno delovanje večih proteinov. LPS, kot najpogosteji ligand TLR4, je v krvnem serumu vezan na LPS-vezavni protein (LBP), ki je odgovoren za predstavljanje LPS ustremnemu receptorju. Najprej LPS sprejme membranski protein CD14, ki deluje kot koreceptor TLR4. Sam ni sposoben prenosa signala naprej v celico, zato kot kompleks LPS-LBP-CD14 aktivira TLR4. Neaktiviran receptor je v heterodimernem kompleksu s proteinom MD-2, ki se nahaja na ekstracelularni domeni le-tega (združitev z receptorjem poteče že v endoplazemskem retikulumu). MD-2 je nujna koreceptorska molekula, saj omogoča vezavo LPS na heterodimerni kompleks TLR4/MD-2. Ob uspešni aktivaciji TLR4, se ta v dimeru z dodatnim TLR4, internalizira in sproži signalno kaskado, ki vodi v nastajanje vnetnih mediatorjev (7).



**Slika 2:** Prikaz vezave agonista LPS na TLR4, vse od vstopa v polno kri do končne dimerizacije in internalizacije kompleksa LPS-TLR/MD-2 v notranjost celice, ki vodi v začetek signalne kaskade; povzeto po (7)

Za razliko od ostalih receptorjev TLR, TLR4 ob aktivaciji uporablja dve signalni poti. Ob aktivaciji receptorja se preko citosolne TIR domene receptorja aktivirajo adaptorne signalne molekule, kot so MyD88, TIRAP, TRIF in TRAM, ki so odgovorne za začetek signalne kaskade. Aktiviran TLR4 uporabi adaptorni molekuli MyD88 in TIRAP za začetek MyD88-odvisne signalne poti, ki preko transkripcijskih faktorjev NF- $\kappa$ B in MAPK vodi do nastanka vnetnih citokinov. Ta pot je večinoma uporabljena tudi pri ostalih receptorjih TLR. Poleg te pa lahko TLR4 aktivira tudi adaptorni molekuli TRIF in TRAM, ki sprožita od MyD88-neodvisno signalno kaskado, ki preko transkripcijskega faktorja IRF3 vodi v nastajanje interferonov tipa 1 (5, 13, 14).

Zaradi svojega položaja v strukturi naravnega imunskega sistema je TLR4, tako kot ostali receptorji TLR, potencialna tarča razvoja zdravil za zdravljenje bolezni povezanih z vnetjem, ki je posledica prekomerne ekspresije in aktivacije receptorja (sepsa, ateroskleroza) ali bolezni, povezanih s pomanjkljivim odzivom imunskega sistema na nefiziološko stanje organizma (rak, multipla skleroza, nalezljive bolezni). S poznavanjem kristalne strukture TLR4 in ključnih interakcij med proteinimi, je načrtovanje in razvoj agonistov in antagonistov postal pomembno in zelo raziskovano področje. Kar nekaj spojin je tako že doseglo klinična testiranja, a zelo različni rezultati nakazujejo potrebo po nadaljnem razvoju novih spojin (17, 18).

## **1.4 Antagonizem TLR4**

Razvoj novih antagonistov receptorjev TLR, predvsem pa antagonistov TLR4, je pomembno in trenutno zelo raziskovano področje, katerega namen je modulacija imunskega odziva. Pogosto je prav pretiran imunski odziv, kot posledica prekomerne stimulacije TLR4, odgovoren za neželen razvoj in potek nekaterih bolezni (sepsa in septični šok, ateroskleroza, bolezni jeter, miokardna odpoved, koronarni sindrom, akutna ledvična odpoved, astma, kronična in nevropatska bolečina) ter lahko privede tudi do življensko ogrožajočih stanj (19, 20, 21, 26).

### **1.4.1 Vloga antagonistov TLR4 pri posameznih boleznih**

**Sepsa in septični šok.** Gre za stanji porušene homeostaze organizma, ki je posledica hude sistemsko okužbe s patogeni. Najpogosteje endotoksin oziroma lipopolisaharid (LPS), kot glavni sestavni del zunanje membrane Gram-negativnih bakterij, aktivira TLR4 in sproži kaskado dogodkov, ki vodi v sproščanje citokinov in drugih vnetnih mediatorjev iz monocitov ter makrofagov. V primeru sepse je odziv imunskega sistema oziroma odziv TLR4 na stimuluse prekomeren, posledično pa je koncentracija sproščenih vnetnih mediatorjev (predvsem TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  in IL-6) previsoka. Za telo je takšna koncentracija vnetnih mediatorjev bolj škodljiva kot primarna okužba, saj le-ti škodljivo vplivajo tudi na druge organske sisteme v telesu, kar vodi v zelo povišano telesno temperaturo, šok, odpovedi organov in v končnem primeru tudi smrt. Namen antagonistov TLR4 pri akutnem zdravljenju sepse in septičnega šoka je ustavljanje prekomernega sistemskoga odziva na okužbo s patogeni in s tem omogočanje preživetja (19, 22).

**Ateroskleroza.** Debeljenje in otrditev sten arterij je posledica kroničnega vnetnega procesa, katerega ključna komponenta je odziv naravnega imunskega sistema s PRR (predvsem receptorji TLR). Ti so normalno prisotni v stenah arterij, a so na vnetnih mestih, predvsem pa v aterosklerotičnih plakih pretirano aktivirani in tako proizvajajo velike količine vnetnih mediatorjev (predvsem IL-6 in MMP-9). Tako pospešujejo vnetni proces in napredovanje bolezni ter tudi kasnejše zaplete, kot je na primer pretrganje aterosklerotičnega plaka. Antagonisti TLR4 naj bi zmanjšali nastanek aterosklerotičnih lezij in kronično vnetje ter tako veliko pripomogli k upočasnitvi razvoja bolezni (21, 23, 24).

**Bolezni jeter.** Alkoholna bolezen jeter (steatoza, alkoholni hepatitis in ciroza), nealkoholna bolezen jeter (steatoza, kronično vnetje in progresivna fibroza) in hepatocelularni karcinom (kronično vnetje, fibroza in ciroza; predvsem z vnetjem-povezan razvoj raka) so bolezni, kjer imajo pomembno vlogo pri razvoju in napredovanju receptorji TLR oziroma natančneje TLR4. Pri vsaki izmed naštetih kroničnih bolezni jeter, prekomerna aktivacija TLR4 povzroči množično sproščanje vnetnih mediatorjev (predvsem TNF $\alpha$ , IL-6 in ROS). Ti negativno vplivajo na jetrne celice in večajo obseg poškodb jeter. Antagonisti TLR4 bi zmanjšali prekomerno sproščanje vnetnih mediatorjev in tako zavrli razvoj bolezni (19, 25).

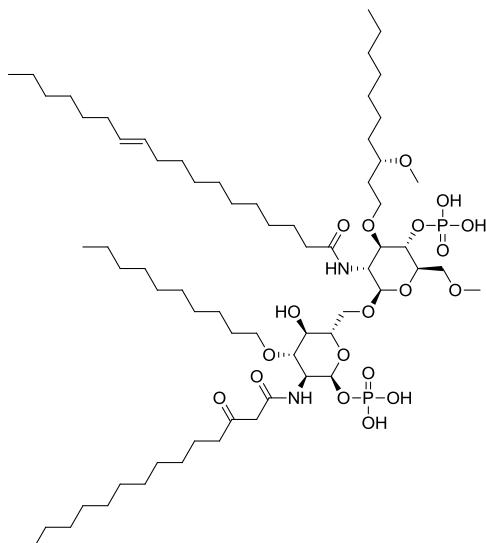
**Nevropsatska bolečina.** Gre za stanje nenehno prisotne kronične bolečine, ki je posledica patoloških sprememb živčnega sistema. Kljub različnim farmakološkim skupinam učinkovin (opiidi, antagonisti receptorjev NMDA, agonisti receptorjev GABA, triciklični antidepresivi, lokalni anastetiki), razvitih z namenom lajšanja simptomov, ti prepogosto niso dovolj učinkoviti ali pa imajo veliko neželenih stranskih učinkov. Zato je bilo, z namenom preprečevanja nastanka in razvoja patoloških sprememb, ugotovljeno, da bi lahko bil prav TLR4 neposredno odgovoren za začetek razvoja sprememb. Kot posledica periferne poškodbe živca, naj bi v celicah mikroglij CŽS prišlo do prekomerne aktivacije TLR4 in posledičnega nastajanja vnetnih mediatorjev, kar vodi v preoblikovanje bolečinskih poti živčnega sistema in končno v kronično bolečino brez vidnega izvora. Antagonisti TLR4 bi preprečili patološke spremembe živčnega sistema in nadomestili sedanje simptomatsko zdravljenje nevropsatske bolečine (19, 27).

#### 1.4.2 Razvoj antagonistov TLR4

Namen antagonistov TLR4 je preprečevanje prekomerne aktivacije in nadaljne signalne kaskade, ki pripelje do sproščanja visoke koncentracije vnetnih mediatorjev. Tarče so poleg samega TLR4, lahko tudi LBP, CD-14 ali MD-2 proteini, saj z antagonizmom le-teh prav tako dosežemo preprečevanje aktivacije prirojenega imunskega sistema. Trenutno je v razvoju kar nekaj različnih vrst antagonistov TLR4, in sicer so to lahko monoklonska protitelesa delujoča proti TLR4 in kompleksu TLR4/MD-2, sintezni analogi lipida A (modificiran vezavni del LPS) ali pa majhne, sintezno pridobljene inhibitorne molekule TLR4. Medtem ko so nekatere spojine obetavne v kliničnih testiranjih, pa ima večina novih antagonistov probleme z nizko aktivnostjo spojin, farmakološkimi neželenimi učinki

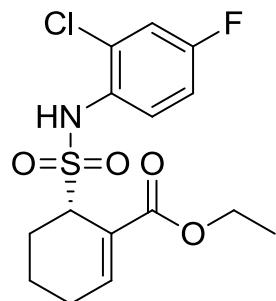
in neselektivnim delovanjem na tarčo. Prihodnost načrtovanja antagonistov TLR4 je poznavanje kristalne strukture TLR4 in ključnih interakcij med proteini, ki omogoča racionalno načrtovanje učinkovin (rational drug design), kjer z računalniško podprtим pristopom pridobivamo nove spojine zadetke. Poleg racionalnega načrtovanja trenutno potekajo raziskave na področju mikro-RNA antagonistov TLR receptorjev, ki so pomembne pri regulaciji genov, udeleženih pri imunskega odziva ter manipulaciji signalnih kaskad TLR receptorjev z virusnimi nukleinskimi kislinami in proteinimi (17, 28, 29).

**Eritoran** (E5564) je pol-sintezni analog lipida A 2. generacije, delno pridobljen iz strukture šibkega antagonista endotoksina iz bakterije *R. sphaeroides*. Deluje kot antagonist signalne kaskade TLR4, saj se veže v hidrofobni žepki na proteinu MD-2 (kompetitivno inhibira LPS). Kot zdravilo za zdravljenje hude sepse in septičnega šoka je dosegel 3. fazo kliničnih testiranj, a so bila ta prekinjena (marec 2011), saj ni bilo zaznati statistično signifikantne aktivnosti pri pacientih s sepsom. To je bil nepričakovani rezultat, saj je v živalskih modelih in 2. fazi kliničnih testiranj kazal zelo obetavne rezultate. Pred kratkim je bila objavljena nova študija na živalskem modelu z uporabo eritorana, in sicer naj bi uporaba le-tega preprečila smrtnost pri miših okuženih z influenco. Prav tako naj bi uporaba eritorana preprečila patološke spremembe pljuč, klinične simptome, znižala koncentracijo vnetnih mediatorjev in prisotnost virusnih titrov. Kljub neuspehu v kliničnih testiranjih pri zdravljenju sepse, ima eritoran, kot močan antagonist TLR4, še vedno dobre terapevtske potencialne za zdravljenje drugih, bolj lokaliziranih vnetnih procesov (30-32).



Slika 3: Struktura eritorana; povzeto po (30)

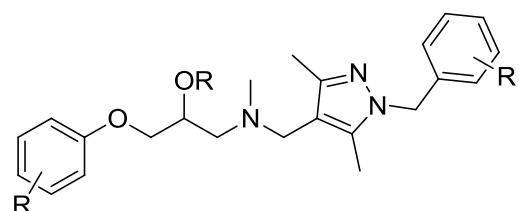
**Resatorvid** (TAK-242) je specifičen, nizko-molekularni inhibitor signalne kaskade TLR4, ki se veže na intracelularno domeno TLR4. Mehanizem delovanja, v katerem inhibira nastanjanje vnetnih mediatorjev, pa kljub vsemu še vedno ni znan. Kot zdravilo za zdravljenje hude sepse in septičnega šoka je dosegel 3. fazo kliničnih testiranj, a so bila ta prekinjena (februar 2009), saj zdravilo ni prikazalo zahtevane učinkovitosti. Nova študija na živalskem modelu z uporabo resatorvida je pokazala terapevtski potencial spojine pri zdravljenju možganske kapi. Prikazali so, da je imunološka vnetna reakcija, ki sledi ishemični-reperfuzijski poškodbi direktna posledica aktivacije TLR4, kjer intracerebroventrikularna injekcija resatorvida signifikantno zmanjša volumen infarkta in izboljša rezultat nevrološkega testa na živalskem modelu. Prav tako se resatorvid aktivno uporablja pri raziskovanju ozadja vnetnih procesov pri nekaterih bolezenskih stanjih (inzulinska rezistenca v mišičnih celicah) (33-36).



Slika 4: Struktura TAK-242; povzeto po (33)

**NI-0101** je anti-TLR4 monoklonsko protitelo razvito z namenom preprečevanja signalne kaskade pri boleznih, kjer bi te sprožile prekomeren imunski odziv (predvideno pri akutnem in kroničnem vnetju). Veže se na epitope TLR4 in prepreči dimerizacijo le-tega, kar prepreči aktivacijo receptorja. V marcu 2013 je kot prvo monoklonsko protitelo za anti-TLR4 vstopilo v 1. fazo kliničnega testiranja na zdravih prostovoljcih z namenom ovrednotenja varnosti, tolerance, distribucije in eliminacije novega zdravila (17, 37, 38).

**β-aminoalkoholni derivati** so nizko-molekularni inhibitorji kompleksa TLR4/ MD-2. Najdeni s pomočjo virtualnega rešetanja na osnovi kristalne strukture TLR4, naj bi preprečevali vnetje na sistemski ravni (sepsa). Kljub obetavnim računalniškim rezultatom, pa imajo spojine citotoksične lastnosti pri koncentraciji  $100\mu\text{M}$ , predvidena aktivnost pa ni bila potrjena v *in vitro* ter *in vivo* testih izvedenih na Fakulteti za farmacijo (39-41).



Slika 5: Struktura formula za β-aminoalkoholne derivate; povzeto po (40)

**1-(4-fluorofenil)-2-(5-(2-hidroksi-5-metoksibenzoil)pirimidin-2-il)gvanidin** (spojina 1) je novi, nizko-molekularni inhibitor kompleksa TLR4/MD-2. Kot zadetek (ang. »hit«) je bila izbrana med 45 spojinami, najdenimi z virtualnim rešetanjem na Fakulteti za farmacijo. Omejujoči kriteriji so bili zadovoljiva topnost v vodi do koncentracije  $500\mu\text{M}$  in ne-citotoksičnost pri koncentraciji  $100\mu\text{M}$  (ob pozitivni kontroli z DMSO). Spojina je kazala *in-vitro* antagonistično aktivnost na TLR4 z  $\text{IC}_{50}$  vrednostjo  $16,6\mu\text{M}$  (41).



Slika 6: Struktura spojine 1; povzeto po (41)

## 2 NAMEN DELA

Glavna naloga magistrske naloge bo sinteza novih, potencialnih antagonistov TLR4, derivatov spojine zadetka (spojina **1**), najdene s pomočjo virtualnega rešetanja na Fakulteti za farmacijo, z dokazanim antagonističnim delovanjem na TLR4 (41). Postavili smo si sledeče cilje:

1.) Začeli bomo s ponovitvijo sinteze spojine **1**, saj je bila le-ta kupljena in je zato potrebno preveriti, če tudi sveže sintetizirana spojina kaže antagonistično delovanje na TLR4.



Slika 7: Struktura spojine **1**; povzeto po (41)

2.) Sledila bo sinteza in ovrednotenje derivatov spojine **1**, z namenom ugotavljanja odnosa med strukturo in delovanjem spojin (SAR), kar bo v prihodnje omogočilo še bolj usmerjen razvoj derivatov.

3.) Ker so literaturni sintezni postopki kar precej zahtevni in dolgotrajni, ter uporabljeni reagenti nevarni, bomo poskusili optimizirati posamezne stopnje reakcije. Cilj bodo varne in kratkotrajnejše reakcije z visokimi izkoristki, skušali pa se bomo tudi izogniti čiščenju reakcijskih zmesi s kolonsko kromatografijo.

4.) Sintetiziranim spojinam bo določena topnost v celičnem mediju, njihova citotoksičnost na celični liniji HEK 293 in jakost antagonističnega delovanja na TLR4.

### **3 MATERIALI IN METODE**

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

Uporabljeni reagenti so bili: 1-(piridin-3-ilmetil)piperazin, 2,6-dihidroksiacetofenon, 2-hidroksi-5-metoksiacetofenon, 2-hidroksi-6-metoksi-acetofenon, 4-fluoroanilin, cianogvanidin, fosgen, izopropanol, kalijev hidroksid, LPS, morfolin, ocetna kislina, oksalil klorid, TAK-242, TMS-Cl.

Topila, ki smo jih uporabljali pri sintezi in čiščenju: acetonitril, aceton, dietileter, diklorometan, etilacetat, metanol, DMF, heksan, petroleter, prečiščena voda, THF.

#### ***Ostala laboratorijska oprema***

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

#### ***Kromatografske metode***

##### ***Tankoplastna kromatografija (TLC)***

Za izvedbo TLC smo uporabili plošče Silikagel 60 F254 proizvajalca Merck z 0,2 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu, kateremu je bil dodan fluorescenčni indikator. Za razločevanje lis na kromatografski ploščici smo uporabljali UV svetlobo valovne dolžine 254 nm ali 366 nm. Občasno smo za identifikacijo lis uporabili reagent za oroševanje-ninhidrin (15 mg/mL ninhidrina, raztopljenega v 96 % etanol/ocetna kislina = 5/1). Uporabljene mobilne faze so opisane pri posameznih sintezah.

##### ***Kolonska kromatografija***

Za čiščenje s »flash« kolonsko kromatografijo, smo uporabili Silikagel 60 (0,040 - 0,063 mm) proizvajalca Merck. Uporabljene mobilne faze so opisane pri posameznih sintezah.

## *Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)*

Za določevanje čistosti spojin smo uporabili reverzno-fazno HPLC analizo na Agilent 1100 sistemu, opremljenem s kvarterno črpalko in detektorjem večih valovnih dolžin. Uporabljena kolona Agilent Eclipse Plus C18 je 5 $\mu$ m (4,6 x 50 mm) kolona s pretokom 1.0 mL/min in detekcijo pri 254 nm. Elucijski sistem sta sestavljali spojina A (0,1 % TFA in H<sub>2</sub>O) in spojina B (metanol). Gradient za metodo je bil prvih 20 minut 10 % B → 90 % B z A, med 20. in 25. minuto 90 % B z A ter med 25. in 30. minuto 90 % B → 10 % B z A. Kolona je bila ves čas termostatirana pri 25°C. Določena relativna čistoča vseh testiranih spojin je presegala zahtevanih 95,0 %.

## *Spektroskopske metode*

### *Jedrska magnetna resonanca*

<sup>1</sup>H-NMR in <sup>13</sup>C-NMR spektri so bili posneti na Brucker Avance spektrometru na Fakulteti za farmacijo. Uporabili smo devterirana topila: aceton, CDCl<sub>3</sub>, DMSO in metanol ter interni standard TMS. Kemijske premike smo podali v »parts per million« (ppm) in skloplitvene konstante (*J*) v hertzih (Hz). Analizo NMR spektrov smo izvedli na računalniškem programu MestReNova 8.1 proizvajalca Mestrelab Research S.L.

### *Masna spektroskopija*

Masni spektri so bili posneti na masnem spektrometru VG-Analytical Autospec Q mass proizvajalca Micromass, z ESI in HRMS tehniko v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

### *Določanje temperatura tališča*

Temperature tališč smo določali na mikroskopu Leica z ogrevalno mizico in so nekorigirane.

### *Risanje in poimenovanje struktur spojin*

Za risanje in poimenovanje novih struktur spojin smo uporabili računalniški program ChemDraw Ultra 12.0 proizvajalca CambridgeSoft in za risanje slik ter shem računalniški program ChemBioDraw Ultra 13.0 proizvajalca CamebridgeSoft.

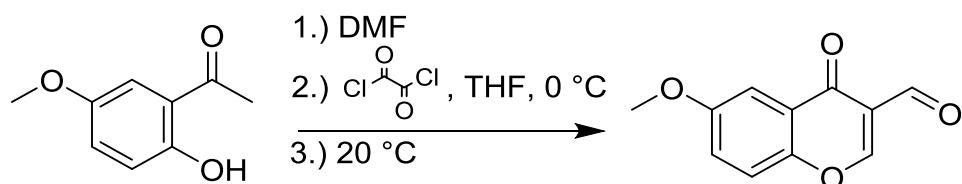
## ***Mikrovalovni reaktor***

Za nekatere stopnje sinteze smo uporabili mikrovalovni reaktor CEM Discover z IR in optičnim načinom merjenja temperature.

## 4 EKSPERIMENTALNI DEL

### 4.1 Sinteza spojine 1

1. stopnja: sinteza spojine 2



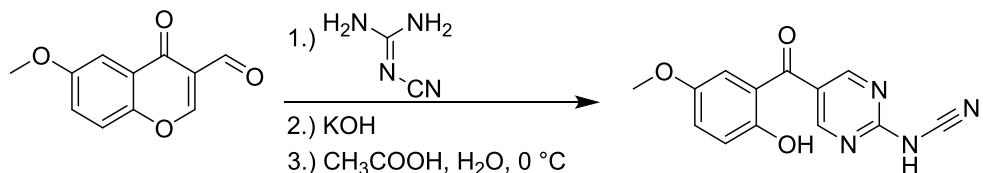
Slika 8: Reakcijska shema sinteze spojine 2

V suho (prežarjeno z grelno pištolo in prepahano z argonom) bučko smo zatehtali *2-hidroksi-5-metoksiacetofenon* (1,16 g, 7,0 mmol) in ga raztoplili v *brezvodnem DMF* (5 ml). Bučko smo postavili na ledeno kopel in med prepihovanjem z argonom po kapljicah dodajali *oksalil klorid* (3,1 mL, 35,0 mmol) raztopljen v *brezvodnem THF* (20 mL). Po 30 minutah mešanja na ledeni kopeli, smo mešali 12 ur pri sobni temperaturi. Zmes smo nato zlili na led med mešanjem, čemur je sledila ekstrakcija z diklorometanom (3x50 mL), spiranje organske faze z nasičeno raztopino NaCl (50 mL) ter na koncu še dodatek natrijevega sulfata. Po filtraciji so med odparevanjem topila pod znižanim tlakom (rotavapiranjem), začeli izpadati kristali, zato smo dodali dietileter in pospešili izpadanje le-teh. Kristale smo ločili s filtracijo s presesavanjem, kjer je TPK analiza pokazala, da smo dobili čiste kristale. Matičnico smo ponovno zgostili na rotavaporju, nato dodali še malo petroletra in ohladili na -18 °C. Po pol ure smo ponovno s filtracijo s presesavanjem izolirali kristale čistega produkta.

IUPAC ime	<b>6-metoksi-4-okso-4H-kromon-3-karbaldehid</b>
Izgled	beli kristali
Izkoristek reakcije	97 %
MF	etilacetat:heksan = 2:1
Rf	0,49
T <sub>tal</sub>	159-165 °C
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ 3.94 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 7.33 (dd, J = 9.2, 3.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.49 (d, J = 9.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.66 (d, J = 3.1 Hz, 1H,

	Ar-H), 8.55 (s, 1H, Ar-H), 10.41 (s, 1H, CHO)
ESI-HRMS	Izračunano za C <sub>11</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> (m/z): <b>204,1801</b> [M+H] <sup>+</sup>
	Izmerjena vrednost (m/z): <b>205,0501</b>

## 2. stopnja: sinteza spojine 3



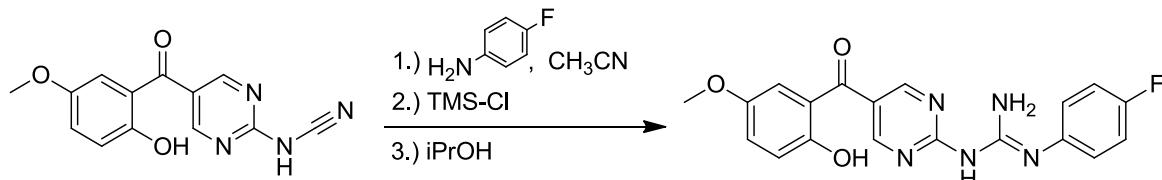
Slika 9: Reakcijska shema sinteze spojine 3

Suhov vialo za mikrovalovni reaktor smo prepihali z argonom, dodali produkt 1. stopnje *6-metoksi-4-okso-4H-kromon-3-karbaldehid* (spojina **2**; 0,84 g, 4,1 mmol) in *cianogvanidin* (0,52 g, 6,2 mmol) ter raztopili v *brezvodnem absolutnem etanolu*. Nato smo reakcijski zmesi dodali *kalijev hidroksid* (0,66 g, 11,7 mmol) in vse skupaj segrevali 20 minut v mikrovalovnem reaktorju pri 120 °C. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes zlili na zdrobljen led in vialo sprali z vodo. Z ocetno kislino smo nakisali do pH 4 oz. 5 (prej je bilo okoli 9), kjer so izpadli kristali spojine, ki smo jih izolirali s filtracijo z odsesavanjem. Na TLC ploščici smo videli, da so bili v matičnici le še sledovi produkta, zato smo jo zavrgli. Izolirane kristale smo posušili in stehtali.

IUPAC ime	<b>N-(5-(2-hidroksi-5-metoksibenzoil)pirimidin-2-il)cianamid</b>
Izgled	rumeni kristali
Izkoristek reakcije	69 %
MF	etilacetat
Rf	0,21
T <sub>tal</sub>	nad 300 °C
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 3.71 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 6.84 (d, J = 3.1 Hz, 1H, Ar-H), 6.88 (d, J = 8.9 Hz, 1H, Ar-H), 6.99 (dd, J = 8.9, 3.1 Hz, 1H, Ar-H), 8.43 (s, 2H, Ar-H), 9.76 (s, 1H, OH), 11.99 (s, 1H, NH)
HPLC Rt	13,837 min

ESI-HRMS	Izračunano za C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> (m/z): <b>271,2402</b> [M+H] <sup>+</sup>
	Izmerjena vrednost: <b>271,0831</b>

### 3. stopnja: sinteza spojine 1



Slika 10: Reakcijska shema sinteze spojine 1

V suho vialo za mikrovalovni reaktor, smo natehtali produkt 2. stopnje *5-(2-hidroksi-5-metoksibenzoil)pirimidin-2-il cianamid* (0,10 g, 0,37 mmol), dodali *4-fluoroanilin* (39,1 µL, 0,41 mmol) in *acetonitril* (3 mL) kot topilo ter dobro premešali. Nazadnje smo v argonovi atmosferi dodali še *TMS-Cl* (104,1 µL, 0,81 mmol), zaprli in segrevali 12 minut v mikrovalovnem reaktorju pri 160 °C. Po pretečenem času se je reaktor začel ohlajati in ko je temperatura reakcijske zmesi dosegljala okoli 60 °C, smo dodali zmesi izopropanol, ki je zaustavil reakcijo. Vialo smo zaprli, stresali 10 sekund in nato segrevali v mikrovalovnem reaktorju pri 125 °C še 30 sekund. Zmes smo ohladili na sobno temperaturo in vsebino prestavili v bučko. Sledilo je čiščenje s kolonsko kromatografijo (začnemo z etilacetat/heksan = 2:1, nato etilacetat in na koncu etilacetat/metanol = 10:1).

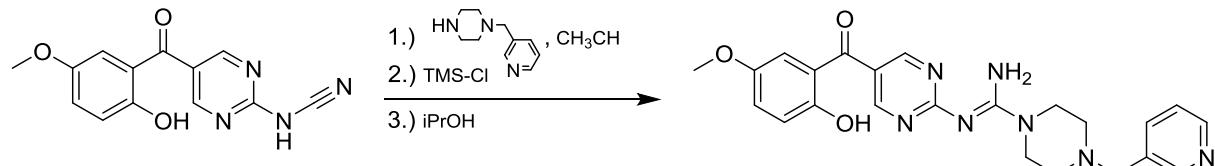
Reakcija je potekla izjemno slabo, saj smo na TLC ploščici po nanosu in razvijjanju reakcijske zmesi dobili množico lis brez očitno izstopajoče lise produkta in s številnimi stranskimi produkti. Izolacija spojine s pomočjo kolonske kromatografije je bila izjemno zahtevna, a tudi po čiščenju nismo uspeli izolirati povsem čiste spojine. Na koncu smo dobili ravno dovolj spojine za izvedbo NMR spektroskopije, kjer smo iz spektra lahko razbrali nastanek našega produkta, a ga je bilo žal premalo za vse nadaljnje analize in testiranja.

IUPAC ime	<b>1-(4-fluorofenil)-2-(5-(2-hidroksi-5-metoksibenzoil)pirimidin-2-il)gvanidin</b>
Izgled	umazani rumenkasto-zeleni kristali
MF	etilacetat:metanol = 5:1

Rf	0,21
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 3.87 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 5.93 (s, 1H, OH), 7.16-7.22 (m, 2H, Ar-H), 7.46 (s, 1H, Ar-H), 7.47 (dd, 1H, J = 3.0, 9.0 Hz, Ar-H), 7.52 (dd, 2H, J = 5.0, 9.0 Hz, Ar-H), 7.69-7.72 (m, 1H, Ar-H), 7.89 (br s, 1H, gvanidin-H), 8.41 (s, 1H, Ar-H), 8.42 (s, 1H, Ar-H), 8.64 (s, 1H, gvanidin-H), 9.91 (s, 1H, gvanidin-H)

## 4.2 Sinteza spojine 4

1. in 2. stopnja sinteze spojine **4** je enaka kot pri sintezi spojine **1**.



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

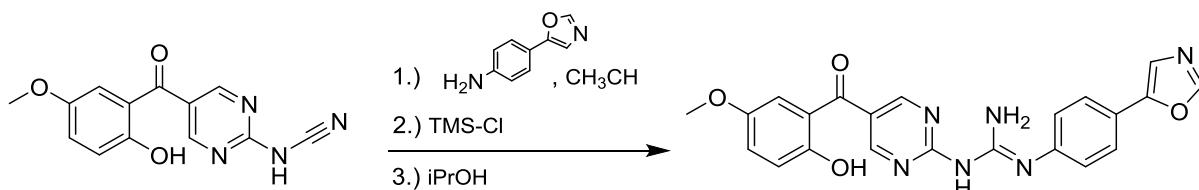
Zatehtali smo produkt 2. stopnje *5-(2-hidroksi-5-metoksibenzoil)pirimidin-2-il cianamida* (spojina **3**; 0,15 g, 0,56 mmol) in *1-(piridin-3-ilmetil)piperazin* (0,25 g, 1,4 mmol) ter prenesli v suho vialo za mikrovalovni reaktor, opremljeno z magnetnim mešalom. Kot topilo smo dodali *acetonitril* (4 mL) ter dobro premešali. V argonovi atmosferi smo nato dodali še *TMS-Cl* (156,1 μL, 1,2 mmol), zaprli in segrevali 12 minut v mikrovalovnem reaktorju pri 160 °C. Po 12 minutah smo v vialo k reakcijski zmesi dodali izopropanol, ki je zaustavil reakcijo. Epruveto smo zaprli, stresali 10 sekund in nato segrevali v mikrovalovnem reaktorju pri 125 °C še 30 sekund. Zmes smo ohladili na sobno temperaturo in vsebino prestavili v bučko. Sledilo je čiščenje s kolonsko kromatografijo (začnemo z etilacetat/heksan = 2:1, nato etilacetat in na koncu etilacetat/metanol = 10:1).

IUPAC ime	<b>N'-(5-(2-hidroksi-5-metoksibenzoil)pirimidin-2-il)-4-(piridin-3-ilmetil)piperazine-1-karboksiimidamid</b>
Izgled	rumenkasti kristali
Izkoristek reakcije	6,2 %
MF	etilacetat:metanol = 4:1

Rf	0,23
T <sub>tal</sub>	214-219 °C
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, Metanol- <i>d</i> <sub>4</sub> )	δ 2.70 – 2.41 (m, 4H, piperazin-H), 3,33 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.83 – 3.59 (m, 7H, OCH <sub>3</sub> +piperazin-H), 6.95 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.05 (s, 1H, Ar-H), 7.14 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.47 (t, <i>J</i> = 6.4 Hz, 1H, piridin-H), 7.91 (s, 1H, piridin-H), 8.49 (s, 1H, piridin-H), 8.56 (s, 1H, piridin-H), 8.80 (s, 2H, Ar-H)* *3H (2 gvanidin-H+OH) so izmenjani
HPLC Rt	11,260 min
ESI-HRMS	Izračunano za C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> N <sub>7</sub> O <sub>3</sub> (m/z): <b>448,4911</b> [M+H] <sup>+</sup> Izmerjena vrednost (m/z): <b>448,2102</b>

## 4.3 Sinteza spojine 5

1. in 2. stopnja sinteze spojine **5** je enaka kot pri sintezi spojine **1**. IUPAC ime: 1-(5-(2-hidroksi-5-metoksibenzoil)pirimidin-2-il)-2-(4-(oxazol-5-il)fenil)gvanidin

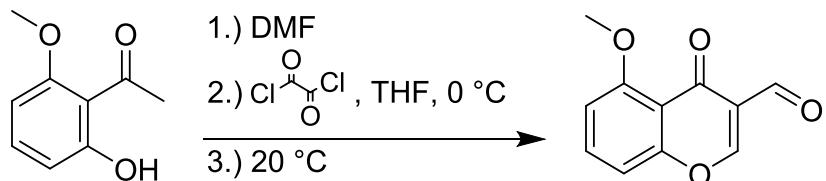


Slika 12: Reakcijska shema sinteze spojine **5**

V suho vialo smo zatehtali produkt 2. stopnje *5-(2-hidroksi-5-metoksibenzoil)pirimidin-2-il cianamida* (spojina **3**; 0,15 g, 0,56 mmol), dodali *4-(oksazol-5-il)anilin* (0,098 g, 0,61 mmol) in kot topilo *acetonitril* (vsaj 6 mL). V argonovi atmosferi smo nato dodali še *TMS-Cl* (156,1  $\mu$ L, 1,2 mmol), zaprli in segrevali v mikrovalovnem reaktorju (12 minut pri 160 °C). Po 12 minutah smo v vialo k reakcijski zmesi dodali izopropanol, ki je zaustavil reakcijo. Epruveto smo zaprli, stresali 10 sekund in nato segrevali v mikrovalovnem reaktorju pri 125 °C še 30 sekund. Zmes smo ohladili na sobno temperaturo in vsebino prestavili v bučko. Naslednji dan smo zmesi dodali še nekaj etilacetata kot topilo ter pripravili zmes za čiščenje s kolonsko kromatografijo. S pomočjo TLC in NMR analize smo ugotovili in potrdili, da reakcija ni potekla.

## 4.4 Sinteza spojine 8

1. stopnja: sinteza spojine 6

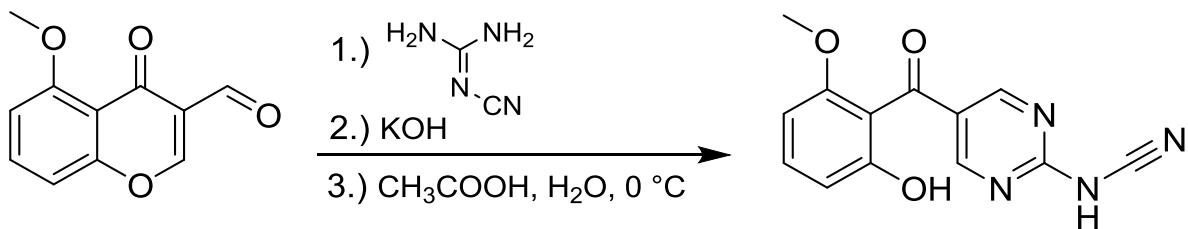


Slika 13: Reakcijska shema sinteze spojine 6

V suho bučko smo zatehtali *2-hidroksi-6-metoksiacetofenon* (0,78 g, 4,7 mmol) in ga raztopili v *brezvodnem DMF* (5 ml). Dobljeno raztopino smo ohladili na vodenih kopeli in po kapljicah dodajali *oksalil klorid* (2,1 mL, 23,5 mmol) raztopljen v *brezvodnem THF* (20 mL) ob prepihavanju z argonom. Po 30 minutah mešanja na ledeni kopeli smo mešali 12 ur pri sobni temperaturi. Po pretečenem času smo zmes zlili na led med mešanjem, čemur je sledila ekstrakcija z diklorometanom (3x50 mL), združene organske faze pa smo spirali z nasičeno raztopino NaCl (50 mL) in sušili z natrijevim sulfatom. Po filtraciji so med odparevanjem topila pod znižanim tlakom, začeli izpadati kristali, zato smo dodali dietileter in pospešili izpad le-teh. Kristale smo odfiltrirali z odsesavanjem, matičnico pa smo ponovno zgostili na rotavaporju, nato dodali še malo petroletra in ohladili na -18 °C. Po pol ure smo ponovno izolirali kristale s filtracijo z odsesavanjem.

IUPAC ime	<b>5-metoksi-4-okso-4H-kromon-3-aldehid</b>
Izgled	umazano beli kristali
Izkoristek reakcije	83 %
MF	etilacetat:heksan = 2:1
Rf	0,39
T <sub>tal</sub>	125-131°C
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ 4.03 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 6.92 (dd, J = 8.4, 0.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.09 (dd, J = 8.4, 0.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.64 (t, J = 8.4 Hz, 1H, Ar-H), 8.41 (s, 1H, Ar-H), 10.37 (s, 1H, CHO)
ESI-HRMS	Izračunano za C <sub>11</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> (m/z): <b>204,1801</b> [M+H] <sup>+</sup> Izmerjena vrednost (m/z): <b>205,0501</b>

## 2. stopnja: sinteza spojine 7

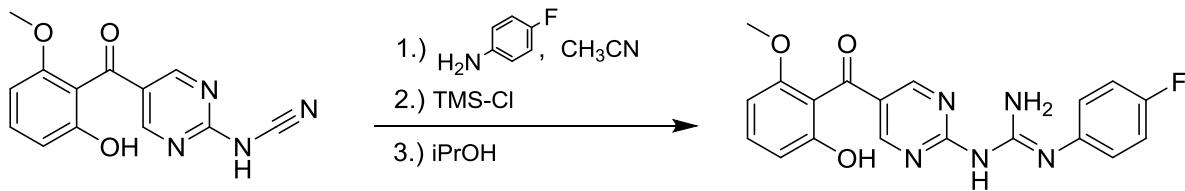


Slika 14: Reakcijska shema sinteze spojine 7

V suho z argonom prepihano vialo smo natehtali produkt 1. stopnje *5-metoksi-4-okso-4H-kromon-3-karbdehyd* (spojava **6**; 0,7 g, 3,4 mmol) in *cianogvanidin* (0,44 g, 5,3 mmol) ter raztopili v *brezvodnem absolutnem etanolu*. Reakcijski zmesi smo dodali še *kalijev hidroksid* (0,55 g, 9,8 mmol) in vse skupaj segrevali 20 minut v mikrovalovnem reaktorju pri 120 °C. Po pretečenem času smo ohladili vialo na sobno temperaturo, nato pa reakcijsko zmes zlili na zdrobljen led in vialo sprali z vodo. Z ocetno kislino smo nakisali do pH 4 oz. 5, da so izpadli kristali spojine, ki smo jih izolirali s filtracijo z odsesavanjem. Izolirane kristale smo posušili in stehtali.

IUPAC ime	<i>N-(5-(2-hidroksi-6-metoksibenozoi)pirimidin-2-il)cianamid</i>
Izgled	oranžni kristali
Izkoristek reakcije	64 %
MF	etilacetat
Rf	0,23
T <sub>tal</sub>	nad 300 °C
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 3.66 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 4.03 (q, J = 7.1 Hz, 1H, NH), 6.56 (ddd, J = 8.2, 4.9, 0.8 Hz, 2H, Ar-H), 7.22 (t, J = 8.3 Hz, 1H, Ar-H), 8.40 (s, 2H, Ar-H), 9.76 (s, 1H, OH)
<sup>13</sup> C-NMR (100 MHz, Aceton)	δ 55.51, 102.14, 108.62, 115.30, 119.48, 119.54, 130.68, 155.05, 157.20, 159.42, 169.11, 189.84
HPLC Rt	11,150 min
ESI-HRMS	Izračunano za C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> (m/z): <b>271,2402</b> [M+H] <sup>+</sup> Izmerjena vrednost (m/z): <b>271,0831</b>

### 3. stopnja: sinteza spojine 8



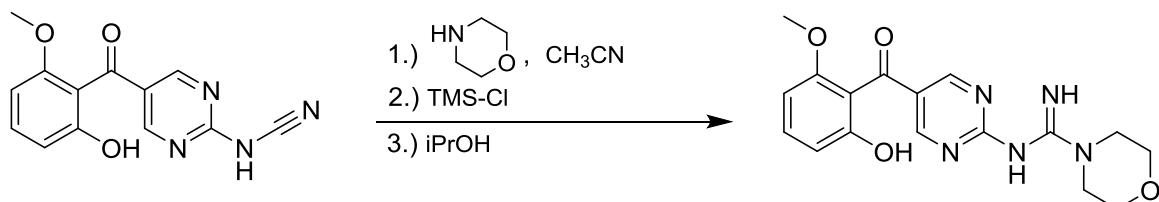
**Slika 15:** Reakcijska shema sinteze spojine 8

V suho vialo z magnetnim mešalom smo natehtali produkt 2. stopnje *5-(2-hidroksi-6-metoksibenzoil)pirimidin-2-il cianamida* (spojava 7; 0,17 g, 0,61 mmol), mu dodali *4-fluoroanilin* (64,5 µL, 0,67 mmol), in *acetonitril* (4 mL) ter dobro premešali. Nazadnje smo dodali še *TMS-Cl* (171,7 µL, 1,3 mmol) in reakcijsko zmes segrevali 12 minut v mikrovalovnem reaktorju pri 160 °C. Po pretečenem času smo reakcijski zmesi dodali izopropanol, ki je zaustavil reakcijo. Epruveto smo zaprli, stresali 10 sekund in nato segrevali v mikrovalovnem reaktorju pri 125 °C še 30 sekund. Ko se je epruveta ohladila na sobno temperaturo, smo vsebino prestavili v bučko. Sledilo je čiščenje s kolonsko kromatografijo (začnemo z etilacetat/heksan = 2:1, nato etilacetat in na koncu etilacetat/metanol = 10:1).

IUPAC ime	<b>2-(4-fluorofenil)-1-(5-(2-hidroksi-6-metoksibenzoil)pirimidin-2-il)gvanidin</b>
Izgled	svetlo rumeni kristali
Izkoristek reakcije	40 %
MF	etilacetat:metanol = 10:1
Rf	0,25
T <sub>tal</sub>	129-135 °C
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ 3.67 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 6.58 (td, J = 7.6, 6.9, 2.1 Hz, 2H, Ar-H), 7.18 (dt, J = 9.7, 4.8 Hz, 2H, Ar-H), 7.26 (td, J = 8.3, 2.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.53 (dt, J = 7.8, 3.7 Hz, 2H, Ar-H), 8.04 (br s, 2H, gvanidin-H), 8.65 (m, 2H, Ar-H), 9.59 (s, 2H), OH+gvanidin-H)
<sup>13</sup> C-NMR(100 MHz, Aceton)	δ 55.55, 102.19, 108.65, 114.94, 115.3 (d, <sup>2</sup> J <sub>C,F</sub> = 22,3 Hz), 121.40, 123.5 (d, <sup>3</sup> J <sub>C,F</sub> = 7,8 Hz), 131.01, 135.31, 155.14, 156.29, 157.25, 158.3 (d, <sup>1</sup> J <sub>C,F</sub> = 239,8 Hz), 158.68, 166.89, 190.71
HPLC Rt	14,024 min
ESI-HRMS	Izračunano za C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> F (m/z): <b>382,3602 [M+H]<sup>+</sup></b> Izmerjena vrednost (m/z): <b>382,1315</b>

## 4.5 Sinteza spojine 9

1. in 2. stopnja sinteze spojine **9** je enaka kot pri spojini **8**.



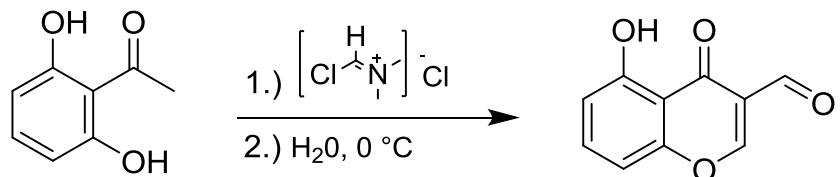
Slika 16: Reakcijska shema sinteze spojine **9**

Zatehtan produkt 2. stopnje *5-(2-hidroksi-6-metoksibenzoil)pirimidin-2-il cianamid* (spojava **7**; 0,15 g, 0,56 mmol) in *morfolin* (53,2  $\mu$ L, 0,61 mmol) smo prenesli suho vialo in dodali *acetonitril* (4 mL) ter dobro premešali. V argonovi atmosferi smo dodali še *TMS-Cl* (156,1  $\mu$ L, 1,2 mmol), zaprli in segrevali 12 minut v mikrovalovnem reaktorju pri 160 °C. Nato smo zmesi dodali izopropanol, ki je zaustavil reakcijo. Epruveto smo zaprli, stresali 10 sekund in segrevali v mikrovalovnem reaktorju pri 125 °C še 30 sekund. Ko se je reakcijska zmes ohladila na sobno temperaturo, smo jo prestavili v bučko, čemur je sledilo čiščenje s kolonsko kromatografijo (začnemo z etilacetat/heksan = 2:1, nato etilacetat in na koncu etilacetat/metanol = 10:1).

IUPAC ime	<b>N-(5-(2-hidroksi-6-metoksibenzoil)pirimidin-2-il)morfolin-4-carboksiimidamid</b>
Izgled	svetlo oranžni kristali
Izkoristek reakcije	7,8 %
MF	etilacetat:metanol = 10:1
Rf	0,22
T <sub>tal</sub>	206-212 °C
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	$\delta$ 3.35-3.44 (m, 4H, 2x morfolin-CH <sub>2</sub> ), 3.60-3.65 (m, 4H, 2x morfolin-CH <sub>2</sub> ), 3.67 (m, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 6.57-6.60 (m, 2H, Ar-H), 7.24 (t, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H, Ar-H), 8.58 (s, 2H, Ar-H), 8.68 (br s, 1H, gvanidin-H), 10.01 (br s, 2H, OH+gvanidin-H)
HPLC Rt	9,622 min
ESI-MS	(m/z): <b>358.2</b> [M+H] <sup>+</sup>

## 4.6 Sinteza spojina 12

1. stopnja: sinteza spojine 10

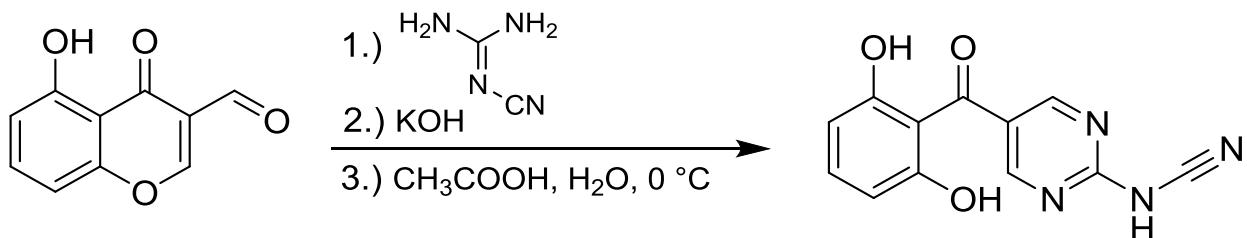


Slika 17: Reakcijska shema sinteze spojine 10

V suho z argonom prepahano bučko smo natehtali *trifosgen* (BTC; 4,2 g, 14 mmol) in ga raztopili v *dikloroetanu* (20 mL). Nastalo raztopino smo po kapljicah dodajali v bučko, ki je vsebovala mešanico *DMF* (7,2 mL; 84 mmol) in *dikloroetana* (10 mL). Raztopino smo mešali na ledeni kopeli 20 minut in nato mešali na sobni temperaturi čez noč, da je nastal *Vilismeierjev reagent*. Nato smo dodali *2,6-dihidroksiacetofenon* (1,1 g, 7 mmol) raztopljen v *dikloroetanu* (15 mL) in pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Reakcijsko zmes smo previdno zlili na mešanico ledu in vode ter pustili mešati eno uro in pol. Reakcijsko zmes smo prelili v lij ločnik in izvedli ekstrakcijo z diklorometanom (2x50 mL). Združene organske faze smo nato sprali še z nasičeno raztopino NaCl (50 mL) ter nazadnje dodali še natrijev sulfat, filtrirali in odparili topilo. Sledilo je čiščenje spojine s kolonsko kromatografijo.

IUPAC ime	<b>5-hidroksi-4-okso-4H-kromon-3-karbaldehid</b>
Izgled	rumeno-rjavi kristali
Izkoristek reakcije	51 %
MF	etilacetat:heksan = 2:1
Rf	0,33
T <sub>tal</sub>	133-138 °C
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	δ 5.51 (s, 1H, Ar-H), 7.21 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.05 (d, <i>J</i> = Hz, 1H, Ar-H), 8.49 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz, 1H, Ar-H), 10.34 (s, 1H, CHO), 13.53 (s, 1H, OH)
ESI-HRMS	Izračunano za C <sub>10</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> (m/z): <b>189.0188</b> [M-H] <sup>+</sup> Izmerjena vrednost (m/z): <b>189.0185</b>

## 2. stopnja: sinteza spojine 11



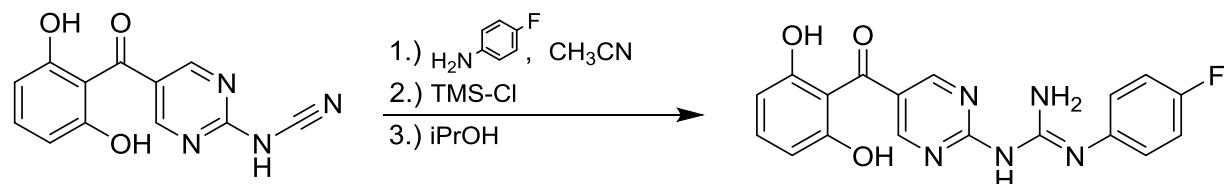
Slika 18: Reakcijska shema sinteze spojine 11

V suho bučko smo natehtali produkt 1. stopnje *5-hidroksi-4-okso-4H-kromon-3-karbaldehid* (spojava **10**; 0,7 g, 3,7 mmol) in *cianogvanidin* (0,46 g, 5,5 mmol) ter raztopili v *brezvodnem absolutnem etanolu*. Nato smo reakcijski zmesi dodali še *kalijev hidroksid* (0,59 g, 10,5 mmol) in vse skupaj segrevali 4 ure pod refluksom ( $90^\circ\text{C}$ , argonova atmosfera). Nato smo reakcijsko zmes ohladili na sobno temperaturo, jo zlili na zdrobljen led in bučko sprali z vodo. Z ocetno kislino smo nakisali do pH 4 oz. 5, kjer so začeli izpadati kristali spojine, ki smo jih izolirali s filtracijo z odsesavanjem. Matičnico smo nato spirali z diklorometanom (2x50 mL), organsko fazo odpraili pod znižanim tlakom in zaostanku dodali izolirane kristale. Sledilo je čiščenje s kolonsko kromatografijo.

IUPAC ime	<b>N-(5-(2,6-dihidroksibenzoil)pirimidin-2il)cianamid</b>
Izgled	oranžni kristali
Izkoristek reakcije	17 %
MF	etilacetat:metanol = 5:1
Rf	0,15
T <sub>tal</sub>	Nad 300 °C
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	$\delta$ 4.04 (q, <i>J</i> = 7.1 Hz, 1H, NH), 6.64 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.69 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 1H, Ar-H), 8.39 (d, <i>J</i> = 4.0 Hz, 2H, Ar-H), 9.82 (s, 1H, Ar-H), 11.43 (s, 2H, OH)
ESI-HRMS	Izračunano za C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> (m/z): <b>255,2203</b> [M-H] <sup>+</sup> Izmerjena vrednost (m/z): <b>255,0518</b>

### 3. stopnja: sinteza spojine 12

(IUPAC ime: 1-(5-(2,6-dihidroksibenzoil)pirimidin-2-il)-2-(4-fluorofenil)gvanidin)



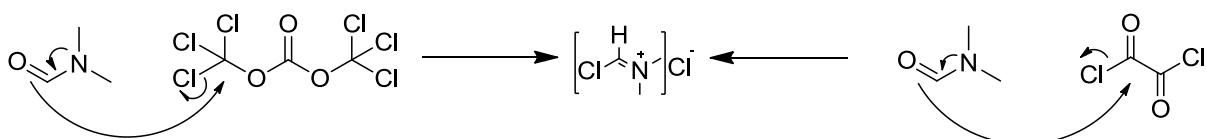
Slika 19: Reakcijska shema sinteze spojine 12

V bučko smo zatehtali produkt 2. stopnje *N*-(5-(2,6-dihidroksibenzoil)pirimidin-2-*il*)cianamid (spojava **11**; 0,15 g, 0,59 mmol), dodali 4-fluoroanilin (61,8 µL, 0,64 mmol) in acetonitril (20 mL) kot topilo. V argonovi atmosferi smo dodali TMS-Cl (164,6 µL, 1,3 mmol), zaprli in dobro premešali bučko. Nato smo 2 uri segrevali pri temperaturi refluksa (120 °C) in po pretečenem času pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo zmesi dodali še nekaj etilacetata ter pripravili zmes za čiščenje s kolonsko kromatografijo. S pomočjo TLC in NMR analize smo ugotovili in potrdili, da reakcija ni potekla.

# 5 REZULTATI IN RAZPRAVA

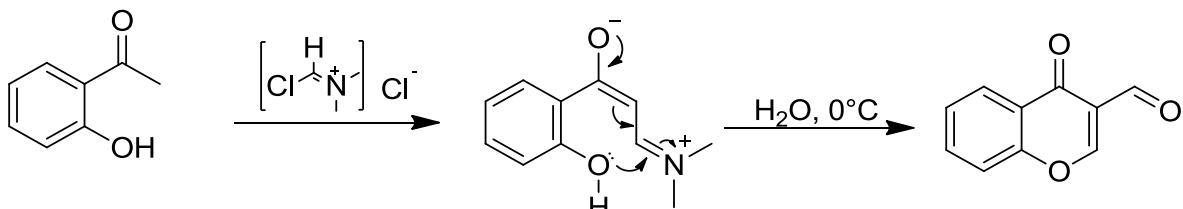
## 5.1 Razlaga sinteznih postopkov

Za nastanek končnih spojin smo v magistrski nalogi uporabili tristopenjsko sintezo, kjer smo posamezne stopnje reakcije izvajali po različnih postopkih ter z različnimi reagenti ali z lastnimi optimizacijami postopkov. Prva stopnja sinteze je temeljila na modificirani Vilsmeier-Haackovi reakciji (klasična poteka med DMF in  $\text{POCl}_3$  ter omogoča tvorbo aldehidne skupine na benzenu, povzeto po (43)), ki je omogočala tvorbo 3-formilkromona iz različnih začetnih 2-hidroksiacetofenonov. Reakcijo smo izvajali po dveh različnih postopkih, in sicer z uporabo BTC v 1,2-dikloroetanu (44) ter z uporabo oksalil klorida (45).



Slika 20: Tvorba Vilsmeirjevega reagenta; povzeto po (43)

Obe sintezni poti temeljita na prvotnem nastanku Vilsmeier-jevega reagenta (v brezvodnih pogojih – argonova atmosfera), elektrofilnega iminijevega kationa, ki nato reagira s kasneje dodano acetilno skupino 2-hidroksiacetofenona in omogoči tvorbo 3-formilkromona (44, 45).



Slika 21: Mehanizem reakcije prve stopnje sinteznega postopka; povzeto po (44)

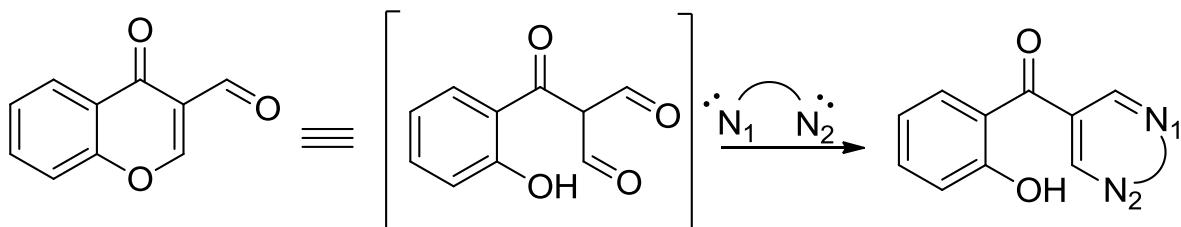
Kljub temu, da je reakcija z BTC kazala dobre izkoristke, smo se iz varnostnih razlogov odločili, da uporabimo drugo alternativno reakcijo. BTC se v tej reakciji namreč pretvarja v fosgen, izjemno strupen brezbarven plin, ki predstavlja veliko nevarnost zdravju in kljub razširjeni uporabi v farmacevtski industriji, smo se ga pri naši reakciji raje izognili. Zamenjali smo ga z oksalil kloridom, ki je nekoliko varnejši, a je njegova reakcija veliko bolj burna. Po prvotni izvedbi reakcije, kakor je bila predlagana v članku B. China Raju in soavtorjev (45), smo ugotovili, da takšna izvedba ne omogoča nadzorovanega poteka

reakcije (zelo burna, nevarna in nepredvidljiva reakcija), zato smo izvedli optimizacijo le-te. Pomembna sprememba je bilo predhodno redčenje oksalil klorida z brezvodnim THF v kapalniku nad bučko z reakcijsko zmesjo (namesto direktnega kapljanja oksalil klorida v reakcijsko zmes v bučki), počasno kapljanje le-tega v reakcijsko zmes, kjer je bil izhodnemu reagentu in DMF-u dodan še brezvodni THF. Tako smo dosegli nadzorovan potek reakcije, varnejšo izvedbo in tudi boljše izkoristke.

Sintezo spojine **10** (izhajamo iz 2,6-dihidroksiacetofenona) smo izvedli po obeh postopkih (BTC in oksalil klorid) in ugotovili, da je reakcija v obeh primerih potekla, a je sledilo zahtevno čiščenje s kolonsko kromatografijo, kjer je presežen DMF iz reakcije motil ločbo in posledično vplival na nižji izkoristek. Ta je bil celo nekoliko boljši pri reakciji z BTC (51 %, pri reakciji z oksalil kloridom pa 43 %). Reakcijo na metoksi derivatih 2-hidroksiacetofenona smo izvajali le z oksalil kloridom in dobili izvrstne izkoristke ter skoraj čiste produkte. Reakcija 2-hidroksi-5-metoksiacetofenona z oksalil kloridom (sinteza spojine **2**) je potekla kar z 97 % izkoristkom, pri tem pa so kristali produkta izpadli takoj po zlitju reakcijske zmesi na led. Kristale smo izolirali s filtracijo s presesavajem in tako dobili čist produkt ter se v celoti izognili čiščenju s kolonsko kromatografijo. Reakcija 2-hidroksi-6-metoksiacetofenona z oksalil kloridom (sinteza spojine **6**) pa je potekla s 83 % izkoristkom, a je prvotno potrebovala zahtevno čiščenje s kolonsko kromatografijo (ponovno vpliv presežnega DMF). Po naši optimizaciji postopka pa je tudi pri tem derivatu prišlo do izpada kristalov produkta ob prelitju reakcijske zmesi na led in tako smo se tudi tu povsem izognili čiščenju s kolonsko kromatografijo ter dobili čist produkt v obliki kristalov. Iz rezultatov prve stopnje sinteze lahko zaključimo, da je reakcija z oksalil kloridom primerna predvsem za tvorjenje 2-formilkromonov iz metoksi derivatov 2-hidroksiacetofenonov in reakcija z BTC za derivate dihidroksiacetofenonov.

Druga stopnja sinteze obsega reakcijo, kjer 3-formilkromon reagira z dinukleofilno molekulo (v našem primeru cianogvanidin), kar povzroči odprtje kromonskega obroča in tvorbo novega pirimidinskega obroča s pripetim cianamidom. Natančen mehanizem reakcije ni znan, saj lahko poteče najprej nukleofilni napad amino skupine cianogvanidina na 3-formilkromon (C-atom na mestu 2) ali nukleofilni napad amino skupine cianogvanidina na aldehidno skupino 3-formilkromona (prav tako pa je možna pretvorba

3-formilkromona v 2-(2-hidroksibenzoil)malonilaldehid, ki še olajša nukleofilni napad). Sledi ciklokondenzacija, katere produkt je pirimidinski obroč (46, 47).



Slika 22: Mehanizem nukleofilnega napada v drugi stopnji sinteznega postopka; povzeto po (46)

Literurni postopek reakcije druge stopnje sinteze je obsegal segrevanje reakcijske zmesi 4 ure pod refluksom (vodni povratni hladilnik) v brezvodnih pogojih (argonova atmosfera) in nato sledečo ekstrakcijo ter čiščenje produkta s kolonsko kromatografijo (47). Po izvedbi reakcije smo ugotovili, da je postopek, kljub zadovoljivo visokemu izkoristku, dolgotrajen in zamuden, čiščenje s kolonsko kromatografijo pa še dodatno podaljša čas druge stopnje sinteze in verjetno vpliva na izkoristek reakcije. Zato smo se odločili za optimizacijo postopka, in sicer smo poizkusili s prenosom reakcije v mikrovalovni reaktor, saj so reakcijski časi tu ponavadi znatno krajsi, izkoristki reakcij pa veliko boljši. Pogoji reakcije v mikrovalovnem reaktorju so razvidni iz preglednice IV.

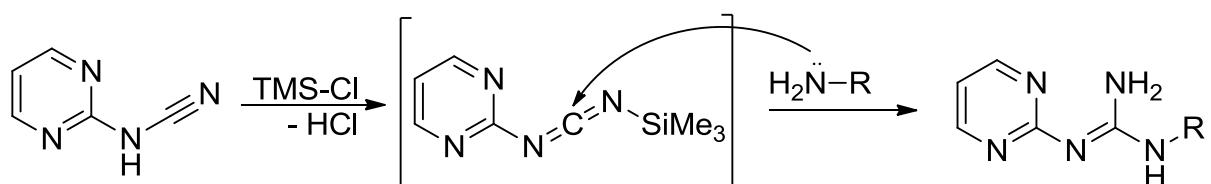
#### Preglednica IV: Reakcijski pogoji v mikrovalovnem reaktorju

Medij	Absolutni etanol
Moč	50 W (do 150 W po potrebi)
Temperatura	120 °C
Čas segrevanja	20 minut

S prenosom reakcije v mikrovalovni reaktor smo dosegli kar 12-krat krajsi čas reakcije kot pri literarnem postopku. Izkoristki so se po optimizaciji reakcije dvignili le malenkostno ali pa sploh ne. Pri sintezi spojine **7** se izkoristek reakcije ni izboljšal (64 % v obeh primerih), a smo po nakisanju reakcijske zmesi na ledu, ob uporabi optimizirane metode, dosegli takojšen izpad kristalov produkta, ki smo jih izolirali s filtracijo s presesavanjem. TLC in NMR spekter sta pokazala, da so izpadli kristali čisti, kar pomeni, da smo se z optimizacijo postopka ponovno izognili čiščenju s kolonsko kromatografijo in tako še dodatno skrajšali čas druge stopnje sinteze. Pri sintezi spojine **3** se je izkoristek reakcije le malce izboljšal (69 %, prej 65 %), pri nakisanju reakcijske zmesi na ledu, ob uporabi

optimizirane metode, pa smo tudi tu dosegli takojšen izpad kristalov produkta in se tako ponovno izognili čiščenju s kolonsko kromatografijo. Sintezo spojine **11** (v osnovi izhaja iz 2,6-dihidroksiacetofenona) smo izvedli po literurnem postopku s segrevanjem pod refluksom, dobljeni izkoristek pa je bil precej nizek (17 %). Problem je predvsem v uporabljenem derivatu 3-formilkromona, ki zaradi svoje strukture ne omogoča dobrega poteka reakcije, čemur sledi zahtevno čiščenje s kolonsko kromatografijo (sumimo tudi, da ostaja prisoten DMF iz prve stopnje sinteze, kar še dodatno oteži kolonsko kromatografijo). Iz rezultatov druge stopnje sinteze lahko zaključimo, da je optimizacija literurnega postopka občutno skrajšala čas poteka sinteze, medtem ko se izkoristki niso bistveno spremenili. Prav tako je optimizacija pomenila izogib čiščenju s kolonsko kromatografijo in s tem še dodatno pripomogla k skrajšanju časa poteka sinteze. Spojine so izkazovale visoko stopnjo čistosti, kar je bilo razvidno iz analize HPLC (čistost spojin nad zahtevano 95 % čistostjo).

V zadnji stopnji sinteze pride do nukleofilne adicije izbranega amina na aktivirano ciano skupino produkta druge stopnje. To dosežemo z dodatkom katalizatorja TMS-Cl, ki z vezavo na ciano skupino produkta druge stopnje olajša nukleofilni napad amina, prav tako pa omogoča nastajanje brezvodne HCl, ki služi pravilnemu poteku nadaljnje reakcije. Na koncu se ciano skupina pretvori v gvanidinsko skupino s pripetim ustreznim aminom, kar je tudi končna spojina tristopenjske sinteze (48).



Slika 23: Mehanizem nukleofilne adicije v tretji stopnji sinteznega postopka; povzeto po (48)

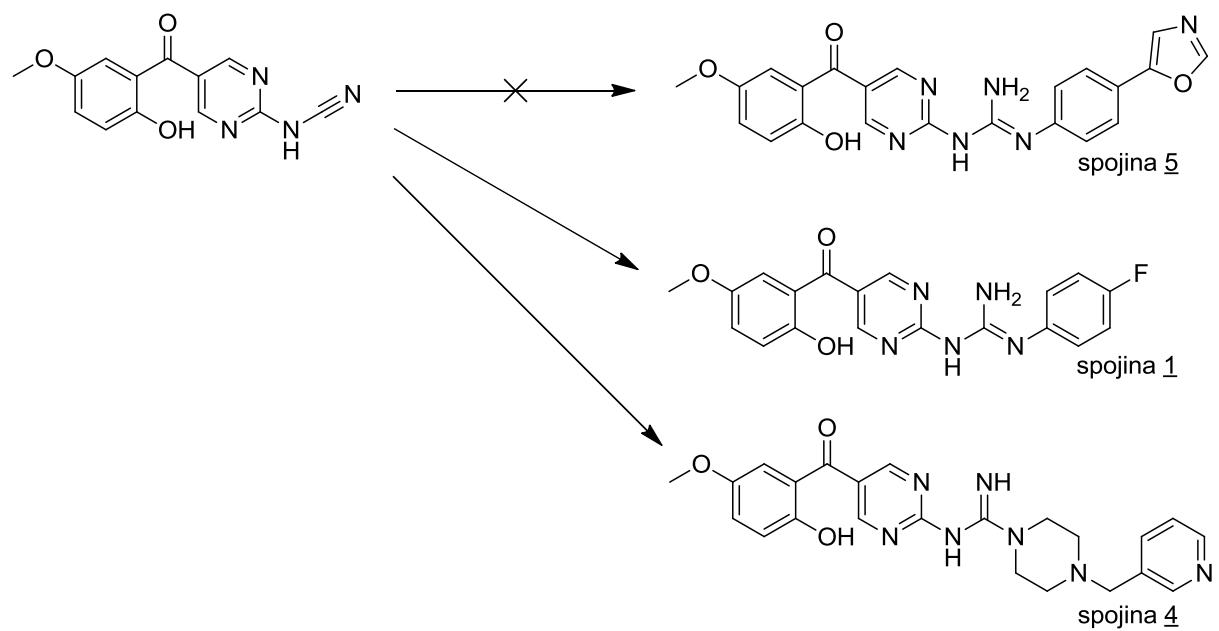
Literturni postopek reakcije tretje stopnje sinteze je obsegal segrevanje reakcijske zmesi v mikrovalovnem reaktorju. Po pretečenem času smo v reakcijsko zmes dodali izopropanol, ki zaustavi reakcijo. Sledilo je zahtevno čiščenje s kolonsko kromatografijo, ki veliko pripomore k nizkim izkoristkom reakcije.

Sinteza spojine **1**, ki je bila najdena z virtualnim rešetanjem na Fakulteti za farmacijo, je potekla izjemno slabo z mnogo stranskimi produkti. Izolacija je bila deloma neuspešna, saj poleg vzorca za NMR analizo, ki je potrdila nastanek produkta, spojine nismo mogli očistiti v zadostni količini, da bi lahko izvedli ostale analize in testiranje antagonistične

aktivnosti na TLR4. Vzrok je lahko predvsem v uporabljenem reagentu 4-fluoroanilinu, saj ta ni dober nukleofil za izvedbo nukleofilnega napada v tretji stopnji sinteze, ker zaradi benzena in fluora na para mestu prevladuje negativni induktivni efekt (-I), ki oslabi nukleofilne lastnosti.

Sinteza spojine **4** je potekla s komaj 6,2 % izkoristkom, a smo dobil dovolj končnega produkta, da smo lahko izvedli vse zahtevane analize in biološke teste. Slab izkoristek je verjetno posledica ciklične amino skupine (piperazin; sekundarni amin), ki je bolj sterično ovirana kot pri primarnem aminu. Dodatno pa stranska skupina reagenta (piridin-3-ilmetil) predstavlja veliko sterično oviro, ki otežuje adicijo amina na aktivirano ciano skupino produkta druge stopnje in tako zmanjšuje izkoristek reakcije.

Spojina **5** ni nastala, kar je predvsem posledica reagenta, ki smo ga želeli pripeti na spojino v tretji stopnji sinteze – 4-(oksazol-5-il)anilina. Reagent, zaradi aromata, na katerega je pripeta amino skupina, in substitucije na *para* mestu z oksazolnim obročem, izkazuje negativen induktiven efekt (-I) in pozitiven resonančni efekt (+M), kar pomeni deaktivacijo amino skupine (odteg elektronov) in nezmožnost nukleofilnega napada na aktivirano ciano skupino reagenta druge stopnje.

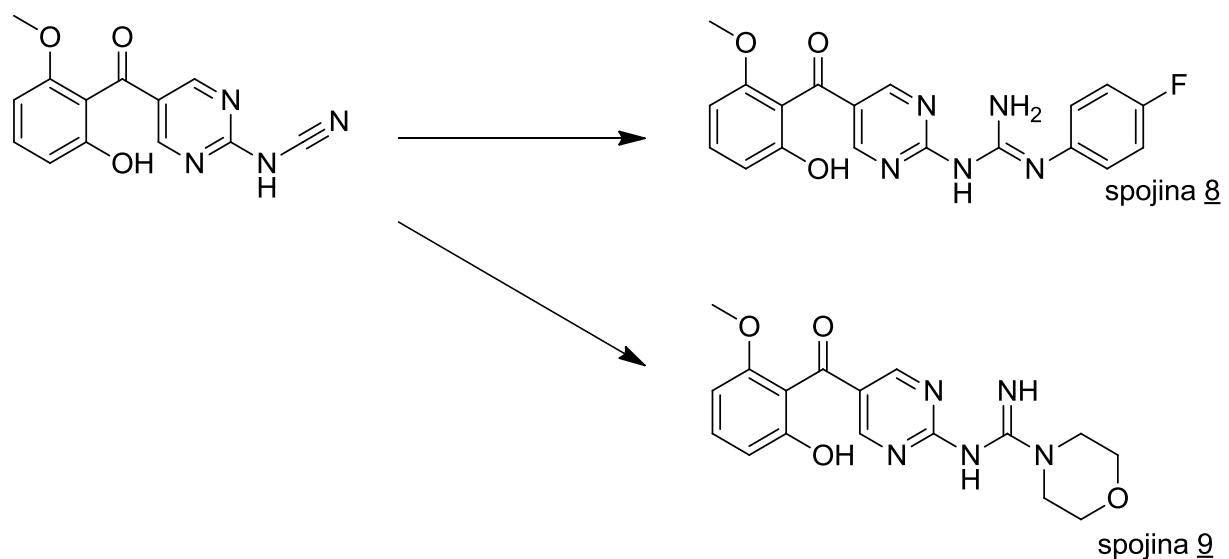


**Slika 24:** Prikaz nastalih in neuspelih končnih spojin, tvorjenih iz istega izhodnega reagenta 2-hidroksi-5-metoksiacetofenona

Sledila je sprememba izhodnega reagenta v prvi stopnji sinteze, in sicer smo uporabili 2-hidroksi-6-metoksiacetofenon. Tokrat sta obe spojini nastali, a je sinteza spojine **9** imela

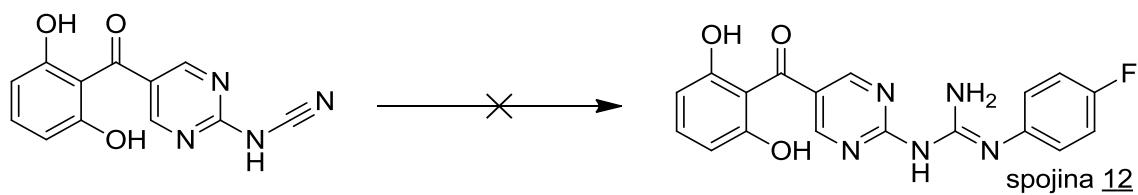
precej slab izkoristek (7,8 %), končnega produkta pa je bilo dovolj za vse analize in testiranje antagonistične aktivnosti. Vzrok slabega izkoristka je verjetno zopet sterična oviranost ciklične amino skupine.

Sinteza spojine **8** je bila najbolj uspešna reakcija s 40 % izkoristkom in visoko čistostjo produkta (vse izolirane končne spojine so imele čistost določeno s HPLC nad 95 %, spojina **8** pa je dosegla skoraj 99 % čistost). Sinteza pa je tudi pokazala, da je že majhna strukturna sprememba pozicije metoksi skupine (iz pozicije 5 na pozicijo 6) na izhodnem reagentu dovolj, da zadnja stopnja reakcije poteče z veliko boljšim izkoristkom.



Slika 25: Prikaz uspelih končnih spojin iz istega izhodnega reagenta 2-hidroksi-6-metoksiacetofenona

Zadnja stopnja sinteze spojine **12** ni potekla, kljub temu da gre le za manjšo strukturno spremembo izhodnega reagenta (metoksi skupina spremenjena v hidroksi skupino) kot pri spojini **8** ali spojini **1**. Vzrok je verjetno v dveh OH skupinah produkta druge stopnje in uporabljenega katalizatorja v tretji stopnji sinteze – TMS-Cl. Ta namreč z alkoholnimi skupinami zelo rad tvori sililne etre (R-OTMS), kar pomeni, da se velika količina TMS-Cl »porabi« na OH skupinah in ga nato ni dovolj za aktivacijo ciano skupine. Možna rešitev, bi lahko v tem primeru bila dodatna presežna količina TMS-Cl v reakciji ali zaščita OH skupin z zaščitnimi skupinami. Razlog, da je ta stranska reakcija bolj očitna pri spojini **12** pa je v dejstvu, da spojina izhaja iz dihidroksi derivata acetofenonov (dve OH skupini), medtem ko imajo drugi uporabljeni derivati acetofenonov v naši sintezi le eno OH skupino.



Slika 26: Prikaz neuspele končne spojine 12 iz izhodnega reagenta 2,6-dihidroksiacetofenona

Iz rezultatov tretje stopnje sinteze lahko ugotovimo, da bi bilo potrebno zamenjati sintezni postopek ali pa vsaj izvesti optimizacijo postopka, saj so reakcijske zmesi polne stranskih produktov, ki zahtevajo težavno čiščenje s kolonsko kromatografijo, izkoristki reakcij pa so izjemno nizki. Sklepamo lahko tudi, da je najboljši izhodni reagent v prvi stopnji za našo trostopenjsko sintezo 2-hidroksi-6-metoksiacetofenon, saj ta omogoča najboljše končne izkoristke sintezne poti (22 % proti 4 % pri 2-hidroksi-6-metoksiacetofenonu; 2,6-dihidroksiacetofenon nima končnega izkoristka, saj reakcija ni potekla v zadnji stopnji).

## **5.2 Rezultati biološkega testiranja**

Na sintetiziranih spojinah je bilo izvedeno tudi biološko testiranje, saj je bil cilj magistrske naloge sinteza novih, potencialnih antagonistov TLR4. V sodelovanju z Zavodom za transfuzijsko medicino Republike Slovenije, je bilo biološko testiranje izvedeno s strani doc. dr. Urbana Švajgerja. Najprej je bila spojinam subjektivno določena stopnost v DMSO in celičnem mediju. Netopnost spojin bi namreč pomenila dejansko nižjo koncentracijo spojine, kot bi bila pričakovana koncentracija in zato lažno pozitivne ali lažno negativne rezultate v testu za citotoksične lastnosti ali antagonistično aktivnost na TLR4. Sledilo je ovrednotenje citotoksičnih lastnosti, in sicer je bilo ugotovljeno, da spojini **4** in **9** izkazujeta citotoksične učinke pri koncentracijah višjih od  $20 \mu\text{M}$ , spojina **8** pa pri koncentracijah višjih od  $50 \mu\text{M}$ . Na podlagi teh rezultatov je bila ocenjana kot primerna, za zadnjo stopnjo biološkega testiranja, le spojina **8**. Cilj zadnje stopnje – preverjanja antagonistične aktivnosti na TLR4, je bil določitev  $\text{IC}_{50}$  spojine **8** in njena primerjava z  $\text{IC}_{50}$  kupljene spojine **1**, spojine zadetka, najdene na Fakulteti za farmacijo z virtualnim rešetanjem. Spojina **8** ima višjo  $\text{IC}_{50}$  kot spojina **1**, iz česar lahko sklepamo, da je bila naša strukturna sprememba izhodnega reagenta, neučinkovita oziroma, da je za boljše antagonistično delovanje pomembno izhajati iz izhodnega reagenta z metoksi skupino na mestu 5.

## 6 SKLEP

V okviru magistrske naloge smo sintetizirali pirimidino-gvanidinske antagoniste Toll-u podobnega receptorja-4, optimizirali nekatere stopnje sinteze in preverili odnos med strukturo in delovanjem sintetiziranih spojin.

- 1.) Uspela nam je delna sinteza spojine **1**, zadetka, ki je bil najden s pomočjo virtualnega rešetanja na Fakulteti za farmacijo. Iz NMR spektra smo potrdili njen nastanek, a je žal nismo uspeli izolirati v zadostni količini za dodatne analize in testiranja.
- 2.) Sintetizirali smo tri derivate spojine **1** (spojine **4**, **8** in **9**).
- 3.) Izvedli smo optimizacijo prve in druge stopnje tristopenjske sinteze. Z optimizacijo prve stopnje smo dosegli varnejšo reakcijo, boljše izkoristke in izognitev čiščenju s kolonsko kromatografijo. Z optimizacijo druge stopnje smo dosegli kar 12-krat kraši čas sinteze, medtem ko se izkoristki niso spremenili. Tudi tu smo se izognili čiščenju s kolonsko kromatografijo.
- 4.) Preverili smo topnost, citotoksičnost in antagonistično delovanje spojin na TLR4. Spojini **4** in **9** sta zadovoljivo topni, a citotoksični. Spojina **8** je zadovoljivo topna, necitotoksična pri koncentraciji pod 50  $\mu\text{M}$  in ima antagonistično delovanje na TLR4 ( $\text{IC}_{50} = 32,5 \mu\text{M}$ ).

Ugotovili smo, da je za močnejše antagonistično delovanje potrebno izhajati iz 2-hidroksi-5-metoksiacetofenona, saj ta fragment v končni molekuli pomembno vpliva na antagonistično aktivnost celotne spojine.

Zaključimo lahko, da je na področju sinteze nizko-molekularnih antagonistov TLR4 potrebno še veliko raziskav. Predvsem je potrebno dati poudarek na zagotavljanje boljše topnosti, izogibanje citotoksičnosti in predvsem bolj selektivno delovanje spojin.

## 7 LITERATURA

- 1.) Vozelj M., Temelji imunologije, 1. izd., DZS, Ljubljana, 2000: 1-9.
- 2.) Murphy K., Janeway's immunobiology, 8. izd., Garland Science, 2012: 1-17.
- 3.) Degn S.E., Thiel S.: Humoral pattern recognition and the complement system. Scandinavian Journal of Immunology 2013; 78 (2): 181-193.
- 4.) Hopkins P. A., Sriskandan S.: Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. Clinical and Experimental Immunology 2005; 140: 395-407.
- 5.) Yamamoto M., Takeda K.: Current Views of Toll-Like Receptor Signaling Pathways. Gastroenterology Research and Practice 2010; 2010: Article ID 240365.
- 6.) Kawai T., Akira S.: Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. Immunity 2011; 34: 637-650.
- 7.) Mitchell J. A., Clark M. J. P., Clarke G. W., McMaster S. K., Cartwright N.: Critical role of toll-like receptors and nucleotide oligomerisation domain in the regulation of health and disease. Journal of Endocrinology 2007; 193: 323-330.
- 8.) Akira S., Uematsu S., Takeuchi O.: Pathogen Recognition and Innate Immunity. Cell 2006; 124: 783-801.
- 9.) Takeda K., Akira S.: Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. Genes to Cells 2001; 6: 733-742.
- 10.) Martin D. B., Gaspari A. A.: Toll-Like Receptors, Clinical and Basic Immunodermatology, Springer, London, 2008, 67-84.
- 11.) Singh B., Balachandran Y., Knaus S.: Toll-like receptor 10: its expression and role in chemotaxis in human neutrophils (P1234). The journal of Immunology 2013; 190: Article ID 138.15.
- 12.) Hidmark A., von Saint Paul A., Dalpke A. H.: Cutting edge: TLR13 is a receptor for bacterial RNA. Journal of Immunology 2012; 189 (6): 2717-2721.

- 13.) Verstak B., Hertzog P., Mansell A.: Toll-like receptor signalling and the clinical benefits that lie within. *Journal of Inflammation Research* 2006; 56: 1-10.
- 14.) Brikos C., O'Neill L. A. J.: Signalling of Toll-Like Receptors. *Handbook of Experimental Pharmacology* 2008; 183: 21-50.
- 15.) Browne E. P.: Regulation of B-cell responses by Toll-like receptors. *Immunology* 2012; 136: 370-379.
- 16.) Reynolds J. M., Dong C.: Toll-like receptor regulation of effector T lymphocyte function. *Trends in Immunology* 2013; 34 (10): 511-519.
- 17.) Hennessy E. J., Parker A. E., O'Neill L. A. J.: Targeting Toll-like receptors: emerging ftherapeutics? *Nature Reviews Drug Discovery* 2010; 9: 293-307.
- 18.) Hernandez S. M., Baxter A. G.: Role of Toll-like receptors in multiple sclerosis. *American Journal of Clinical and Experimental Immunology* 2013; 2 (1): 75-93.
- 19.) Leon C. G., Tory R., Jia J., Sivak O., Wasan K. M.: Discovery and development of Toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists: a new paradigm for treating sepsis and other diseases. *Pharmaceutical Research* 2008; 25 (8): 1751-1761.
- 20.) Abdollahi-Roodsaz S., Joosten L. A. B., Roelofs M. F., Radstake T. R. D. J., Matera G., Popa C., van der Meer J. V. M., Netea M. G., van den Berg W. M.: Inhibition of Toll-like receptor 4 breaks the inflammatory loop in autoimmune destructive arthritis. *Arthritis & rheumatism* 2007; 56 (9), 2957-2967.
- 21.) Erickson B., Sperber K., Frishman W. H.: Toll-like receptors: New therapeutic targets for the treatment of atherosclerosis, acute coronary syndromes, and myocardial failure. *Cardiology in Review* 2008; 16 (6): 273-279.
- 22.) Ishii K. J., Akira S.: Toll-like receptors and sepsis. *Current Infectious Disease Reports* 2004; 6: 361-366.
- 23.) Falck-Hansen M., Kassiteridi C., Monaco C.: Toll-like receptors in atherosclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14: 14008-14023.

- 24.) Libby P., Okamoto Y., Rocha V. Z., Folco E.: Inflammation in Atherosclerosis: Transition From Theory to Practice. *Circulation Journal* 2010; 74: 213-220.
- 25.) Seok Roh Y., Seki E.: Toll-like receptors in alcoholic liver disease, non-alcoholic steatohepatitis and carcinogenesis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2013; 28 (1): 38-42.
- 26.) Lucas K., Maes M.: role of the Toll-like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: possible treatments targeting the TLR4 pathway. *Molecular Neurobiology* 2013; 48 (1): 190-204.
- 27.) Bettoni I., Comelli F., Rossini C., Granucci F., Giagnoni G., Peri F., Costa B.: Glial TLR4 receptor as new target to treat neuropathic pain: efficacy of a new receptor antagonist in a model of peripheral nerve injury in mice. *GLIA* 2008; 56: 1312-1319.
- 28.) Peri F., Piazza M.: Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists. *Biotechnology Advances* 2012; 30: 251-260.
- 29.) Wang X., Smith C., Yin H.: Targeting Toll-like receptors with small molecule agents. *Chemical Society Reviews* 2013; 42 (12): 4845-5620.
- 30.) Barochia A., Solomon S., Cui X., Natanson C., Eichacker P. Q.: Eritoran tetrasodium (E5564) treatment for sepsis: review of preclinical and clinical studies. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 2011; 7 (4): 479-494.
- 31.) Shirey K. A., Lai W., Scott A. J., Lipsky M., Mistry P., Pletneva L. M., Karp C. L., McAlees J., Gioannini T. L., Weiss J., Chen W. H., Ernst R. K., Rossignol D. P., Gusovsky F., Blanco J. C. G., Vogel S. N.: The TLR4 Antagonist, Eritoran, Protects Mice from Lethal Influenza Infection. *Nature* 2013; 497 (7450): 498-502.
- 32.) [http://www.drugs.com/clinical\\_trials/phase-iii-study-eritoran-does-not-meet-primary-endpoint-11082.html](http://www.drugs.com/clinical_trials/phase-iii-study-eritoran-does-not-meet-primary-endpoint-11082.html) (13. 10. 2013, 23:41).
- 33.) Li M., Matsunaga N., Hazeki K., Nakamura K., Takashima K., Seya T., Hazeki O., Kitazaki T., Iizawa Y.: A Novel Cyclohexene Derivative, Ethyl (6R)-6-[N-(2-Chloro-4-fluorophenyl)sulfamoyl]cyclohex-1-ene-1-carboxylate (TAK-242),

- Selectively Inhibits Toll-Like Receptor 4-Mediated Cytokine Production through Suppression of Intracellular Signaling. *Molecular Pharmacology* 2006; 69: 1288-1295.
- 34.) Matsunaga N., Tsuchimori N., Matsumoto T., Ii M.: TAK-242 (resatorvid), a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor (TLR) 4 signaling, binds selectively to TLR4 and interferes with interactions between TLR4 and its adaptor molecules. *Molecular Pharmacology* 2011; 79: 34-41.
- 35.) Hussey S. E., Liang H., Costford S. R., Klip A., DeFranzo R. A., Sanchez-Avila A., Ely B., Musi N.: TAK-242, a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor 4 signalling, unveils similarities and differences in lipopolysaccharide- and lipid-induced inflammation and insulin resistance in muscle cells. *Bioscience Report* 2013; 33: 37-47.
- 36.) Suzuki Y., Hattori H., Hamanaka J., Murase T., Egashira Y., Mishiro K., Ishiguro M., Tsuruma K., Hirose Y., Tanaka H., Yoshimura S., Shimazawa M., Inagaki N., Nagasawa H., Iwama T., Hara H.: Pharmacological inhibition of TLR4-NOX4 signal protects against neuronal death in transient focal ischemia. *Scientific Reports* 2012; 2: Article ID 896.
- 37.) Roger T., Froidevaux C., Le Roy D., Knaup Reymond M., Chanson A. L., Mauri D., Burns K., Riederer B. M., Akira S., Calandra S.: Protection from lethal Gram-negative bacterial sepsis by targeting Toll-like receptor 4. *PANS* 2009; 160 (7): 2348-2352.
- 38.) <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01808469?term=NI-0101&rank=1> (17. 10. 2013, 17:22).
- 39.) Bevan D. E., Martinko A. J., Loram L. C., Stahl J. A., Taylor F. R., Joshee S., Watkins L. R., Yin H.: Selection, preparation, and evaluation of small-molecule inhibitors of Toll-like receptor 4. *ACS Medical Chemistry Letters* 2010; 1 (5): 194-198.
- 40.) Chavez S. A., Martinko A. J., Lau C., Pham M. N., Cheng K., Bevan D. E., Mollnes T. E., Yin H.: Development of  $\beta$ -amino alcohol derivatives that inhibit

- Toll-like receptor 4 mediated inflammatory response as potential antiseptics. Journal of Medical Chemistry 2011; 54, 4659-4669.
- 41.) Švajger U., Brus B., Turk S., Sova M., Hodnik V., Anderluh G., Gobec S.: Novel Toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists identified by structure- and ligand-based virtual screening. European Journal of Medical Chemistry, 2013, Accepted manuscript.
- 42.) Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods 1983; 65: 55-63.
- 43.) <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/vilsmeier-reaction.shtm> (13. 10. 2013, 23:43).
- 44.) Su W. K., Li Z. H., Zhao L. Y.: One-pot synthesis of 3-formylchromones from bis-(trichloromethyl) carbonate/DMF. Organic Preparations and Procedures International: The New Journal for Organic Synthesis 2009; 39 (5): 495-502.
- 45.) Raju B. C., Nageswara Rao R., Suman P., Yogeeswari P., Sriram D., Shaik T. B., Vardhan Kalivendi S. V.: Synthesis, structure–activity relationship of novel substituted 4H-chromen-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylates as potential anti-mycobacterial and anticancer agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2011; 21: 2855-2859.
- 46.) Plaskon A. S., Grygorenko O. O., Ryabukhin S. V.: Recyclizations of 3-formylchromones with binucleophiles. Tetrahedron 2012; 68: 2743-2757.
- 47.) Ibrahim M. A., Abdel-Megid Abdel-Hamed M., El-Gohary N. M.: A new approach for the synthesis of bioactive heteroaryl thiazolidine-2,4-diones. Journal of the Brazilian Chemistry Society 2011; 22 (6): 1130-1139.
- 48.) Sachdeva N., Dolzhenko A. V., Keung Chui W.: Regioselective synthesis of pyrimido[1,2-a][1,3,5]triazin-6-ones via reaction of 1- (6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-2-yl)guanidines with triethylorthoacetate: observation of an unexpected rearrangement. Organic & Biomolecular Chemistry 2012; 10 (23): 4586-4596.

# PRILOGA

Na sintetiziranih spojinah je bilo izvedeno tudi biološko testiranje, saj je bil cilj magistrske naloge sinteza novih, potencialnih antagonistov TLR4. V sodelovanju z Zavodom za transfuzijsko medicino Republike Slovenije, je bilo biološko testiranje v celoti izvedeno s strani doc. dr. Urbana Švajgerja, mag. farm. Tu sledi krajši opis metod biološkega testiranja in ovrednotenje dobljenih rezultatov.

## ***1 Metode biološkega testiranja***

### **1.1 Preverjanje topnosti**

Končnim spojinam smo najprej preverili topnost, in sicer smo pripravili 25 mM raztopine spojin v DMSO ter te nato raztopili v mediju za celične kulture (RPMI 1640). Preverjanje topnosti smo nato izvedli s pregledom medija pod invertnim svetlobnim mikroskopom (Eclipse TE300, proizvajalca Nikon) z namenom iskanja precipitatov. Njihov neobstoj je pomenil zadovoljivo topnost spojine (41).

### **1.2 Preverjanje citotoksičnosti**

Preverjanje citotoksičnosti topnih spojin, smo izvedli na celicah HEK 293 proizvajalca Invivogen, ZDA. Celice smo nacepili v vdolbine mikrotitrsko plošče in jih nato pri 37 °C inkubirali v prisotnosti ali odsotnosti naših spojin (v koncentraciji 20 µM ali 100 µM). Kot kontrola je bil uporabljen čisti DMSO. Po 24 urah inkubacije smo izvedli MTS test, s katerim smo preverjali, ali so celice preživele v prisotnosti spojin. Celicam smo dodali tetrazolijev barvilo MTS (brezbarvno), ki ga nato žive celice metabolizirajo (mitohondrijska reduktaza povzroči odprtje tetrazolijevega obroča), kar vodi v nastanek obarvanosti (slika 8). Stopnjo celic, ki so preživele inkubacijo s spojinami, odraža intenziteta barve, ki jo določujemo spektrofotometrično (merimo absorbanco) s pretočno citometrijo (41, 42).



Slika 27: Prikaz reakcije MTS, v kateri pod vplivom mitohondrijske reduktaze nastane tetrazolijev barvilo; povzeto po (42)

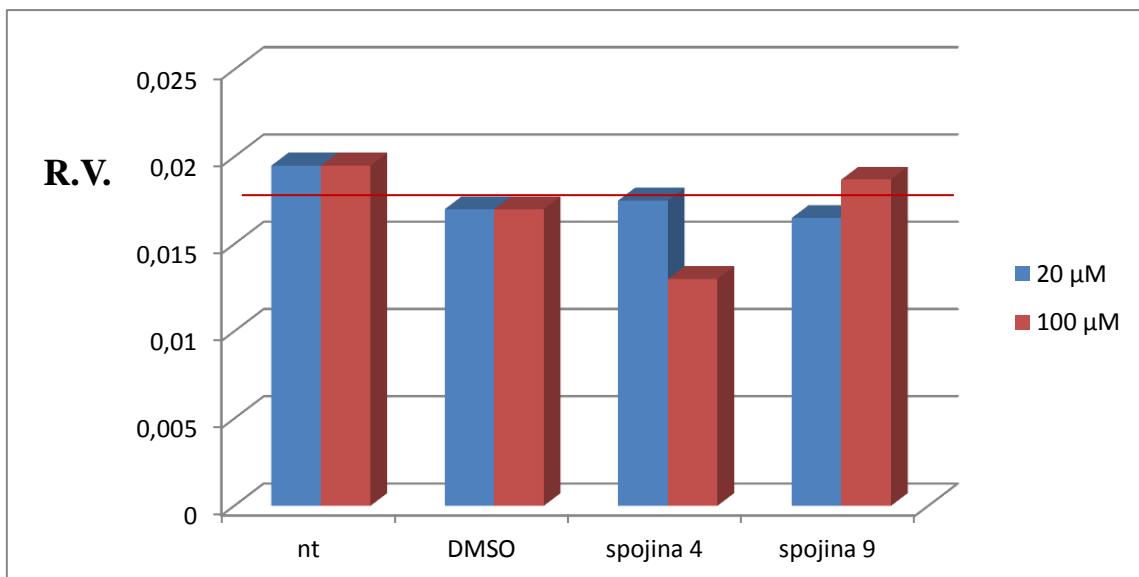
### 1.3 Določanje antagonistične aktivnosti

Za določevanja antagonistične aktivnosti spojin smo uporabili reportersko celično linijo HEK-BlueTM-hTLR4 proizvajalca Invivogen, ZDA. Ta celična linija selektivno izraža TLR4 (izogib lažno pozitivnim rezultatom z aktivacijo drugih PRR) in SEAP kot reporterski gen za agoniste TLR4, saj je pridobljena s ko-transfekcijo HEK 293 celic z geni za humani TLR4, MD-2 in CD14 ter SEAP. Antagonizem spojin je bil določen v skladu z navodili proizvajalca. Kot negativno kontrolo smo uporabili LPS (TLR4 agonist), za pozitivno kontrolo pa komercialno dostopni TLR4 antagonist TAK-242, prav tako uporabljen po navodilih proizvajalca. Celice smo inkubirali 2 uri pri 37 °C z našimi spojinami pri različnih koncentracijah, čemur je sledil dodatek LPS in inkubacija naslednjih 20 ur. Po pretečenem času smo izolirane supernatante kolorimetrično analizirali za prisotnost SEAP – učinkovit antagonist bi močno inhibiral izražanje SEAP-a v mediju in tako močno zmanjšal absorbanco. Vrednost IC<sub>50</sub> smo izračunali glede na upad izmerjene absorbance v vzorcih s pretočno citometrijo (41).

## **2 Ovrednotenje rezultatov biološkega testiranja**

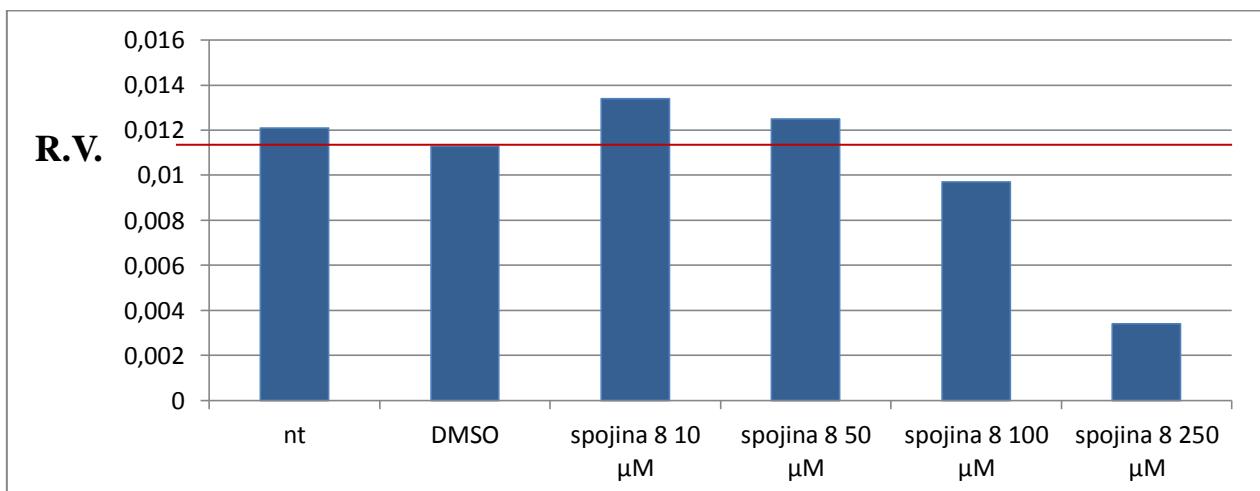
Najprej smo preverjali topnost spojin v mediju za celične kulture (RPMI 1640), in sicer so bile pripravljene 25 mM raztopine spojin **4**, **8** in **9** v DMSO, ki smo jih nato raztopili v mediju in pregledali pod mikroskopom. V raztopinah ni bilo najdenih precipitatov, zato smo podali subjektivno oceno, da so spojine zadovoljivo topne v celičnem mediju. Za dosego še boljše topnosti, bi morali naše spojine spremeniti v soli, kot je bil to primer pri kupljeni spojni 1. Če spojine ne bi bile zadovoljivo topne ali če bi našli manjše precipitate, bi bili dobljeni rezultati sledečega testiranja lažni ali pa testov sploh ne bi mogli izvesti.

Sledilo je testiranje citotoksičnosti raztopin spojin s testiranjem na celicah HEK 293. Uporabili smo MTS-test, s katerim preverjamo, koliko celic je preživelno inkubacijo z našimi spojinami. To ugotavljam z dodajanjem MTS (tetrazolijeve soli) k celicam, pri čemer jo žive celice metabolizirajo v obarvano spojino, pri mrtvih celicah pa ta ostane brezbarvna. Izmerjena absorbanca je tako v direktnem razmerju s številom živih celic – večja kot je izmerjana absorbanca, več je živih celic. Vzorec, ki ima dodan le DMSO, postavlja mejo citotoksičnosti – če naša spojina pokaže slabšo absorbanco, kot je absorbanca pri DMSO, to pomeni, da je naša spojina citotoksična in zato ne nadaljuje v nadaljnje teste preverjanja antagonistične aktivnosti na TLR4. Spojina **4** je pri koncentraciji 20 µM še komaj ujela mejo necitotoksičnega delovanja, medtem ko je pri koncentraciji 100 µM izkazovala citotoksične lastnosti in zato ni bila primerna za nadaljnje testiranje. Spojina **9** je izkazovala nelogične rezultate, saj naj bi bila pri koncentraciji 20 µM citotoksična, pri koncentraciji 100 µM pa ne. Vzrok za tak rezultat je lahko več – vprašljiva je topnost spojine oz. prisotnost majhnih precipitatov, ki jih pred tem nismo opazili in povzročajo lažne rezultate (kupljena spojina **1** je bila v obliki soli in zato ni bilo problemov s topnostjo), problem je lahko v biološki variabilnosti testnega sistema, kjer se posamezne celice znotraj celične linije HEK 293 neenotno odzivajo na prisotnost različnih spojin, lahko pa bi bil vzrok tudi prisotnost določenih nečistoč znotraj vzorcev naših spojin (kljub doseženi zahtevani čistosti spojin, preverjeni s HPLC analizo) in tako ponovno prikaz lažnih rezultatov.



Slika 28: Prikaz citotoksičnosti spojin 4 in 9 pri koncentraciji 20  $\mu\text{M}$  in 100  $\mu\text{M}$

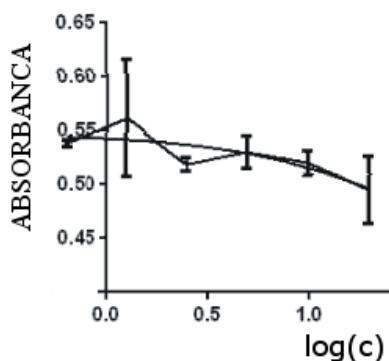
Citotoksičnost spojine **8** je bila preverjena znotraj večjega koncetracijskega območja, kjer rezultati pokažejo, da ima necitotoksičen značaj (pri koncentraciji 50  $\mu\text{M}$  in manj) in je zato primerna za nadaljnje preverjanje antagonistične aktivnosti na TLR4.



Slika 29: Prikaz citotoksičnosti spojine 8 pri koncentracijah 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  in 250  $\mu\text{M}$

Generalno gledano, so pirimidino-gvanidinske spojine v večini primerov citotoksične pri koncentracijah nad 100  $\mu\text{M}$ . Problem je predvsem v strukturi, možna sta dva dela molekule, ki prispevata k citotoksičnosti – gvanidinski del in keto skupina. V nadaljnji optimizaciji spojin bi bilo potrebno ta strukturna elementa nadomestiti s kakšnim manj citotoksičnim fragmentom – keto skupino, bi na primer lahko reducirali do OH skupine ali morda celo v celoti odstranili.

Antagonistično aktivnost na TLR4 spojine **8** smo preverili na reporterski celični liniji HEK-BlueTM-hTLR4, ki selektivno izraža TLR4 in SEAP kot reporterski gen za agoniste TLR4, kjer smo kot pozitivno kontrolo uporabili LPS, kot negativno kontrolo pa TAK-242. Učinkovit antagonist bi dosegel inhibicijo izražanja SEAP v mediju, kar bi se izrazilo kot zmanjšana absorbanca. Od vseh spojin je le spojina **8** izkazovala antagonistično delovanje z  $IC_{50}$  vrednostjo  $32,5 \mu M$ , kar je sicer slabše od kupljene spojine **1** ( $IC_{50} = 16,6 \mu M$ ; vzrok bi lahko bil v topnosti, saj je bila spojina **1** kupljena v obliki soli). Iz grafa lahko hitro ugotovimo, da antagonistična aktivnost ni ravno odvisna od spremembe koncentracije, kar nakazuje na neselektivno delovanje spojine **8**. Zaključimo lahko, da je bila naša struktturna sprememba izhodnega reagenta (zamenjava pozicije metoksi skupine iz mesta 5 na mesto 6) lahko vzrok za manjšo antagonistično aktivnost na TLR4. To pomeni, da je za dobro antagonistično delovanje analogov spojine **1** lahko pomembna pozicija metoksi skupine na izhodnjem reagentu.



Slika 30: Prikaz odvisnosti absorbance od logaritma koncentracije, za spojino **8**