

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA DOLŠAK
MAGISTRSKA NALOGA
ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA DOLŠAK

**NAČRTOVANJE, SINTEZA IN VREDNOTENJE
ZAVIRALCEV MONOAMIN OKSIDAZ A IN B NA
OSNOVI 1-(PROP-2-IN-1-IL)PIPERIDINA**

**DESIGN, SYNTHESIS AND EVALUATION OF
INHIBITORS OF MONOAMINE OXIDASES A AND B
WITH 1-(PROP-2-YN-1-YL)PIPERIDINE SCAFFOLD**

UNIFORM MASTER'S STUDY PROGRAMME PHARMACY

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sove, mag. farm. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo in Institutu »Jožef Stefan« v Ljubljani (Center za masno spektrometrijo).

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Mateju Sovi, mag. farm., za trud, nasvete, predano znanje in strokovno pomoč pri izdelavi magistrske naloge.

Zahvaljujem se asist. dr. Damijanu Knezu, mag. farm., za nasvete in pomoč pri izvedbi biološkega vrednotenja spojin.

Na koncu se zahvaljujem mojim domačim za podporo in pomoč v času študija.

IZJAVA

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

Ana Dolšak

Ljubljana, 2017

Predsednica komisije: prof. dr. Marija Bogataj, mag. farm.
Članica komisije: asist. dr. Janja Zupan, mag. farm.

VSEBINA

KAZALO SLIK.....	iv
KAZALO PREGLEDNIC.....	v
POVZETEK	vi
ABSTRACT	vii
SEZNAM OKRAJŠAV.....	viii
1. UVOD.....	1
1.1. MONOAMIN OKSIDAZA.....	1
1.2. PRIMERJAVA MED MAO-A IN MAO-B.....	2
1.2.1. VRSTE SUBSTRATOV	4
1.3. VRSTE ZAVIRALCEV	4
1.3.1. REVERZIBILNI ZAVIRALCI.....	5
1.3.2. IREVERZIBILNI ZAVIRALCI.....	6
1.4. TERAPEVTSKA UPORABA.....	8
1.4.1. PARKINSONOVA BOLEZEN	8
1.4.2. ALZHEIMERJEVA BOLEZEN	9
1.4.3. DEPRESIJA	9
2. NAMEN DELA.....	10
3. MATERIALI IN METODE	11
3.1. MATERIALI	11
3.2. METODE	11
3.2.1. KROMATOGRFSKE METODE.....	11
3.2.2. SPEKTROSKOPSKE METODE.....	12
3.2.3. DOLOČANJE TEMPERATURE TALIŠČA.....	13
3.2.4. POIMENOVANJE IN RISANJE SPOJIN	13
3.2.5. BIOKEMIJSKO TESTIRANJE	13
4. EKSPERIMENTALNO DELO IN REZULTATI ANALIZ.....	15
4.1. SINTEZA 1-(<i>terc</i> -butoksikarbonil)piperidin-4-karboksilne kisline (1)	15
4.2. SINTEZA <i>terc</i> -butil 4-(metoksi(metil)karbamoil)-piperidin-1-karboksilata (2)	16
4.3. SINTEZA <i>terc</i> -butil 4-formilpiperidin-1-karboksilata (3)	17
4.4. SPLOŠNI POSTOPEK SINTEZE WITTIGOVEGA REAGENTA.....	17

4.4.1.	SINTEZA (4-fluorofenil)trifenilfosfonijevega bromida (4).....	18
4.4.2.	SINTEZA (4-fluorobenzil)trifenilfosfonijevega klorida (5)	18
4.4.3.	SINTEZA (piridin-2-ilmetil)trifenilfosfonijevega bromida (6)	19
4.4.4.	SINTEZA (4-metilbenzil)trifenilfosfonijevega bromida (7).....	19
4.4.5.	SINTEZA (3-(trifluorometil)benzil)trifenilfosfonijevega bromida (8)...	19
4.4.6.	SINTEZA (4-bromobenzil)trifenilfosfonijevega bromida (9).....	19
4.5.	SPLOŠNI POSTOPEK SINTEZE Z WITTIGOVO REAKCIJO	20
4.5.1.	SINTEZA <i>terc</i> -butil (<i>E</i>)-4-(3-(4-fluorofenil)prop-1-en-1-il)piperidin-1- karboksilata (10).....	21
4.5.2.	SINTEZA <i>terc</i> -butil (<i>E</i>)-4-(2-(piridin-2-il)vinil)piperidin-1-karboksilata (11)	21
4.5.3.	SINTEZA <i>terc</i> -butil (<i>E/Z</i>)-4-(4-metilstiril)piperidin-1-karboksilata (12 in 13)	22
4.5.4.	SINTEZA <i>terc</i> -butil (<i>E/Z</i>)-4-(4-(trifluorometil)stiril)piperidin-1- karboksilata (14 in 15).....	23
4.5.5.	SINTEZA <i>terc</i> -butil (<i>E/Z</i>)-4-(3-(trifluorometil)stiril)piperidin-1- karboksilata (16 in 17).....	24
4.5.6.	SINTEZA <i>terc</i> -butil (<i>E</i>)-4-(4-bromostiril)piperidin-1-karboksilata (18)	25
4.5.7.	SINTEZA <i>terc</i> -butil 4-(4-fluorobenziliden)piperidin-1-karboksilata (19)	26
4.6.	SPLOŠNI POSTOPEK REDUKCIJE DVOJNE VEZI S KATALITSKIM HIDROGENIRANJEM.....	27
4.6.1.	SINTEZA <i>terc</i> -butil 4-(4-metilfenetil)piperidin-1-karboksilata (20).....	28
4.6.2.	SINTEZA <i>terc</i> -butil 4-(4-(trifluorometil)fenetil)piperidin-1-karboksilata (21)	28
4.6.3.	SINTEZA <i>terc</i> -butil 4-(3-(trifluorometil)fenetil)piperidin-1-karboksilata (22)	29
4.7.	SPLOŠNI POSTOPEK ODSTRANITVE BOC ZAŠČITE	29
4.8.	SPLOŠNI POSTOPEK ALKILACIJE PIPERIDINSKEGA DUŠIKA	30
4.8.1.	SINTEZA (<i>E</i>)-4-(3-(4-fluorofenil)prop-1-en-1-il)-1-(prop-2-in-1-il) piperidina (23)	32
4.8.2.	SINTEZA 4-(4-fluorobenziliden)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (24).....	33

4.8.3.	SINTEZA 4-(4-fluorobenzil)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (25)	34
4.8.4.	SINTEZA (<i>E</i>)-2-(2-(1-(prop-2-in-il)piperidin-4-il)vinil)piridina (26)	35
4.8.5.	SINTEZA (<i>Z</i>)-4-(-metilstiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (27)	36
4.8.6.	SINTEZA (<i>E</i>)-4-(-metilstiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (28)	37
4.8.7.	SINTEZA 4-(4-metilfenetil)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (29)	38
4.8.8.	SINTEZA (<i>Z</i>)-1-(prop-2-in-1-il)-4-(4-(trifluorometil)stiril)piperidina (30)	39
4.8.9.	SINTEZA (<i>E</i>)-1-(prop-2-in-1-il)-4-(4-(trifluorometil)stiril)piperidina (31)	40
4.8.10.	SINTEZA 1-(prop-2-in-1-il)-4-(4-(trifluorometil)fenetil)piperidina (32)	41
4.8.11.	SINTEZA (<i>Z</i>)-1-(prop-2-in-1-il)-4-(3-(trifluorometil)stiril)piperidina (33)	42
4.8.12.	SINTEZA (<i>E</i>)-1-(prop-2-in-1-il)-4-(3-(trifluorometil)stiril)piperidina (34)	43
4.8.13.	SINTEZA 1-(prop-2-in-1-il)-4-(3-(trifluorometil)fenetil)piperidina (35)	44
4.8.14.	SINTEZA (<i>E</i>)-4-(4-bromostiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (36)	45
5.	REZULTATI IN RAZPRAVA	46
5.1.	KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV	46
5.1.1.	SINTEZA WEINREBOVEGA AMIDA IN REDUKCIJA DO ALDEHIDA	46
5.1.2.	WITTIGOVA REAKCIJA	47
5.1.3.	REDUKCIJA DVOJNE VEZI	49
5.1.4.	ODSTRANITEV BOC ZAŠČITE IN ALKILACIJA	50
5.2.	REZULTATI IN KOMENTAR BIOKEMIJSKEGA TESTIRANJA	50
6.	SKLEP	53
7.	LITERATURA	54

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz glavnih reakcijskih poti MAO katalize.....	2
Slika 2: Strukturi monomernih enot izoform MAO-A in MAO-B.....	4
Slika 3: Safinamid, kot primer reverzibilnega zaviralca MAO-B, in moklobemid, kot primer RIMA.	6
Slika 4: Fenelzin, kot predstavnik prve skupine ireverzibilnih zaviralcev MAO.	7
Slika 5: Tranilcipromin, kot glavni predstavnik skupine ciklopropilaminov.....	7
Slika 6: Predstavnik današnje najbolj uporabljane propargilaminske skupine ireverzibilnih zaviralcev MAO.	8
Slika 7: Načrtovane spremembe na 1-(prop-2-in-1-il)piperidinskem skeletu.....	10
Slika 8: Prikaz s hrenovo peroksidazo katalizirane pretvorbe Amplex Red reagenta do resorufina.	13
Slika 9: Reakcijska shema sinteze spojine 1	15
Slika 10: Reakcijska shema sinteze spojine 2	16
Slika 11: Reakcijska shema sinteze spojine 3	17
Slika 12: Reakcijska shema sinteze spojin 4 – 9	17
Slika 13: Reakcijska shema sinteze spojin 10 – 18	20
Slika 14: Reakcijska shema sinteze spojine 19	26
Slika 15: Reakcijska shema sinteze spojin 20 – 22	27
Slika 16: Reakcijska shema odstranitve Boc zaščite.	29
Slika 17: Reakcijska shema sinteze spojin 23 – 36	30
Slika 18: Mehanizem redukcije Weinrebovega amida do aldehida ali ketona.	47
Slika 19: Splošna struktura ilidov.....	48
Slika 20: Predlagani mehanizem poteka Wittigove reakcije preko betaina.	48
Slika 21: Danes veljaven mehanizem Wittigove reakcije.	49

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I:	Substituenti v produktih pri sintezi Wittigovega reagenta.....	18
Preglednica II:	Substituenti v reagentih in produktih Wittigove reakcije.	20
Preglednica III:	Substituenti v izhodnih in končnih spojinah reakcije, udeleženih v redukciji dvojne vezi s katalitskim hidrogeniranjem.	27
Preglednica IV:	Substituenti v izhodnih in končnih spojinah reakcij odstranitve Boc zaščite in alkilacije piperidinskega dušika.	31
Preglednica V:	Rezultati biokemijskega vrednotenja končnih sintetiziranih spojin.....	50

POVZETEK

Monoamin oksidaze (MAO) so encimi, ki se nahajajo na zunanji membrani mitohondrijev in katalizirajo oksidativno deaminacijo monoaminov. Poznani sta dve izoformi, MAO-A in MAO-B, ki se razlikujeta po obliki in velikosti aktivnega mesta ter posledično po substratih, ki sta jih sposobni metabolizirati. Encima imata pomembno vlogo pri različnih nevrodegenerativnih stanjih (kot sta na primer Alzheimerjeva bolezen in Parkinsonova bolezen), zato je bilo razvitih že več reverzibilnih in ireverzibilnih zaviralcev ene ali obeh izoform MAO.

V sklopu magistrske naloge smo načrtovali in sintetizirali 1-(prop-2-in-il)piperidinske analoge na osnovi že znanega zaviralca MAO-B 4-(4-fluorostiril)-1-propargilpiperidina. Uporabili smo večstopenjsko sintezno pot, ki je obsegala *terc*-butil karbamatno (Boc) zaščito piperidin-4-karboksilne kisline, redukcijo le-te do aldehida preko Weinrebovega amida, Wittigovo reakcijo, odstranitev Boc zaščite, alkilacijo piperidinskega dušika in po potrebi tudi redukcijo dvojne vezi. Sintetizirali smo *cis*, *trans* in reducirane analoge 4-(4-fluorostiril)-1-propargilpiperidina, pri čemer smo 4-fluorofenilni fragment zamenjali z različno substituiranimi fenilnimi in heteroaromatskimi fragmenti.

Sintetiziranim končnim spojinam smo z biokemijskim testiranjem na izoliranih rekombinantnih humanih MAO-A in MAO-B določili zaviralno aktivnost. Najmočnejša zaviralca na MAO-B sta bila (*E*)-1-(prop-2-in-1-il)-4-(4-(trifluorometil)stiril)piperidin (**31**) in 1-(prop-2-in-1-il)-4-(4-(trifluorometil)fenetil)piperidin (**32**) z IC₅₀ vrednostima 18,6 nM in 10,9 nM. Ugotovili smo, da imajo *trans* in reducirani derivati na MAO-B primerljivo zaviralno aktivnost, ki je za 1–2 velikostna razreda večja od aktivnosti *cis* derivatov. Za najugodnejšo se je izkazala *para* substitucija na benzenu s halogenom, na podlagi česar lahko sklepamo, da tvori pomembne interakcije v aktivnem mestu encima.

Zaključimo lahko, da spojini **31** in **32** predstavljata pomembno izhodišče za nadaljnje raziskovanje novih močnih zaviralcev MAO-B kot potencialnih zdravilnih učinkovin za terapijo nevrodegenerativnih bolezni.

Ključne besede: MAO, ireverzibilni inhibitorji, nevrodegenerativne bolezni, Wittigova reakcija

ABSTRACT

Monoamine oxidases (MAO) are enzymes, which can be found on the outer mitochondrial membrane and catalyse oxidative deamination of monoamines. Two isoforms are known, MAO-A and MAO-B. They differ in size and shape of the active site, which introduces the difference in the specificity for the substrates they metabolise. Enzymes play an important role in different neurodegenerative disorders (e.g. Alzheimer's disease, Parkinson's disease), therefore, many reversible and irreversible inhibitors of one or both isoforms have already been developed.

As a part of this master's thesis we designed and synthesized 1-(prop-2-yn-1-yl)piperidine analogues on the basis of a known MAO-B inhibitor 4-(4-fluorostyryl)-1-propargylpiperidine. We used multi-step synthetic route, which included *tert*-butyl carbamate (Boc) protection of piperidine-4-carboxylic acid, its reduction to aldehyde via Weinreb amide, Wittig reaction, Boc removal, *N*-alkylation of piperidine and, if necessary, a reduction of double bond. We synthesized diverse set of *cis*, *trans* and reduced analogues of 4-(4-fluorostyryl)-1-propargylpiperidine, where 4-fluorophenyl fragment was replaced by differently substituted phenyl and heteroaromatic rings.

We evaluated synthesized final compounds biochemically on isolated recombinant human MAO-A and MAO-B and determined inhibitory activity. The most potent inhibitors were (*E*)-1-(prop-2-in-1-yl)-4-(4-(trifluoromethyl)styryl)piperidine (**31**) and 1-(prop-2-in-1-yl)-4-(4-trifluoromethyl)phenetyl)piperidine (**32**) with IC₅₀ values of 18,6 nM and 10,9 nM, respectively. We found out that *trans* and reduced derivatives have similar inhibitory activity on MAO-B, which is 1-2 fold higher than *cis* derivatives activity. According to our assays *para* substitution with halogen on a benzene ring is preferred, probably due to important interactions with the enzyme's active site.

To conclude, compounds **31** and **32** represent important starting point for further research of novel potent MAO-B inhibitors as potential drugs for the therapy of neurodegenerative diseases.

Keywords: MAO, irreversible inhibitors, neurodegenerative disorders, Wittig reaction

SEZNAM OKRAJŠAV

5-HT	Serotonin
A	Adrenalin
AD	Alzheimerjeva bolezen
AK	Aminokislina
ATR	Tehnika oslabiljene popolne odbojnosti
Boc	<i>Terc</i> -butil karbamat
CŽS	Centralni živčni sistem
δ	Kemijski premik
DA	Dopamin
DMAP	4-dimetilaminopiridin
DMSO	Dimetilsulfoksid
ekv.	Množinski ekvivalent
EDC	3-(((etilimino)metilen)amino)- <i>N,N</i> -dimetilpropan-1-amin
FAD	Flavin adenin dinukleotid
HOBt	Hidroksibenzotriazol
Hz	Hertz
IC ₅₀	Srednja inhibitorja koncentracija
IR	Infrardeča spektroskopija
<i>J</i>	Sklopitvena konstanta
KHMDS	kalijev bis(trimetilsilil)amid
MAO	Monoamin oksidaza
MAO-A	Monoamin oksidaza tipa A
MAO-B	Monoamin oksidaza tipa B
MNT	Monoaminski živčni prenašalec
MS	Masna spektrometrija
NA	Noradrenalin
NaHMDS	Natrijev bis(trimetilsilil)amid
NMR	Jedrsko magnetnoresonančna spektroskopija
OPA	Oksafosfetan
PD	Parkinsonova bolezen
PE	Beta-fenetilamin

ppm	Parts per million
RA	Rezidualna aktivnost
RIMA	Reverzibilni zaviralci monoamin oksidaze tipa A
R _f	Retencijski faktor
HPLC	Tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti
t _R	Retencijski čas
T _{REF}	Temperatura refluksa
T _{TAL}	Temperatura tališča
TBTU	2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3,-tetrametiluronijev tetrafluoroborat
THF	Tetrahidrofuran
TLC	Tankoplastna kromatografija

1. UVOD

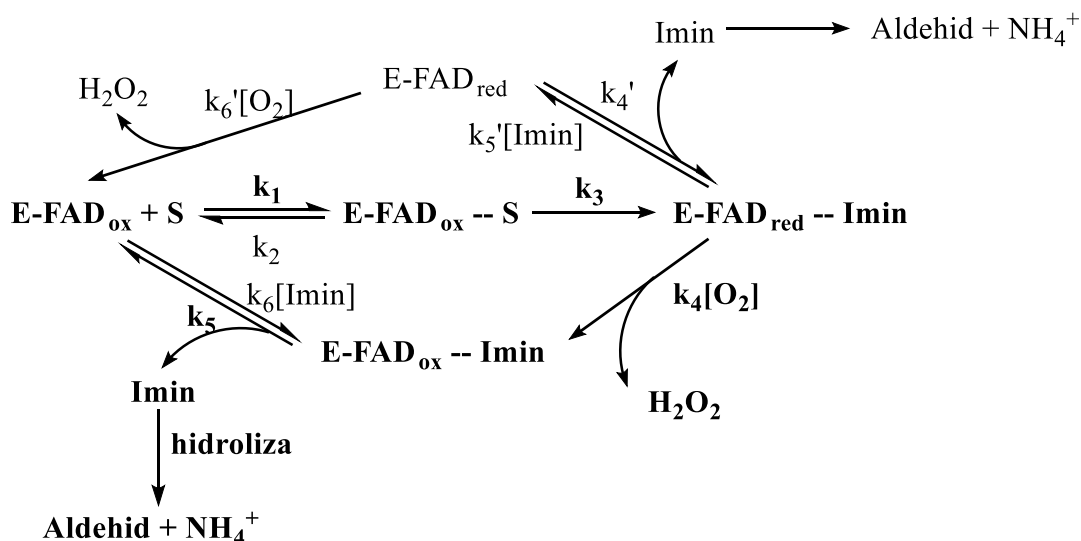
1.1. MONOAMIN OKSIDAZA

Monoamin oksidaze (MAO) so encimi, ki katalizirajo oksidativno deaminacijo monoaminov, pri čemer kot kofaktor sodeluje kovalentno vezan flavin adenin dinukleotid (FAD) v obliki 8α -S-cisteinil FAD. Metabolizirajo primarne, sekundarne in terciarne amine, do diaminov pa imajo bistveno manjšo afiniteto. Odkriti sta bili dve izoformi encima, MAO-A in MAO-B, ki ju kodirata različna gena na X kromosomu. Kljub temu je njuno aminokislinsko zaporedje v približno 70 % enako (1, 2). Med razvojem zarodka se MAO-A razvije pred MAO-B, ekspresija slednjega pa se v možganih močno zveča po rojstvu in se povečuje vse do smrti. Encima, ki se nahajata na zunanji membrani mitohondrijev, sta sicer prisotna v večini tkiv v telesu, variira pa njuno razmerje v posameznih tkivih. Imunohistološke študije so pokazale, da se v kateholaminični nevronih nahaja pretežno izoforma MAO-A, v serotoninični nevronih in astrocitih pa MAO-B (3, 4).

Oba encima sta sestavljena iz treh domen. Ena od njih je namenjena vezavi prostetične skupine FAD, druga vezavi substrata, preko tretje domene pa je encim vezan na membrano mitohondrija (5).

Bistvena razlika med izoformama je njuna različna selektivnost do substratov. Oba encima ob prisotnosti FAD kot akceptorja protonov vršita pretvorbo aminov do ustreznih aldehydov, pri čemer se porabljata O_2 in H_2O , nastaneta pa H_2O_2 in NH_3 pri deaminaciji primarnih aminov oziroma nov amin pri deaminaciji sekundarnih ali terciarnih aminov. Reakcija oksidacije poteče preko imina po eni od dveh glavnih reakcijskih poti. Večinoma se deprotoniran amin substrata veže v aktivno mesto encima, kjer poteče oksidacija amina do imina ob hkratni redukciji FAD do hidrokinonske oblike. Reducirani kofaktor se nato oksidira ob prisotnosti O_2 , pri čemer nastane H_2O_2 . Sprostitvi protoniranega imina z encima sledi nekatalitična hidroliza do NH_4^+ oziroma ustreznega protoniranega amina in ustreznega aldehyda (2, 6). Glavni reakcijski poti sta shematsko prikazani na sliki 1. Čeprav ima H_2O_2 lahko pomembno vlogo pri metabolizmu in signalizaciji v možganih, dobljeni aldehydi pa so udeleženi pri regulaciji spanja, so ti produkti v povišanih koncentracijah

toksični. Do organizmu neškodljivih produktov jih zato takoj metabolizirajo drugi encimi (1,3).



Slika 1: Shematski prikaz glavnih reakcijskih poti MAO katalize (prirejeno po (6)).

S krepkim tiskom je označena prevladujoča reakcijska pot.

V črevesju, jetrih, pljučih in drugih perifernih tkivih MAO ščiti organizem pred škodljivimi učinki eksogenih aminov preko preprečitve vstopa le-tem v sistemski krvni obtok ali z njihovo razgradnjo v krvi. V centralnem živčnem sistemu (CŽS) in perifernemu živčnem sistemu pa poleg zaščite pred eksogenimi amini MAO skrbi še za razgradnjo monoaminskih živčnih prenašalcev (MNT) in s tem za prenehanje njihovega učinka ter za regulacijo zaloge intracelularnih aminov (3).

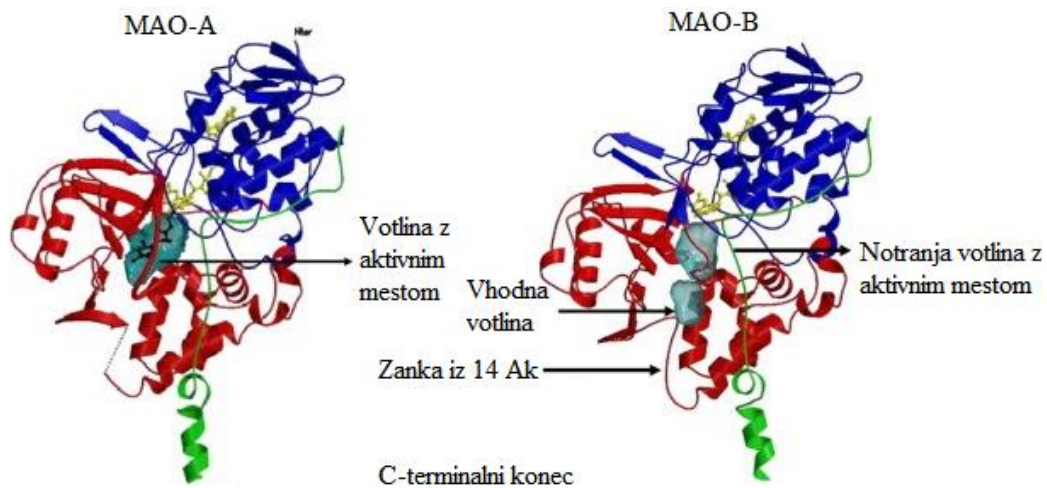
1.2. PRIMERJAVA MED MAO-A IN MAO-B

Encima se na zunanji membrani mitohondrijev nahajata v obliki dimerov (7). Vsaka od monomernih enot je z α -vijačnico iz 27 aminokislinskih (AK) ostankov na C-terminalnem delu encima zasidrana v membrano, tako da preostanek encima gleda bodisi v citoplazmo (MAO-A), bodisi v medmembranski prostor (MAO-B). Dodatno stabilizacijo tvorijo hidrofobne stranske verige aminokislin (AK), ki so usmerjene proti membrani (8, 9).

Ključna razlika med izoformama je v velikosti in obliki aktivnega mesta. Za obe izoformi velja, da se substrati v aktivnem mestu vežejo preko mesta N-5 na *re*-stran flavina, ki omejuje eno od strani votline z aktivnim mestom. Le-to se nahaja v topilu nedostopnem okolju.

Izoforma MAO-B ima domeno, namenjeno vezavi substrata, sestavljeno iz dveh med seboj povezanih votlin, vhodne votline z velikostjo $\sim 290 \text{ \AA}^3$ in notranje votline z aktivnim mestom z velikostjo $\sim 400 \text{ \AA}^3$. Slednjo votlino zamejujejo aromatski in alifatski AK ostanki, ki ustvarjajo močno hidrofobno okolje. Tudi vhodna votlina je obdana z AK ostanki, ki ustvarjajo hidrofobno okolje, poleg tega pa jo na zunanji strani prekriva zanka iz 14 AK, ki onemogoča vstop topila v votlino. Votlini sta v konformaciji encima brez vezanega substrata ločeni s stranskimi verigami 4 AK, med katerimi najpomembnejšo vlogo igra Ile199. Predlagani mehanizem vezave substrata zajema premik zanke, s katerim je omogočen vstop substrata v vhodno votlino. Ta vstop sproži spremembo konformacije encima, zaradi česar se razmaknejo AK ostanki, ki sestavljajo votlini. Pride do spojitve obeh votlin in substrat lahko dostopa do aktivnega mesta. Zanka, ki prekriva vhodno votlino, je torej stikalo, ki omogoča substratu dostop do aktivnega mesta, in se nahaja proksimalno na domeno, preko katere se substrat veže na membrano. Substrat tako do aktivnega mesta dostopa preko površine proteina, obrnjene proti membrani mitohondrija (8, 11).

Domena, namenjena vezavi substrata, je pri izoformi MAO-A sestavljena zgolj iz ene votline velikosti $\sim 550 \text{ \AA}^3$ (10, 11). Zamejena je z aromatskimi in alifatskimi AK ostanki, ki ustvarjajo hidrofobno okolje. Samo aktivno mesto je pri MAO-A večje in bolj okroglo kot pri MAO-B, kjer je podolgovato, zato imajo pri prvem substratu večjo možnost rotacije znotraj aktivnega mesta (11, 12). Strukturi izoform MAO-A in MAO-B sta predstavljeni na sliki 2.



Slika 2: Strukturi monomernih enot izoform MAO-A in MAO-B.

Z zeleno barvo je označena domena, namenjena vezavi encima na membrano. Domena, namenjena vezavi substrata, je označena z rdečo. Modro obarvani del predstavlja domeno, namenjeno vezavi prostetične skupine (prirejeno po (1)).

1.2.1. VRSTE SUBSTRATOV

Zaradi razlik v aktivnih mestih posamezne izoforme se v encima ne vežejo vsi substrati z enako afiniteto. V večje aktivno mesto izoforme MAO-A se z večjo afiniteto vežejo bolj »voluminozni« substrati. Primeri le-teh so serotonin (5-HT), noradrenalin (NA) in adrenalin (A). Medtem sta preferenčna substrata MAO-B manjša in manj razvejana benzilamin in β -fenetilamin (PE). Substrati, kot so dopamin (DA), tiramin in triptamin, se s precej podobno K_M vežejo na obe izoformi (13).

1.3. VRSTE ZAVIRALCEV

Ena od glavnih zahtev zaviralcev določenega encima je običajno ta, da so selektivni. S selektivnimi zaviralci MAO sicer dosežemo zaviranje le-tega tipa encimov, vendar to v primeru MAO običajno ni dovolj. Ugotovljeno je bilo namreč, da izoformi sodelujeta v različnih patoloških procesih in imata različne neželene učinke, zato je pri novejših zaviralcih zaželeno celo izoformna selektivnost.

Poznamo reverzibilne in ireverzibilne zaviralce MAO, oboji se uporabljajo v terapiji različnih nevroloških stanj. Večinoma gre za dolgotrajne ali kronične bolezni, zato je dolg

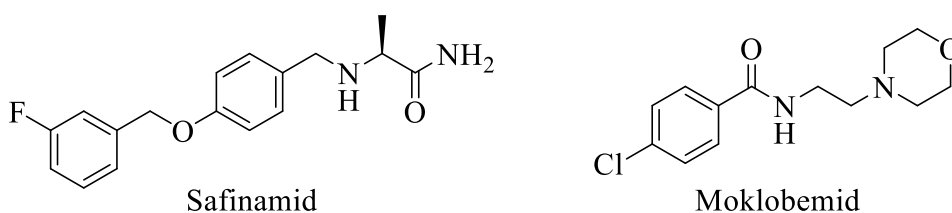
učinek delovanja prednost ireverzibilnih zaviralcev, katerih aplikacija je tako zgolj enkrat dnevna. Prav tako pa je dolg lahko čas trajanja neželenih učinkov. Med problematične neželene učinke spadata serotoninski sindrom in hipertenzivna kriza, angleško imenovana "cheese effect" (1). Serotoninski sindrom je potencialno življenje ogrožujoče stanje, katerega značilni simptomi so tremor, diareja, v hujših primerih pa tudi delirij, nevromuskularna rigidnost in hipertermija. Sindrom je posledica močno povečanih koncentracij 5-HT oziroma povečanega učinka 5-HT, do katerih pride pri sočasni uporabi zaviralcev MAO in zaviralcev ponovnega privzema 5-HT (sem sodijo selektivni zaviralci ponovnega privzema serotonina, zaviralci ponovnega privzema serotonina in noradrenalina ter triciklični antidepresivi) (14). Do hipertenzivne krize lahko pride pri uporabi izoformno neselektivnih zaviralcev MAO ali selektivnih zaviralcev MAO-A. Tiramin in ostali simpatikomimetični amini, ki se nahajajo v številnih vrstah hrane (tudi v siru), so sicer primerni substrati za obe izoformi, vendar bodo njihove plazemske koncentracije značilno povišane prav zaradi zaviranja MAO-A. Le-ta izoforma je namreč prevladujoča v gastrointestinalnem traktu in jetrih, preko katerih se absorbirajo in metabolizirajo eksogene spojine. Povišane plazemske koncentracije tiramina ali drugih, njemu podobnih aminov, ki imajo pozitivno inotropno delovanje, bodo tako povečale sistolični krvni tlak, kar v nekaterih primerih lahko privede do življenje ogrožujoče hipertenzivne krize (1, 15).

1.3.1. REVERZIBILNI ZAVIRALCI

Reverzibilni zaviralci imajo načeloma boljši varnostni profil. V sklopu reverzibilnih zaviralcev MAO-B je bila razvita učinkovina safinamid, ki je hkrati tudi zaviralec ponovnega privzema DA, blokira napetostno odvisne natrijeve kanalčke, modulira kalcijeve kanalčke in zavira sproščanje glutamata. Vsi ti mehanizmi delovanja privedejo do povečanja koncentracij DA, izboljšane kognicije in nevroprotektivnega delovanja (16).

Glavni namen razvoja reverzibilnih zaviralcev MAO-A (RIMA) je bilo učinkovito zaviranje te izoforme, ki pa ne bi povzročilo z zaviranjem MAO-A povzročene hipertenzivne krize. Tiramin in njemu podobni amini iz hrane lahko v visokih koncentracijah kompetitivno izrinejo RIMA iz aktivnega mesta encima, se tako normalno metabolizirajo in ne povzročijo hipertenzivne krive. Za zagotovitev terapevtske učinkovitosti morajo imeti RIMA dovolj visoko afiniteto do MAO-A, da jih endogeni substrati minimalno kompetitivno izrinejo. DA je primeren substrat za obe izoformi, zato

RIMA ne povečajo njegovih plazemskih koncentracij v stacionarnem stanju, saj se presežek lahko metabolizira z MAO-B. Uporabnost RIMA je predvsem pri patoloških stanjih, ki so posledica primanjkljaja 5-HT in NA, selektivnih substratov za MAO-A. Zaviranje MAO-A in nezmožnost metabolizma z MAO-B vodi v povečanje plazemskih koncentracij 5-HT in NA. Primeri RIMA so moklobemid, toloksaton, brofaromin in befloksaton (17). Na sliki 3 sta predstavljena predstavnika reverzibilnih zaviralcev na MAO-B in MAO-A.



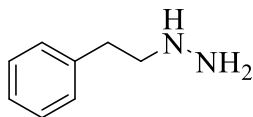
Slika 3: Safinamid, kot primer reverzibilnega zaviralca MAO-B, in moklobemid, kot primer RIMA.

1.3.2. IREVERZIBILNI ZAVIRALCI

Struktura ireverzibilni zaviralcev mora posedovati nekaj ključnih lastnosti. Del molekule, ki je odgovoren za afiniteto do encima, mora z njim tvoriti podobne interakcije kot substrati. Za ireverzibilno zaviranje pa je izjemno pomemben tisti del molekule, ki vstopa v kovalentne interakcije z encimom, v našem primeru s kofaktorjem FAD. Po vezavi ireverzibilnih zaviralcev je za ponovno delovanje encima potrebna sinteza novih molekul le-tega. MAO aktivnost v nevronih je izredno visoka in ugotovljeno je bilo, da je za ustrezne farmakološke učinke potrebno vsaj 80 % zaviranje MAO. Z vsakodnevno aplikacijo ireverzibilnih zaviralcev MAO po določenem času dosežemo plato – maksimalno možno zaviranje, ki ga z relativno nizkimi dnevnimi odmerki lahko vzdržujemo skozi daljše obdobje (1).

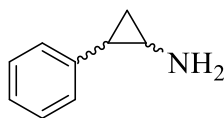
Razvitih je bilo že veliko vrst ireverzibilnih zaviralcev MAO z najrazličnejšimi osnovnimi skeleti, vendar so le redki od njih registrirani kot učinkovine. Zgodovinsko gledano so prvo skupino ireverzibilnih zaviralcev MAO sestavljali hidrazini. Med njimi je omembe vredna učinkovina fenelzin, predstavljen na sliki 4, ki se že več kot 50 let uporablja za zdravljenje depresije, paničnih motenj in socialne anksioznosti. Fenelzin je izoformno neselektivni

ireverzibilni zaviralec MAO, prav tako je substrat za MAO, ki ga le-ta metabolizira do β -feniletilidenhidrazina, šibkejšega zaviralca MAO. Uporaba fenelzina je danes omejena zaradi hipertenzivnih kriz, ki jih povzroča (18).



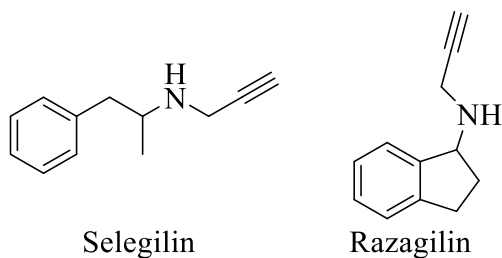
Slika 4: Fenelzin, kot predstavnik prve skupine ireverzibilnih zaviralcev MAO.

Edini danes še uporabljan zaviralec MAO iz skupine ciklopropilaminov je tranilcipromin. Vsebuje 2 stereogena centra, za ireverzibilno zaviranje MAO je odgovoren (+)-enantiomer, medtem ko (-)-enantiomer zavira ponovni prevzem MNT in stimulira njihovo sproščanje. Preko teh mehanizmov in povečanja ekspresije različnih podenot receptorjev γ -aminomaslene kisline tipa B učinkovito deluje kot antidepresiv. Zaradi hudih neželenih učinkov, ki jih tranilcipromin povzroča, je njegova uporaba danes omejena na paciente z rezistentnimi oblikami depresij, ki to zdravilo dobro prenašajo. Struktura molekule je predstavljena na sliki 5 (19).



Slika 5: Tranilcipromin, kot glavni predstavnik skupine ciklopropilaminov.

Ireverzibilni zaviralci MAO, ki se danes največ uporabljajo, sodijo v skupino propargilaminov. Prva učinkovina tega tipa je bila pargilin, ki izkazuje majhno selektivnost MAO-B nad MAO-A. V naslednjih letih je bilo razvitih še več učinkovin, danes sta pomembni predvsem dve, selegilin in razagilin, selektivna inhibitorja MAO-B. Obe učinkovini sta učinkovita antiparkinsonika, ki se lahko uporabljata v monoterapiji ali v kombinaciji z L-DOPA (20). Med neželenimi učinki ni hipertenzivne krize, pri selegilinu se zaradi metabolizma do amfetamina in metamfetamina lahko pojavijo evforija in motnje spanja. Obe spojini sta kiralni. Selegilin izkazuje majhno stopnjo stereoselektivnosti, večjo jakost ima *S*(-)-enantiomer. Nasprotno je razagilin močno stereoselektiven, jakost *R*(+)-enantiomera je za 3 velikostne razrede večja od *S*-enantiomera. Obe učinkovini sta predstavljeni na sliki 6 (21).



Slika 6: Predstavnik današnje najbolj uporabljane propargilaminske skupine ireverzibilnih zaviralcev MAO.

1.4. TERAPEVTSKA UPORABA

Zaviralci MAO so uporabni pri patoloških stanjih, povezanih s spremenjeno učinkovitostjo MNT, predvsem 5-HT, NA in DA. Najpogostejša nevrološka stanja, povezana s primanjkljajem teh živčnih prenašalcev so depresija, Parkinsonova bolezen in Alzheimerjeva bolezen.

1.4.1. PARKINSONOVA BOLEZEN

Parkinsonova bolezen (PD) je progresivna nevrodegenerativna motnja, do katere pride zaradi propadanja dopaminergičnih nevronov v pars compacta, delu substance nigre. Prizadene več kot 0,1 % populacije, starejše od 40 let. Med tipične znake spadajo tremor v mirovanju, bradikinezija ali celo akinezija, motnje ravnotežja, pacienti pa pogosto občutijo tudi simptome anksioznosti, depresije in demence (22). Prav tako je za PD značilna zmanjšana ekspresija encima aldehyd dehidrogenaze v substanci nigri. To privede do kopičenja citotoksičnih aldehydov, ki dodatno lahko z amini tvorijo toksične adukte, povezane s PD (3, 23). Uporabnost zaviralcev MAO je torej dvojna. Z zaviranjem MAO povečujejo sinaptične koncentracije DA, hkrati pa imajo tudi nevroprotektivne lastnosti. Z zaviranjem metabolizma MNT zmanjšujejo nastanek H_2O_2 in citotoksičnih aldehydov (24).

V terapiji PD se uporabljajo predvsem selektivni zaviralci MAO-B. Ne povzročajo hipertenzivne krize, poleg tega je pri bolnikih s PD v bazalnih ganglijah ekspresija izoforme MAO-B bistveno večja od MAO-A. Selektivno zaviranje MAO-B tudi povzroči povečanje sinaptičnih koncentracij PE, ki spodbuja dodatno sproščanje DA. Paciente se v zgodnjih stopnjah lahko zdravi zgolj z zaviralci MAO-B, kasneje se uporablja tudi kombinacija z L-DOPA in zaviralci katehol-O-metiltransferaze (3).

1.4.2. ALZHEIMERJEVA BOLEZEN

Alzheimerjeva bolezen (AD) je progresivna nevrodegenerativna bolezen, za katero je značilna izguba spomina. Njena prevalenca se s staranjem prebivalstva povečuje. Za AD je značilna okrnjenost več MNT sistemov, najbolj holinergičnega. V možganih bolnikov z AD je tudi povečana aktivnost izoforme MAO-B, kar privede do povečanih koncentracij toksičnih produktov, ki pripomorejo k nevrotoksičnosti. V terapiji so torej uporabni zaviralci acetilholin esteraze in selektivni zaviralci MAO-B (3, 25).

1.4.3. DEPRESIJA

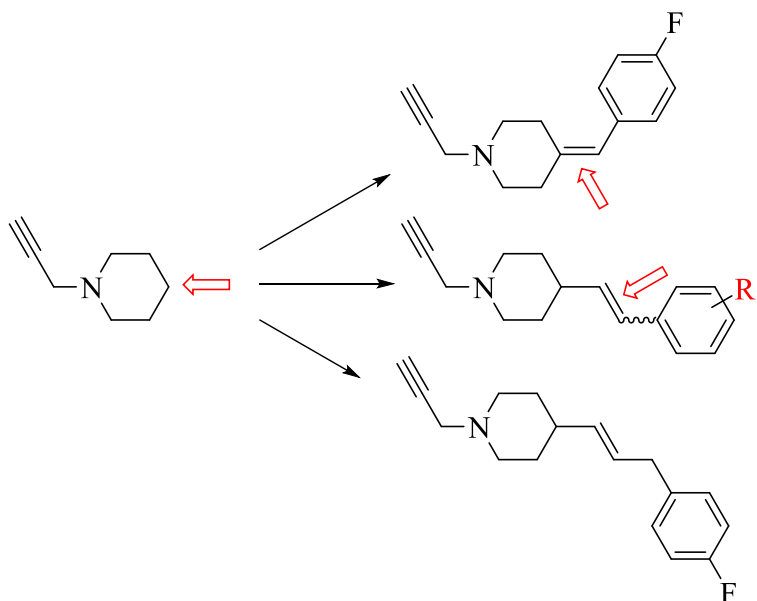
Depresija je pogosta duševna motnja, ki vsaj enkrat prizadane enega od petih posameznikov tekom njegovega življenja. Zanj so odgovorni 5-HT, DA in NA. V 60-ih letih prejšnjega stoletja so razvili monoaminsko teorijo, po kateri je zmanjšana aktivnost MNT v določenih predelih CŽS odgovorna za nastanek depresije. Kritiki teorije so navajali, da se povečanje aktivnosti MNT ne odraža nujno v antidepresivnem učinku, prav tako odziv pacientov na posamezen antidepresiv ni enak, učinek antidepresivov pa se pokaže šele po nekaj tednih, čeprav se povečanje sinaptičnih koncentracij MNT zgodi že v nekaj urah. Pomanjkljivosti stare teorije je odpravila modificirana monoaminska teorija, ki pravi, da je akutno povečanje koncentracij MNT zgolj začetek, ki privede do desenzitizacije inhibitornih auto- in heteroreceptorjev. Šele to pa privede do povečanja aktivnosti MNT, kar pa časovno sovpada z zapoznelim terapevtskim odgovorom (26, 27).

Terapevtsko uporabni so predvsem zaviralci izoforme MAO-A, ki je edina, ki metabolizira 5-HT in NA. Ireverzibilni zaviralci MAO-A in neselektivni zaviralci MAO povzročijo hipertenzivno krizo, zato se danes kot antidepresivi uporabljajo predvsem reverzibilni zaviralci MAO-A (28).

2. NAMEN DELA

Cilj našega dela je načrtovanje in sinteza novih zaviralcev MAO kot potencialnih zdravilnih učinkovin. Na osnovi že znanega, objavljenega zaviralca MAO-B 4-(4-fluorostiril)-1-propargilpiperidina bomo sintetizirali 1-(prop-2-in-1-il)piperidinske analoge. Modifikacije bomo izvajali na mestu 4 piperidinskega skeleta. Zadali smo si naslednje cilje:

- sinteza analogov z daljšo ali krajšo fenilalkenilno verigo, pripeto na piperidinski skelet (slika 7),
- sinteza spojin z različnimi substituenti, vezanimi na *meta* ali *para* mesto na benzenskem obroču 1-(prop-2-in-1-il)-4-stirilpiperidina (slika 7). Z redukcijo bomo pri nekaterih spojinah pripravili tudi nasičene derivate.



Slika 7: Načrtovane spremembe na 1-(prop-2-in-1-il)piperidinskem skeletu (z rdečo so označeni variabilni deli molekule).

Ker je bilo ugotovljeno, da lahko s *cis/trans* izomerijo dosežemo selektivnost na izoformah MAO (34), bo naš namen sintetizirati in izolirati optično čim bolj čiste končne spojine.

Vsem končnim spojinam bomo v biokemijskem testu ovrednotili zaviralno delovanje na MAO-A in MAO-B. Določili jim bomo rezidualno aktivnost, aktivnim spojinam pa tudi IC_{50} vrednost. Na podlagi dobljenih rezultatov bomo poskušali ovrednotiti vpliv posameznih modifikacij na zaviralno aktivnost spojin na obeh izoformah MAO.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

Pri delu smo uporabili topila in reagente različnih proizvajalcev (Acros Organics, Sigma-Aldrich, TCI Europe, Merck, Carlo Erba, Apollo Scientific, Alfa Aesar, Maybridge) brez posebne predpriprave. Brezvodni THF smo pripravili z destilacijo ob prisotnosti natrija in benzofenona v argonovi atmosferi.

3.2. METODE

3.2.1. KROMATOGRFSKE METODE

Tankoplastna kromatografija (TLC): TLC smo uporabili za spremljanje poteka reakcij ter preverjanje čistosti vmesnih in končnih spojin. Pri tem smo uporabili plošče TLC Silica gel 60 F₂₅₄ proizvajalca Merck, ki imajo na aluminijastem nosilcu velikosti 20 × 20 cm nanešen silikagel s fluorescentnim indikatorjem debeline 0,20 mm. Uporabljene mobilne faze so bile različne in so navedene pri posamezni spojini. Prisotnost spojin smo detektirali z UV svetlobo pri valovnih dolžinah $\lambda = 254$ nm in $\lambda = 366$ nm ter orositvenim reagentom ninhidrinom.

Kolonska "flash" kromatografija: Za ločitev vmesnih spojin, ki so izkazovale *cis/trans* izomerijo, in čiščenje končnih spojin smo uporabili kolonsko "flash" kromatografijo. Stacionarno fazo je predstavljal silikagel 60 proizvajalca Merck z velikostjo delcev 0,04-0,063 mm. Mobilne faze so bile različne in so navede pri sintezah posameznih spojin.

Tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti z reverzno fazo (HPLC): Končne spojine smo analitsko ovrednotili s HPLC po eni od dveh metod, kot je navedeno pri posamezni spojini. Pri metodi A smo HPLC izvedli na modularnem sistemu Agilent 1100 LC z G1365B UV detektorjem (220 nm). Uporabili smo Agilent Eclipse Plus C18 kolono (15 μ m, 4,6 x 150 mm), termostatorirano na 25 °C. Volumen injiciranja vzorca je znašal 15 μ L, njegova koncentracija v acetonitrilu pa 0,2 mg/mL. Hitrost pretoka mobilne faze je bila 1,0 mL/min. Mobilna faza je bila mešanica 0,1 % raztopine trifluorocetne kisline v vodi in acetonitrila. Gradient acetonitrila je znašal: 0–12 min, 10–90 %; 12–14 min, 90 %; 14–15 min, 90–10 %. Pri metodi B smo HPLC izvedli na sistemu Thermo Scientific Dionex

UltiMate 3000 z G1365B UV detektorjem (220 nm). Uporabili smo Thermo Scientific Accucore C18 kolono (2,6 μm , 4,6 x 100 mm), termostatirano na 25 °C. Volumen injiciranja vzorca je znašal 15 μL , njegova koncentracija v acetonitrilu pa 0,2 mg/mL. Hitrost pretoka mobilne faze je bila 1,0 mL/min. Mobilna faza je bila mešanica 0,1 % trifluorocetne kisline v vodi in acetonitrila. Gradient acetonitrila je znašal: 0–5 min, 5 %; 5–15 min, 5–90 %; 15–18 min, 90 %; 18–20 min, 90–5 %.

3.2.2. SPEKTROSKOPSKE METODE

Jedrska magnetnoresonančna spektroskopija (NMR): NMR smo uporabili za identifikacijo in preverjanje čistosti naših spojin. Vmesnim spojinam smo posneli ^1H NMR spekter, končnim spojinam pa ^1H NMR in ^{13}C NMR spekter. Uporabili smo Bruker AVANCE III 400 MHz spektrometer, ki se nahaja na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Vzorce smo predhodno raztopili v 600 μL enega od devteriranih topil CDCl_3 ali DMSO-d_6 , ki jim je kot interni standard dodan TMS. Kemijske premike (δ) smo podali v “parts per million” na podlagi internega standarda (TMS δ 0,00 ppm). Sklopitvene konstante (J) smo podali v hertzih (Hz), vrhove pa glede na obliko označili s standardnimi oznakami za singlet (s), razširjen singlet (rs), dublet (d), dublet dubleta (dd), dublet dubleta dubleta (ddd), dublet tripleta dubleta (dtd), razširjen dublet (rd), triplet (t), triplet dubleta (td), triplet dubleta dubleta (tdd), triplet tripleta (tt) in multiplet (m). Za obdelavo spektrov smo uporabili računalniški program MestRe-C 4.5.6.0 proizvajalca Mestrelab Research S.L.

Infrardeča spektroskopija (IR): Končnim spojinam smo s tehniko oslABLJENE popolne odbojnosti (ATR) posneli IR spekter. Predpriprava vzorca ni bila potrebna. Meritve smo izvedli na spektrofotometru FT-IR Thermo Nicolet, model Nexus, s programsko opremo Omnic E.S.P. 5.2., v srednjem IR-območju. Meritve so potekale na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

Masna spektrometrija (MS): Končnim spojinam so bili posneti masni spektri v ESI-HRMS tehniki v Centru za masno spektrometrijo na Institutu »Jožef Stefan« v Ljubljani. Pri tem je bil uporabljen Q-TOF Premier visoko ločljivi tandemski masni spektrometer z analizatorjem na čas preleta ionov-TOF z elektrosprej ionizacijo (ESI) in LC-MS sklopitvijo proizvajalca Micromass Waters.

Vmesnim spojinam smo masne spektre posneli v ESI tehniki na masnem spektrometru ADVION expression CMSL na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

3.2.3. DOLOČANJE TEMPERATURE TALIŠČA

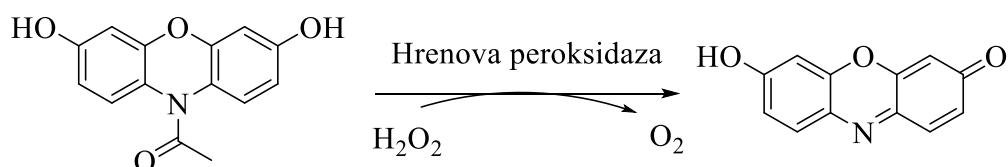
Končnim spojinam smo določili nekorigirano temperaturo tališča s pomočjo Kofflerjevega mikroskopa z ogrevalno mizico Leica na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

3.2.4. POIMENOVANJE IN RISANJE SPOJIN

Za risanje in poimenovanje struktur spojin ter za risanje reakcijskih shem smo uporabili računalniški program ChemDraw Professional 15.1.0.144 proizvajalca PerkinElmer Informatics, Inc.

3.2.5. BIOKEMIJSKO TESTIRANJE

Sintetiziranim končnim spojinam smo biokemijsko določili zaviralno aktivnost na obeh izoformah MAO. Aktivnost encima smo določili posredno, sproščeni H_2O_2 in dodana peroksidaza sta pretvorila Amplex Red reagent do resorufina (slika 8), katerega koncentracijo smo določili fluorimetrično (30).



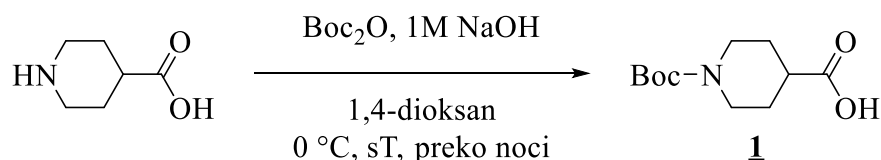
Slika 8: Prikaz s hrenovo peroksidazo katalizirane pretvorbe Amplex Red reagenta do resorufina.

Za izvedbo testa smo uporabili izolirana rekombinantna humana mikrosomalna encima MAO-A in MAO-B. Encima sta bila pripravljena iz insektnih celic, okuženih z rekombinantnim bakulovirusom, ki je vseboval cDNA vključke humane MAO-A ali MAO-B. Uporabili smo tudi hrenovo peroksidazo in p-tiramin, ki je bil substrat za MAO. Amplex Red reagent (10-acetil-3,7-dihidroksifenoksazin) smo sintetizirali, kot je zapisano v literaturi (31).

V 100 μL 50 mM fosfatnega puфра (pH = 7,4, dodan 0,05 % V/V Triton X-114) s končno sintetizirano spojino ali referenčnim zaviralcem smo resuspendirali takšno količino MAO-A ali MAO-B, ki pretvori približno 15 pmol p-tiramina/min (0,3 μg MAO-A ali 1,4 μg MAO-B). Tako pripravljene suspenzije encima s spojinami v mikrotitrskih ploščicah smo inkubirali 15 min na 37 °C. Po predinkubaciji smo z dodatkom 250 μM Amplex Red reagenta, 2 E/mL hrenove peroksidaze in 1 mM p-tiramina do skupnega volumna 200 μL sprožili reakcijo. Preko naslednjih 15 min smo pri 37 °C kvantitativno določali količino nastalega resorufina s pomočjo fluorescence ($\lambda_{\text{EKSCITACIJA}} = 530 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EMISIJA}} = 590 \text{ nm}$). V kontrolnem poskusu smo namesto spojin, raztopljenih v DMSO, uporabili čisti DMSO. Iz dobljenih meritev smo spojinam določili rezidualne aktivnosti (RA). Spojinam z RA manjšo od 50 % smo v nadaljevanju določili RA pri sedmih različnih koncentracijah. Eksperimentalno določenim RA pri določeni koncentraciji v odvisnosti od koncentracije zaviralca smo med računalniško obdelavo prilegali Hillovo enačbo, na podlagi česar smo izračunali IC_{50} vrednosti (32).

4. EKSPERIMENTALNO DELO IN REZULTATI ANALIZ

4.1. SINTEZA 1-(*TERC*-BUTOKSIKARBONIL)PIPERIDIN-4-KARBOKSILNE KISLINE (**1**)

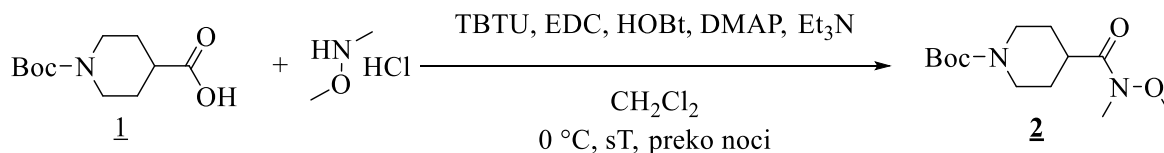


Slika 9: Reakcijska shema sinteze spojine **1**.

Piperidin-4-karboksilno kislino (7,75 g, 60,00 mmol, 1,0 ekv.) smo raztopili v zmesi 1 M NaOH (40 mL), 1,4-dioksana (40 mL) in vode (40 mL). Zmes smo ohladili na 0 °C in med mešanjem dodali Boc₂O (17,02 g, 78,00 mmol, 1,3 ekv.), ki smo ga predhodno raztopili v 1,4-dioksanu (40 mL). Reakcijsko zmes smo preko noči mešali pri sobni temperaturi. Organski del zmesi topil smo odstranili z rotavapiranjem, vodni preostanek reakcijske zmesi pa prenesli v lij ločnik in ekstrahirali z Et₂O (2 × 80 mL). Vodno fazo smo z 1 M HCl nakisali do pH 2–3 in ekstrahirali z EtOAc (2 × 100 mL). Združene organske faze smo sušili z Na₂SO₄, sušilno sredstvo smo odfiltrirali, topilo pa odstranili z rotavapiranjem.

IUPAC ime	1-(<i>terc</i> -butoksikarbonil)piperidin-4-karboksilne kislina (1)
Izgled	Beli kristali
Tališče	$T_{TAL} = 158\text{--}160\text{ }^\circ\text{C}$
Izkoristek	70,3 %
TLC	$R_f(\text{EtOAc/n-heksan} = 1/1, \text{ V/V}) = 0,19$
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,46 (s, 9H), 1,62–1,69 (m, 2H), 1,88–1,94 (m, 2H), 2,48 (tt, $J_1 = 10,9$ Hz, $J_2 = 3,9$ Hz, 1H), 2,82–2,89 (m, 2H), 4,03 (td, $J_1 = 13,6$ Hz, $J_2 = 3,7$ Hz, 2H), 9,13 (rs, 1H).

4.2. SINTEZA *terc*-BUTIL 4-(METOKSI(METIL)KARBAMOIL)-PIPERIDIN-1-KARBOKSILATA (**2**)

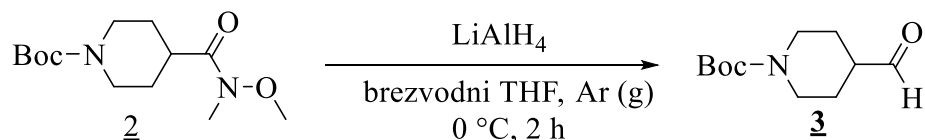


Slika 10: Reakcijska shema sinteze spojine **2**.

V bučki smo natehtano spojino **1** (9,63 g, 42,00 mmol, 1,0 ekv.) raztopili v CH₂Cl₂ (120 mL) in zmes ohladili na 0 °C. Dodali smo sklopitvene reagente TBTU (6,74 g, 21,00 mmol, 0,5 ekv.), EDC (7,30 g, 47,00 mmol, 1,1 ekv.), HOBT (2,84 g, 21,00 mmol, 0,5 ekv.) in pomožni nukleofil DMAP (0,51 g, 4,20 mmol, 0,1 ekv.) ter reakcijsko zmes mešali 20 min na ledeni kopeli. V ohlajeno reakcijsko zmes smo dodali Et₃N (17,56 mL, 126,00 mmol, 3,0 ekv.) in *N,O*-dimetilhidroksilaminijev klorid (4,92 g, 50,40 mmol, 1,2 ekv.) ter jo na ledeni kopeli mešali še 30 min. Pri sobni temperaturi smo reakcijsko zmes mešali preko noči. Z rotavapiranjem smo odstranili CH₂Cl₂, preostanku v bučki pa dodali EtOAc (140 mL) in H₂O (70 mL). Reakcijsko zmes smo prenesli v lij ločnik in izvedli ekstrakcijo z 10 % citrsko kislino (2 × 70 mL), H₂O (70 mL), NaHCO₃ (2 × 70 mL), H₂O (70 mL) in nasičeno raztopino NaCl (70 mL). Organsko fazo smo sušili z Na₂SO₄ in z rotavapiranjem odstranili organsko topilo do oljnega preostanka.

IUPAC ime	<i>terc</i> -butil 4-(metoksi(metil)karbamoil)piperidin-1-karboksilat (2)
Izgled	Bela amorfna snov
Tališče	$T_{TAL} = 68\text{--}72\text{ }^\circ\text{C}$
Izkoristek	73,6 %
TLC	R_f (EtOAc/n-heksan = 1/2, V/V) = 0,65
¹H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,45 (s, 9H), 1,61–1,74 (m, 4H), 2,72–2,83 (m, 3H), 3,17 (s, 3H), 3,70 (s, 3H), 4,17 (td, $J_1 = 13,4\text{ Hz}$, $J_2 = 2,9\text{ Hz}$, 2H)

4.3. SINTEZA *tert*-BUTIL 4-FORMILPIPERIDIN-1-KARBOKSILATA (**3**)

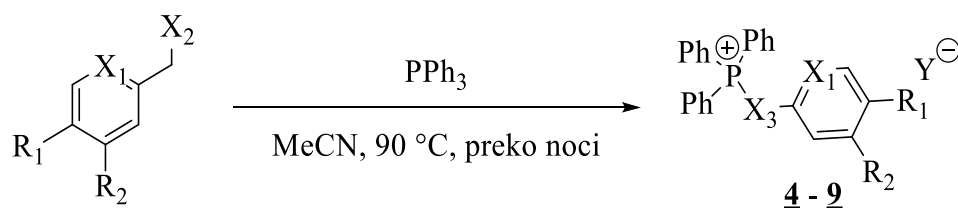


Slika 11: Reakcijska shema sinteze spojine **3**.

V bučko smo natehtali spojino **2** (8,42 g, 30,90 mmol, 1,0 ekv.), dodali predhodno pripravljen brezvodni THF (80 mL) in reakcijsko zmes ob mešanju ohladili na ledeni kopeli. Pod argonovo atmosfero smo postopoma dodajali LiAlH_4 (1,76 g, 46,40 mmol, 1,5 ekv.). Reakcijsko zmes smo pustili mešati 2 uri. Reakcijo smo ustavili z dodatkom NaHCO_3 (40 mL). Reakcijsko zmes smo ekstrahirali z EtOAc (3×100 mL) in nasičeno raztopino NaCl (70 mL). Združene organske faze smo sušili z Na_2SO_4 in z rotavapiranjem odstranili topilo. Dobljeni produkt smo takoj uporabili v naslednji stopnji.

IUPAC ime	<i>tert</i> -butil 4-formilpiperidin-1-karboksilat (3)
Izgled	Bledo rumena oljnata snov
Izkoristek	100,0 %
TLC	$R_f(\text{EtOAc/n-heksan} = 3/1, \text{V/V}) = 0,62$

4.4. SPLOŠNI POSTOPEK SINTEZE WITTIGOVEGA REAGENTA



Slika 12: Reakcijska shema sinteze spojini **4** – **9** (substituenti X_1 , X_2 , X_3 , R_1 , R_2 , Y so predstavljeni v preglednici I).

Ustrezni benzil ali fenetil ali piridin halid (1,0 ekv.) smo v bučki raztopili v MeCN in dodali trifenilfosfin (1,0 ekv.). Reakcijsko zmes smo pri temperaturi refluxa ($T_{REF} = 90\text{ }^{\circ}\text{C}$) mešali preko noči. Nato smo reakcijski zmesi dodali enake volumne CH_2Cl_2 in Et_2O , oborjeni produkt pa odnučali in posušili z vakuumsko črpalko.

Preglednica I: Substituenti v produktih pri sintezi Wittigovega reagenta.

Spojina	X ₁	X ₂	X ₃	R ₁	R ₂	Y
<u>4</u>	-CH	-CH ₂ Br	-CH ₂ CH ₂	-F	-H	Br
<u>5</u>	-CH	-Cl	-CH ₂	-F	-H	Cl
<u>6</u>	-N	-Br	-CH ₂	-H	-H	Br
<u>7</u>	-CH	-Br	-CH ₂	-CH ₃	-H	Br
<u>8</u>	-CH	-Br	-CH ₂	-H	-CF ₃	Br
<u>9</u>	-CH	-Br	-CH ₂	-Br	-H	Br

4.4.1. SINTEZA (4-fluorofenil)trifenilfosfonijevega bromida (4)

Sintezo spojine 4 smo izvedli iz 4-fluorofenil bromida (1,40 mL, 10,00 mmol, 1,0 ekv.), MeCN (10 mL) in trifenilfosfina (2,62 g, 10,00 mmol, 1,0 ekv.) po splošnem postopku sinteze Wittigovega reagenta.

Izkoristek	91,6 %
-------------------	--------

4.4.2. SINTEZA (4-fluorobenzil)trifenilfosfonijevega klorida (5)

Sintezo spojine 5 smo izvedli iz 4-fluorobenzil klorida (4,79 mL, 40,00 mmol, 1,0 ekv.), MeCN (40 mL) in trifenilfosfina (10,82 g, 40,00 mmol, 1,0 ekv.) po splošnem postopku sinteze Wittigovega reagenta.

Izkoristek	97,5 %
-------------------	--------

4.4.3. SINTEZA (piridin-2-ilmetil)trifenilfosfonijevega bromida (6)

Sintezo spojine **6** smo izvedli iz 2-(bromometil)piridinijevega hidrobromida (1,44 g, 5,70 mmol, 1,0 ekv.), MeCN (7 mL) in trifenilfosfina (1,50 g, 5,70 mmol, 1,0 ekv.) po splošnem postopku sinteze Wittigovega reagenta.

Izkoristek	37,8 %
-------------------	--------

4.4.4. SINTEZA (4-metilbenzil)trifenilfosfonijevega bromida (7)

Sintezo spojine **7** smo izvedli iz 4-metilbenzil bromida (2,81 g, 15,20 mmol, 1,0 ekv.), MeCN (15 mL) in trifenilfosfina (3,99 g, 15,20 mmol, 1,0 ekv.) po splošnem postopku sinteze Wittigovega reagenta.

Izkoristek	96,7 %
-------------------	--------

4.4.5. SINTEZA (3-(trifluorometil)benzil)trifenilfosfonijevega bromida (8)

Sintezo spojine **8** smo izvedli iz 3-trifluorometilbenzil bromida (3,59 g, 15,00 mmol, 1,0 ekv.), MeCN (15 mL) in trifenilfosfina (3,93 g, 15,00 mmol, 1,0 ekv.) po splošnem postopku sinteze Wittigovega reagenta.

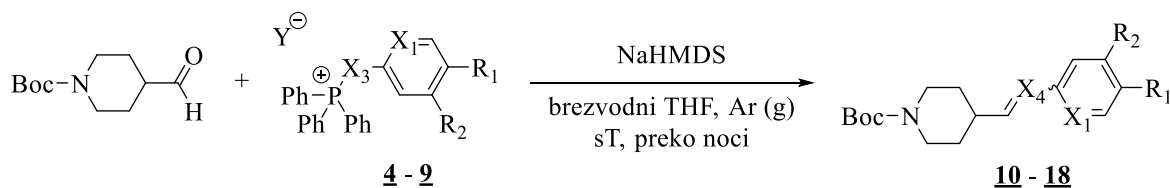
Izkoristek	82,0 %
-------------------	--------

4.4.6. SINTEZA (4-bromobenzil)trifenilfosfonijevega bromida (9)

Sintezo spojine **9** smo izvedli iz 4-bromobenzil bromida (2,50 g, 10,00 mmol, 1,0 ekv.), MeCN (10 mL) in trifenilfosfina (2,62 g, 10,00 mmol, 1,0 ekv.) po splošnem postopku sinteze Wittigovega reagenta.

Izkoristek	88,0 %
-------------------	--------

4.5. SPLOŠNI POSTOPEK SINTEZE Z WITTIGOVO REAKCIJO



Slika 13: Reakcijska shema sinteze spojin **10 – 18** (substituenti X₁, X₃, X₄, R₁, R₂, Y v reagentih in produktih so predstavljeni v preglednici II).

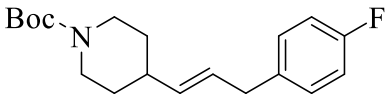
Ustrezni Wittigovi reagenti (1,2 ekv.) smo raztopili v brezvodnem THF. Celotno sintezo smo izvajali pod argonovo atmosfero. V raztopino smo po kapljicah dodajali NaHMDS (2 M raztopina v THF, 1,2 ekv.) in reakcijsko zmes pri sobni temperaturi mešali 1 uro. V reakcijsko zmes smo nato dodali spojino **3** (1,0 ekv.), predhodno raztopljeno v THF, in mešali preko noči. Reakcijo smo ustavili z dodatkom H₂O (50 mL) ter ekstrahirali z EtOAc (2 × 100 mL) in nasičeno raztopino NaCl (70 mL). Združene organske faze smo sušili z Na₂SO₄ in jim z rotavapiranjem odstranili topilo. Produkt smo očistili in ločili *cis* in *trans* izomera s kolonsko kromatografijo.

Preglednica II: Substituenti v reagentih in produktih Wittigove reakcije.

Spojina	X ₁	X ₃	X ₄	R ₁	R ₂	Y
4 10	-CH	-CH ₂ CH ₂	-CHCH ₂	-F	-H	Br
6 11	-N	-CH ₂	-CH	-H	-H	Br
7 12 in 13	-CH	-CH ₂	-CH	-CH ₃	-H	Br
14 in 15	-CH	-CH ₂	-CH	-CF ₃	-H	Cl
8 16 in 17	-CH	-CH ₂	-CH	-H	-CF ₃	Br
9 18	-CH	-CH ₂	-CH	Br	-H	Br

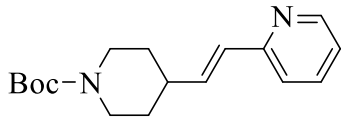
4.5.1. SINTEZA *tert*-butil (*E*)-4-(3-(4-fluorofenil)prop-1-en-1-il)piperidin-1-karboksilata (**10**)

Sintezo spojine **10** smo izvedli iz spojine **4** (1,31 g, 2,81 mmol, 1,2 ekv.), THF (20 mL), NaHMDS (2 M raztopina v THF, 1,40 mL, 2,80 mmol, 1,2 ekv.) in spojine **3** (0,50 g, 2,34 mmol, 1,0 ekv.) po splošnem postopku sinteze z Wittigovo reakcijo. Za izvedbo kolonske kromatografije smo uporabili mobilno fazo petroleter/Et₂O = 10/1, V/V.

IUPAC ime	<i>tert</i> -butil (<i>E</i>)-4-(3-(4-fluorofenil)prop-1-en-1-il)piperidin-1-karboksilat (10)	
Izgled	Brezbarvna oljnata snov	
Izkoristek	46,6 %	
TLC	R_f (petroleter/Et ₂ O = 10/1, V/V) = 0,18	
¹H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,29 (dt, $J_1 = 12,3$, $J_2 = 4,1$ Hz, 1H), 1,32 (dt, $J_1 = 12,3$, $J_2 = 4,2$ Hz, 1H), 1,44 (s, 9H), 1,55–1,62 (m, 2H), 2,44–2,54 (m, 1H), 2,73 (t, $J = 11,7$ Hz, 2H), 3,35 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H), 4,07 (rs, 2H), 5,31 (tdd, $J_1 = 10,8$, $J_2 = 9,3$, $J_3 = 1,5$ Hz, 1H), 5,45 (dtd, $J_1 = 10,8$, $J_2 = 7,4$, $J_3 = 0,9$ Hz, 1H), 6,89–6,95 (m, 2H), 7,06–7,11 (m, 2H)	

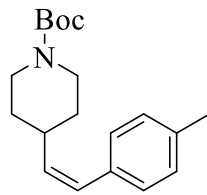
4.5.2. SINTEZA *tert*-butil (*E*)-4-(2-(piridin-2-il)vinil)piperidin-1-karboksilata (**11**)

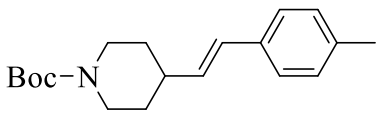
Sintezo spojine **11** smo izvedli iz spojine **6** (0,94 g, 2,16 mmol, 1,0 ekv.), THF (20 mL), KHMDS (0,5 M raztopina v toluenu; 4,76 mL, 2,38 mmol, 1,1 ekv.) in spojine **3** (0,46 g, 2,16 mmol, 1,0 ekv.) po splošnem postopku sinteze z Wittigovo reakcijo. Za izvedbo kolonske kromatografije smo uporabili mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 1/2, V/V.

IUPAC ime	<i>tert</i> -butil (<i>E</i>)-4-(2-(piridin-2-il)vinil)piperidin-1-karboksilat (11)	
Izgled	Rjava oljnata snov	
Izkoristek	24,9 %	
TLC	R_f (EtOAc/n-heksan) = 1/2, V/V) = 0,19	
¹H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,36 (dt, $J_1 = 12,3$, $J_2 = 4,1$ Hz, 1H), 1,40–1,44 (m, 1H), 1,44 (s, 9H), 1,73–1,80 (m, 2H), 2,27–2,36 (m, 1H), 2,76 (t, $J = 11,5$ Hz, 2H), 4,10 (rs, 2H), 6,45 (dd, $J_1 = 15,8$, $J_2 = 1,2$ Hz, 1H), 6,66 (dd, $J_1 = 15,8$, $J_2 = 6,8$ Hz, 1H), 7,08 (ddd, $J_1 = 7,5$, $J_2 = 4,8$, $J_3 = 1,1$ Hz, 1H), 7,21 (td, $J_1 = 7,9$, $J_2 = 0,9$ Hz, 1H), 7,58 (dt, $J_1 = 7,7$, $J_2 = 1,8$ Hz, 1H), 8,50 (ddd, $J_1 = 4,8$, $J_2 = 1,7$, $J_3 = 0,8$ Hz, 1H)	
MS (ESI+)	m/z izrač. za C ₁₇ H ₂₄ N ₂ O ₂ Na [M+Na] ⁺ 311,17; najden 311,55	

4.5.3. SINTEZA *tert*-butil (*E/Z*)-4-(4-metilstiril)piperidin-1-karboksilata (**12** in **13**)

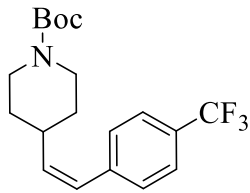
Sintezo spojin **12** in **13** smo izvedli iz spojine **7** (3,13 g, 7,00 mmol, 1,0 ekv.), THF (40 mL), KHMDS (0,5 M v toluenu, 15,40 mL, 7,70 mmol, 1,1 ekv.) in spojine **3** (1,49 g, 7,00 mmol, 1,0 ekv.) po splošnem postopku sinteze z Wittigovo reakcijo. Za izvedbo kolonske kromatografije smo uporabili mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 1/5, V/V. Celokupni izkoristek reakcije (*cis* in *trans* izomer) je znašal 44,5 %.

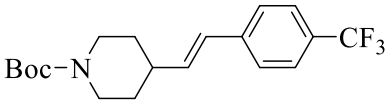
IUPAC ime	<i>tert</i> -butil (<i>Z</i>)-4-(4-metilstiril)piperidin-1-karboksilat (12)	
Izgled	Brezbarvna oljnata snov	
Delež	16,9 %	
TLC	R_f (EtOAc/n-heksan) = 1/5, V/V) = 0,75	
¹H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,29–1,41 (m, 2H), 1,46 (s, 9H), 1,64–1,70 (m, 2H), 2,35 (s, 3H), 2,66–2,77 (m, 3H), 4,08 (rs, 2H), 5,41 (dd, $J_1 = 11,6$, $J_2 = 10,0$ Hz, 1H), 6,36 (d, $J = 11,5$ Hz, 1H), 7,12–7,17 (m, 4H)	
MS (ESI+)	m/z izrač. za C ₁₉ H ₂₇ NO ₂ Na [M+Na] ⁺ 324,19; najden 324,63	

IUPAC ime	<i>tert</i> -butil (<i>E</i>)-4-(4-metilstiril)piperidin-1-karboksilat (13)	
Izgle	Brezbarvna oljnata snov	
Delež	83,1 %	
TLC	R_f (EtOAc/n-heksan) = 1/5, V/V) = 0,72	
¹H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,36 (dt, $J_1 = 12,2$, $J_2 = 4,2$ Hz, 1H), 1,39 (dt, $J_1 = 12,4$, $J_2 = 4,3$ Hz, 1H), 1,47 (s, 9H), 1,71–1,78 (m, 2H), 2,22–2,31 (m, 1H), 2,32 (s, 3H), 2,77 (t, $J = 12,6$ Hz, 2H), 4,12 (rs, 2H), 6,09 (dd, $J_1 = 16,0$, $J_2 = 6,9$ Hz, 1H), 6,35 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H), 7,09–7,12 (m, 2H), 7,22–7,25 (m, 2H)	
MS (ESI+)	m/z izrač. za C ₁₉ H ₂₈ NO ₂ [M+H] ⁺ 302,21; najden 302,60	

4.5.4. SINTEZA *tert*-butil (*E/Z*)-4-(4-(trifluorometil)stiril)piperidin-1-karboksilata (**14** in **15**)

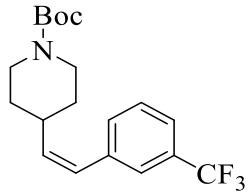
Sintezo spojin **14** in **15** smo izvedli iz (4-(trifluorometil)benzil)trifenilfosfonijevega klorida (1,28 g, 2,81 mmol, 1,2 ekv.), THF (20 mL), NaHMDS (2 M raztopina v THF, 1,40 mL, 2,80 mmol, 1,2 ekv.) in spojine **3** (0,50 g, 2,34 mmol, 1,0 ekv.) po splošnem postopku sinteze z Wittigovo reakcijo. Za izvedbo kolonske kromatografije smo uporabili mobilno fazo petroleter/Et₂O = 10/1, V/V. Celokupni izkoristek reakcije (*cis* in *trans* izomer) znaša 47,4 %.

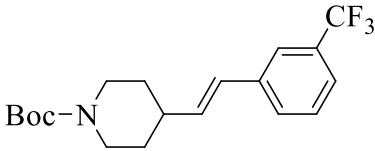
IUPAC ime	<i>tert</i> -butil (<i>Z</i>)-4-(4-(trifluorometil)stiril)piperidin-1-karboksilat (14)	
Izgle	Brezbarvna oljnata snov	
Delež	27,5 %	
TLC	R_f (EtOAc/n-heksan) = 1/2, V/V) = 0,62	
¹H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,32–1,42 (m, 2H), 1,45 (s, 9H), 1,62–1,67 (m, 2H), 2,59–2,68 (m, 1H), 2,71 (t, $J = 12,8$ Hz, 2H), 4,09 (rs, 2H), 5,56 (dd, $J_1 = 11,7$, $J_2 = 10,2$ Hz, 1H), 6,36 (d, $J = 11,7$ Hz, 1H), 7,32 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 7,58 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H)	

IUPAC ime	<i>tert</i> -butil (<i>E</i>)-4-(4-(trifluorometil)stiril)piperidin-1-karboksilat (15)	
Izgled	Beli kristali	
Tališče	T _{TAL} = 46–48 °C	
Izkoristek	72,5 %	
TLC	R _f (EtOAc/n-heksan) = 1/2, V/V) = 0,55	
¹H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,35 (dd, $J_1 = 12,2$, $J_2 = 4,1$ Hz, 1H), 1,39 (dd, $J_1 = 12,5$, $J_2 = 4,1$ Hz, 1H), 1,46 (s, 9H), 1,71–1,77 (m, 2H), 2,24–2,33 (m, 1H), 2,76 (t, $J = 11,4$ Hz, 2H), 4,14 (rs, 2H), 6,22 (dd, $J_1 = 16,0$, $J_2 = 6,8$ Hz, 1H), 6,38 (d, $J = 16,1$ Hz, 1H), 7,40 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,51 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H)	

4.5.5. SINTEZA *tert*-butil (*E/Z*)-4-(3-(trifluorometil)stiril)piperidin-1-karboksilata (**16** in **17**)

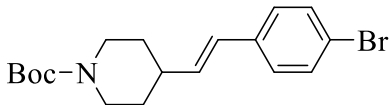
Sintezo spojin **16** in **17** smo izvedli iz spojine **8** (3,51 g, 7,00 mmol, 1,0 ekv.), THF (40 mL), KHMDS (0,5 M v toluenu, 15,40 mL, 7,70 mmol, 1,0 ekv.) in spojine **3** (1,49 g, 7,00 mmol, 1,0 ekv.) po splošnem postopku sinteze z Wittigovo reakcijo. Za izvedbo kolonske kromatografije, s katero smo očistili in delno ločili izomera, smo uporabili mobilno fazo petroleter/Et₂O = 8/1, V/V. Celokupni izkoristek reakcije (*cis* in *trans* izomer) znaša 61,6 %.

IUPAC ime	<i>tert</i> -butil (<i>Z</i>)-4-(3-(trifluorometil)stiril)piperidin-1-karboksilat (16)	
Izgled	Brezbarvna oljnata snov	
Delež	27,2 %	
TLC	R _f (petroleter/Et ₂ O) = 8/1, V/V) = 0,20	
¹H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,35 (dt, $J_1 = 12,6$, $J_2 = 4,0$ Hz, 1H), 1,36–1,43 (m, 1H), 1,45 (s, 9H), 1,61–1,68 (m, 2H), 2,56–2,66 (m, 1H), 2,71 (t, $J = 11,2$ Hz, 2H), 4,08 (rs, 2H), 5,55 (dd, $J_1 = 11,6$, $J_2 = 10,2$ Hz, 1H), 6,40 (d, $J = 11,6$ Hz, 1H), 7,38–7,50 (m, 4H)	
MS (ESI+)	<i>m/z</i> izrač. za C ₁₉ H ₂₄ F ₃ NO ₂ Na ⁺ [M+Na] ⁺ 378,17; najden 378,76	

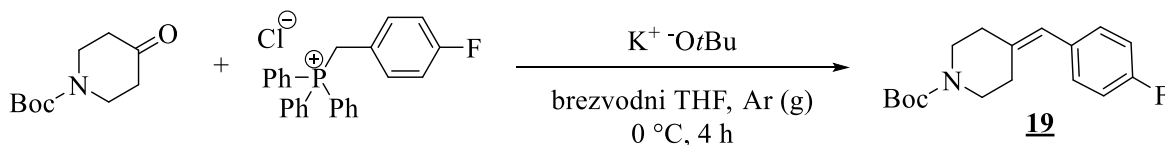
IUPAC ime	<i>tert</i> -butil (<i>E</i>)-4-(3-(trifluorometil)stiril)piperidin-1-karboksilat (17)	
Izgled	Brezbarvna oljnata snov	
Delež	72,8 %	
TLC	R_f (petroleter/Et ₂ O) = 8/1, V/V) = 0,15	
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,37 (dt, $J_1 = 12,4$, $J_2 = 4,3$ Hz, 1H), 1,40 (dt, $J_1 = 12,2$, $J_2 = 4,1$ Hz, 1H), 1,47 (s, 9H), 1,73–1,80 (m, 2H), 2,26–2,36 (m, 1H), 2,78 (t, $J = 12,0$ Hz, 2H), 4,14 (rs, 2H), 6,22 (dd, $J_1 = 16,0$, $J_2 = 6,9$ Hz, 1H), 6,41 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H), 7,38–7,46 (m, 2H), 7,48–7,51 (m, 1H), 7,57–7,59 (m, 1H)	
MS (ESI+)	m/z izrač. za C ₁₉ H ₂₄ F ₃ NO ₂ Na [M+Na] ⁺ 378,17; najden 378,69	

4.5.6. SINTEZA *tert*-butil (*E*)-4-(4-bromostiril)piperidin-1-karboksilata (**18**)

Sintezo spojine **18** smo izvedli iz spojine **9** (5,28 g, 10,31 mmol, 1,1. ekv.), THF (50 mL), NaHMDS (2 M raztopina v THF, 5,63 mL, 11,26 mmol, 1,2 ekv.) in spojine **3** (2,00 g, 9,38 mmol, 1,0 ekv.) po splošnem postopku sinteze z Wittigovo reakcijo. Za izvedbo kolonske kromatografije smo uporabili mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 1/2, V/V. Celokupni izkoristek reakcije (*cis* in *trans* izomer) je znašal 48,2 %. Izolirali smo samo *trans* izomer.

IUPAC ime	<i>tert</i> -butil (<i>E</i>)-4-(4-bromostiril)piperidin-1-karboksilat (18)	
Izgled	Bela amorfna snov	
Tališče	T _{TAL} = 65–67 °C	
Delež	80,4 %	
TLC	R_f (EtOAc/n-heksan) = 1/2, V/V) = 0,40	
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,36 (dt, $J_1 = 12,4$, $J_2 = 4,2$ Hz, 1H), 1,39 (dt, $J_1 = 12,4$, $J_2 = 4,5$ Hz, 1H), 1,47 (s, 9H), 1,71–1,78 (m, 2H), 2,22–2,32 (m, 1H), 2,74–2,81 (m, 2H), 4,12 (rs, 2H), 6,13 (dd, $J_1 = 16,0$, $J_2 = 6,8$ Hz, 1H), 6,32 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H), 7,19–7,22 (m, 2H), 7,39–7,43 (m, 2H)	

4.5.7. SINTEZA *tert*-butil 4-(4-fluorobenziliden)piperidin-1-karboksilata (**19**)

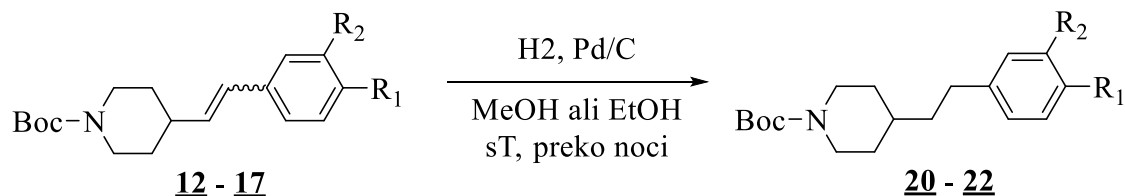


Slika 14: Reakcijska shema sinteze spojine **19**.

Sintezo spojine **19** smo izvedli iz spojine **5** (2,04 g, 5,02 mmol, 1,0 ekv.), THF (40 mL), KOtBu (0,62 g, 5,52 mmol, 1,1 ekv.) in *tert*-butil 4-oksopiperidin-1-karboksilata (1,00 g, 5,02 mmol, 1,0 ekv.) po splošnem postopku sinteze z Wittigovo reakcijo. Za izvedbo kolonske kromatografije smo uporabili mobilno fazo petroleter/Et₂O = 10/1, V/V.

IUPAC ime	<i>tert</i> -butil 4-(4-fluorobenziliden)piperidin-1-karboksilat (19)	
Izgled	Bela amorfna snov	
Tališče	50–52 °C	
Izkoristek	39,0 %	
TLC	R_f (petroleter/Et ₂ O) = 10/1, V/V) = 0,12	
¹H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,47 (s, 9H), 2,32 (t, J = 5,6 Hz, 2H), 2,41 (t, J = 5,6 Hz, 2H), 3,40 (t, J = 5,8 Hz, 2H), 3,50 (t, J = 5,6 Hz, 2H), 6,31 (s, 1H), 6,97–7,03 (m, 2H), 7,12–7,17 (m, 2H)	

4.6. SPLOŠNI POSTOPEK REDUKCIJE DVOJNE VEZI S KATALITSKIM HIDROGENIRANJEM



Slika 15: Reakcijska shema sinteze spojin 20 – 22 (substituenti R₁ in R₂ so predstavljeni v preglednici III).

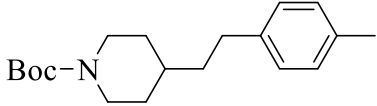
Preglednica III: Substituenti v izhodnih in končnih spojinah reakcije, udeleženi v redukciji dvojne vezi s katalitskim hidrogeniranjem.

Spojina	R ₁	R ₂
<u>12</u> – <u>13</u> <u>20</u>	-CH ₃	-H
<u>14</u> – <u>15</u> <u>21</u>	-CF ₃	-H
<u>16</u> – <u>17</u> <u>22</u>	-H	-CF ₃

V bučko smo zatehtali ustrezen produkt Wittigove reakcije (zmes *cis* in *trans* izomera, 1,0 ekv.) in ga raztopili v MeOH ali EtOH. Raztopino v bučki smo prepihali z argonom. Dodali smo katalitično količino Pd/C (približno 10 % m/m glede na izhodno spojino), vsebino bučke pa ponovno prepihali z argonom. Argonovo atmosfero smo previdno zamenjali z vodikovo, v kateri je reakcija potekala preko noči. Po končani reakciji smo bučko ponovno prepihali z argonom. Katalizator smo odstranili s filtracijo z odsesavanjem. Preostanek topila v bučki smo odstranili z rotavapiranjem.

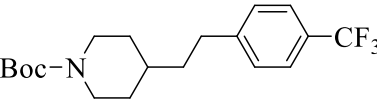
4.6.1. SINTEZA *tert*-butil 4-(4-metilfenetil)piperidin-1-karboksilata (**20**)

Sintezo spojine **20** smo izvedli iz zmesi spojin **12** in **13** (0,28 g, 0,93 mmol, 1,0 ekv.) in EtOH (10 mL) po splošnem postopku redukcije dvojne vezi s katalitskim hidrogeniranjem. Dobljeni produkt smo uporabili v naslednji stopnji brez predhodnega čiščenja.

IUPAC ime	<i>tert</i> -butil 4-(4-metilfenetil)piperidin-1-karboksilat (20)	
Izgled	Rumena oljnata snov	
Izkoristek	kvantitativen	
TLC	R_f (EtOAc/n-heksan) = 1/2, V/V) = 0,63	
¹H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,11 (dt, $J_1 = 12,3$, $J_2 = 4,1$ Hz, 1H), 1,14 (dt, $J_1 = 12,4$, $J_2 = 4,1$ Hz, 1H), 1,36–1,44 (m, 1H), 1,45 (s, 9H), 1,51–1,57 (m, 2H), 1,65–1,73 (m, 2H), 2,32 (s, 3H), 2,56–2,61 (m, 2H), 2,63–2,70 (m, 2H), 4,07 (rs, 2H), 7,04–7,10 (m, 4H)	
MS (ESI+)	m/z izrač. za C ₁₉ H ₂₉ NO ₂ Na [M+Na] ⁺ 326,21; najden 326,73	

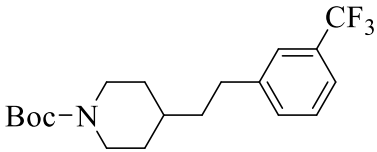
4.6.2. SINTEZA *tert*-butil 4-(4-(trifluorometil)fenetil)piperidin-1-karboksilata (**21**)

Sintezo spojine **21** smo izvedli iz zmesi spojin **14** in **15** (0,24 g, 0,68 mmol, 1,0 ekv.) in MeOH (10 mL) po splošnem postopku redukcije dvojne vezi s katalitskim hidrogeniranjem. Dobljeni produkt smo uporabili v naslednji stopnji brez predhodnega čiščenja.

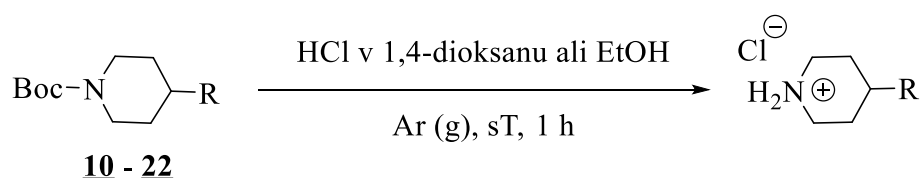
IUPAC ime	<i>tert</i> -butil 4-(4-(trifluorometil)fenetil)piperidin-1-karboksilat (21)	
Izgled	Rumena oljnata snov	
Izkoristek	Kvantitativen	
TLC	R_f (EtOAc/n-heksan) = 1/2, V/V) = 0,56	
¹H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,12 (dt, $J_1 = 12,4$, $J_2 = 4,2$ Hz, 1H), 1,15 (dt, $J_1 = 12,3$, $J_2 = 4,3$ Hz, 1H), 1,36–1,44 (m, 1H), 1,45 (s, 9H), 1,53–1,61 (m, 2H), 1,65–1,73 (m, 2H), 2,60–2,70 (m, 4H), 4,08 (rs, 2H), 7,25–7,28 (m, 2H), 7,50–7,53 (m, 2H)	

4.6.3. SINTEZA *tert*-butil 4-(3-(trifluorometil)fenetil)piperidin-1-karboksilata (**22**)

Sintezo spojine **22** smo izvedli iz zmesi spojin **16** in **17** (0,27 g, 0,76 mmol, 1,0 ekv.) in EtOH (10 mL) po splošnem postopku redukcije dvojne vezi s katalitskim hidrogeniranjem. Dobljeni produkt smo uporabili v naslednji stopnji brez predhodnega čiščenja.

IUPAC ime	<i>tert</i> -butil 4-(3-(trifluorometil)fenetil)piperidin-1-karboksilat (22)	
Izgled	Brezbarvna oljnata snov	
Izkoristek	Kvantitativen	
TLC	R_f (EtOAc/n-heksan) = 1/2, V/V) = 0,58	
¹H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,13 (dt, $J_1 = 12,2$, $J_2 = 4,2$ Hz, 1H), 1,16 (dt, $J_1 = 12,4$, $J_2 = 4,2$ Hz, 1H), 1,37–1,45 (m, 1H), 1,46 (s, 9H), 1,55–1,61 (m, 2H), 1,67–1,74 (m, 2H), 2,63–2,72 (m, 4H), 4,09 (rs, 2H), 7,34–7,45 (m, 4H)	
MS (ESI+)	m/z izrač. za C ₁₉ H ₂₆ F ₃ NO ₂ Na [M+Na] ⁺ 380,18; najden 380,77	

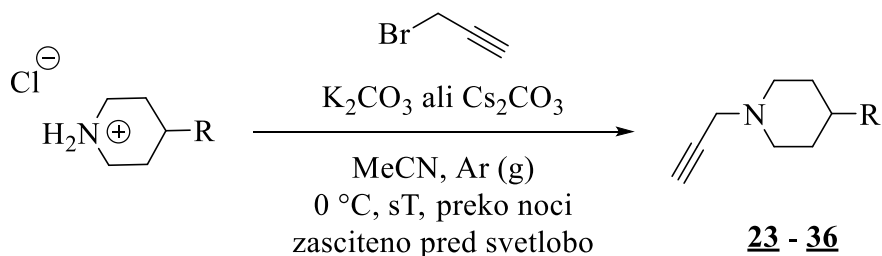
4.7. SPLOŠNI POSTOPEK ODSTRANITVE BOC ZAŠČITE



Slika 16: Reakcijska shema odstranitve Boc zaščite (substituenti R v izhodnih spojinah **10** – **22** so predstavljeni v preglednici IV).

V bučki smo ustrezni z Boc zaščiteni izhodni spojini (1,0 ekv.) dodali koncentrirano HCl v 1,4-dioksanu ali EtOH. Reakcijsko zmes smo v argonovi atmosferi mešali 1 uro pri sobni temperaturi. Nato smo dodali 40 μ L koncentrirane HCl in reakcijsko zmes mešali še nadaljnjih 10 min. Nastalemu produktu smo z rotavapiranjem do suhega odstranili topila in ga takoj uporabili v naslednji stopnji. Predpostavili smo 100 % izkoristek.

4.8. SPLOŠNI POSTOPEK ALKILACIJE PIPERIDINSKEGA DUŠIKA



Slika 17: Reakcijska shema sinteze končnih spojin **23** – **36** (substituenti R so predstavljeni v preglednici IV).

V bučki smo ustreznemu odščitnemu intermediatu (1,0 ekv.) v argonovi atmosferi dodali MeCN in K_2CO_3 (3,0 ekv.) ali Cs_2CO_3 (3,0 ekv.) ter reakcijsko zmes mešali na ledeni kopeli. Po dodatku propargil bromida (80 % raztopina v toluenu, 1,3 ekv.) smo bučko odstavili z ledene kopeli in jo zaščitili pred svetlobo. Reakcijsko zmes smo v argonovi atmosferi mešali preko noči. Reakcijski zmesi smo dodali EtOAc (80 mL) in produkt ekstrahirali s prečiščeno vodo (2×40 mL) in nasičeno raztopino NaCl (40 mL). Organsko fazo smo sušili z Na_2SO_4 , sušilno sredstvo smo odfiltrirali in z rotavapiranjem odstranili topilo. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo.

Preglednica IV: Substituenti v izhodnih in končnih spojinah reakcij odstranitve Boc zaščite in alkilacije piperidinskega dušika.

Spojina	R	Spojina	R
<u>10</u> <u>23</u>		<u>19</u> <u>24</u>	
<u>25</u>		<u>11</u> <u>26</u>	
<u>12</u> <u>27</u>		<u>13</u> <u>28</u>	
<u>20</u> <u>29</u>		<u>14</u> <u>30</u>	
<u>15</u> <u>31</u>		<u>21</u> <u>32</u>	
<u>16</u> <u>33</u>		<u>17</u> <u>34</u>	
<u>22</u> <u>35</u>		<u>18</u> <u>36</u>	

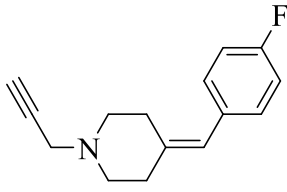
4.8.1. SINTEZA (*E*)-4-(3-(4-fluorofenil)prop-1-en-1-il)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (23)

Sintezo spojine **23** smo izvedli iz spojine **10** (0,22 g, 0,69 mmol, 1,0 ekv.), HCl (4 M v 1,4-dioksanu, 4 mL), MeCN (10 mL), K₂CO₃ (0,29 g, 2,07 mmol, 3,0 ekv.) in propargil bromida (80 % raztopina v toluenu, 0,10 mL, 0,90 mmol, 1,3 ekv.) po splošnih postopkih odstranitve Boc zaščite in sledeče alkilacije piperidinskega dušika. Za izvedbo kolonske kromatografije smo uporabili mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 1/2, V/V.

IUPAC ime	<i>(E)</i> -4-(3-(4-fluorofenil)prop-1-en-1-il)-1-(prop-2-in-1-il)piperidin (23)	
Izgled	Rumena oljnata snov	
Izkoristek	38,0 %	
TLC	R_f (EtOAc/n-heksan) = 1/2, V/V) = 0,21	
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,45–1,55 (m, 2H), 1,61–1,70 (m, 2H), 2,22–2,30 (m, 3H), 2,32–2,42 (m, 1H), 2,86–2,91 (m, 2H), 3,31 (d, J = 2,4 Hz, 2H), 3,38 (rd, J = 7,3 Hz, 2H), 5,34–5,40 (m, 1H), 5,44–5,51 (m, 1H), 6,94–7,00 (m, 2H), 7,09–7,15 (m, 2H)	
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 32,28; 32,80; 33,82; 47,28; 52,09; 72,97; 79,02; 115,11 (d, $J_{C,F}$ = 21,1 Hz); 127,05; 129,54 (d, $J_{C,F}$ = 7,3 Hz); 135,54; 136,47 (d, $J_{C,F}$ = 2,9 Hz); 161,27 (d, $J_{C,F}$ = 243,6 Hz)	
HRMS (ESI+)	m/z izrač. za C ₁₇ H ₂₁ FN [M+H] ⁺ 258,1658; najden 258,1652	
IR (ATR)	3303, 3005, 2931, 2803, 2755, 1601, 1508, 1444, 1427, 1335, 1311, 1220, 1157, 1136, 1108, 997, 962, 849, 820, 784, 715, 675, 627, 504 cm ⁻¹	
HPLC	t_R = 9,62 min, 95,2 % čistost pri 220 nm (metoda A)	

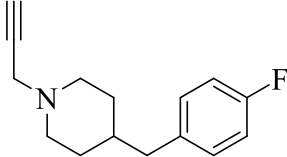
4.8.2. SINTEZA 4-(4-fluorobenziliden)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (**24**)

Sintezo spojine **24** smo izvedli iz spojine **19** (0,38 g, 1,30 mmol, 1,0 ekv.), HCl (4 M v 1,4-dioksanu, 10 mL), MeCN (15 mL), K₂CO₃ (0,54 g, 3,90 mmol, 3,0 ekv.) in propargil bromida (80 % raztopina v toluenu, 0,19 mL, 1,69 mmol, 1,3 ekv.) po splošnih postopkih odstranitve Boc zaščite in sledeče alkilacije piperidinskega dušika. Za izvedbo kolonske kromatografije smo uporabili mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 1/2, V/V.

IUPAC ime	4-(4-fluorobenziliden)-1-(prop-2-in-1-il)piperidin (24)	
Izgled	Rumeno-oranžna oljnata snov	
Izkoristek	27,2 %	
TLC	R_f (EtOAc/n-heksan) = 1/2, V/V) = 0,21	
¹H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 2,23 (t, J = 2,4 Hz, 1H), 2,40–2,43 (m, 2H), 2,49–2,56 (m, 4H), 2,63–2,66 (m, 2H), 3,33 (d, J = 2,4 Hz, 2H), 6,25 (s, 1H), 6,96–7,02 (m, 2H), 7,13–7,16 (m, 2H)	
¹³C NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 28,83; 36,17; 46,93; 53,07; 53,80; 73,05; 78,86; 114,91 (d, $J_{C,F}$ = 21,2 Hz); 122,51; 130,37 (d, $J_{C,F}$ = 7,4 Hz), 133,56; 138,62; 161,23 (d, $J_{C,F}$ = 245,2 Hz)	
HRMS (ESI+)	m/z izrač. za C ₁₅ H ₁₇ FN [M+H] ⁺ 230,1345; najden 230,1343	
IR (ATR)	3301, 2938, 2902, 2806, 1601, 1506, 1466, 1426, 1333, 1220, 1157, 1123, 992, 867, 830, 801, 770, 637, 558, 521 cm ⁻¹	
HPLC	t_R = 8,53 min, 99,4 % čistost pri 220 nm (metoda A)	

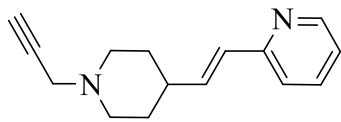
4.8.3. SINTEZA 4-(4-fluorobenzil)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (**25**)

Sintezo spojine **25** smo izvedli iz 4-(4-fluorobenzil)piperidinijevega klorida (0,23 g, 1,00 mmol, 1,0 ekv.), MeCN (15 mL), K₂CO₃ (0,41 g, 2,97 mmol, 3,0 ekv.) in propargil bromida (80 % raztopina v toluenu, 0,14 mL, 1,26 mmol, 1,3 ekv.) po splošnem postopku alkilacije piperidinskega dušika. Za izvedbo kolonske kromatografije smo uporabili mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 1/1, V/V.

IUPAC ime	4-(4-fluorobenzil)-1-(prop-2-in-1-il)piperidin (25)	
Izgled	Rjava oljnata snov	
Izkoristek	4,3 %	
TLC	R_f (EtOAc/n-heksan) = 1/1, V/V) = 0,10	
¹H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,28 (dt, $J_1 = 11,8$, $J_2 = 3,8$ Hz, 1H), 1,31 (dt, $J_1 = 12,3$, $J_2 = 3,8$ Hz, 1H), 1,41–1,52 (m, 1H), 1,61–1,65 (m, 2H), 2,13 (dt, $J_1 = 11,6$, $J_2 = 2,6$ Hz, 2H), 2,20 (t, $J = 2,4$ Hz, 1H), 2,49 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H), 2,82–2,87 (m, 2H), 3,26 (d, $J = 2,5$ Hz, 2H), 6,91–6,96 (m, 2H), 7,04–7,09 (m, 2H)	
¹³C NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 31,90; 37,36; 42,14; 47,07; 52,37; 72,82; 79,04; 114,80 (d, $J_{C,F} = 21,2$ 20,5 Hz); 130,27 (d, $J_{C,F} = 8,1$ Hz); 136,05 (d, $J_{C,F} = 3,6$ Hz); 161,18 (d, $J_{C,F} = 243,6$ Hz)	
HRMS (ESI+)	m/z izrač. za C ₁₅ H ₁₉ NF [M+H] ⁺ 232,1502; najden 232,1506	
IR (ATR)	3303, 2917, 2848, 2801, 2754, 1600, 1509, 1448, 1312, 1219, 1157, 1123, 1105, 1067, 1016, 975, 938, 808, 761, 677, 628, 565 cm ⁻¹	
HPLC	$t_R = 8,55$ min, 97,5 % čistost pri 220 nm (metoda A)	

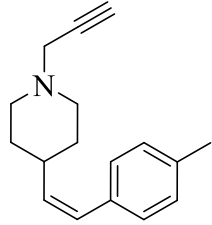
4.8.4. SINTEZA (*E*)-2-(2-(1-(prop-2-in-il)piperidin-4-il)vinil)piridina (**26**)

Sintezo spojine **26** smo izvedli iz spojine **11** (0,030 g, 0,10 mmol, 1,0 ekv.), HCl (5 mL), MeCN (5 mL), K₂CO₃ (0,041 g, 0,30 mmol, 3,0 ekv.), Cs₂CO₃ (0,065 g, 0,20 mmol, 2,0 ekv.) in propargil bromida (80 % raztopina v toluenu, 0,014 mL, 0,13 mmol, 1,3 ekv.) po splošnih postopkih odstranitve Boc zaščite in sledeče alkilacije piperidinskega dušika. Za izvedbo kolonske kromatografije smo uporabili mobilno fazo EtOAc/n-heksan) = 10/1, V/V.

IUPAC ime	<i>(E)</i> -2-(2-(1-(prop-2-in-il)piperidin-4-il)vinil)piridin (26)	
Izgled	Rjava oljnata snov	
Izkoristek	48,6 %	
TLC	<i>R_f</i> (EtOAc/n-heksan) = 10/1, V/V) = 0,06	
¹H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,56–1,66 (m, 2H), 1,80–1,88 (m, 2H), 2,15–2,24 (m, 1H), 2,25 (t, <i>J</i> = 2,4 Hz, 1H), 2,29 (dt, <i>J</i> ₁ = 11,8, <i>J</i> ₂ = 2,6 Hz, 2H), 2,92–2,96 (m, 2H), 3,33 (d, <i>J</i> = 2,4 Hz, 2H), 6,48 (dd, <i>J</i> ₁ = 15,8, <i>J</i> ₂ = 1,2 Hz, 1H), 6,70 (dd, <i>J</i> ₁ = 15,8, <i>J</i> ₂ = 7,0 Hz, 1H), 7,10 (ddd, <i>J</i> ₁ = 7,5, <i>J</i> ₂ = 4,8, <i>J</i> ₃ = 1,1 Hz, 1H), 7,25 (td, <i>J</i> ₁ = 7,9, <i>J</i> ₂ = 1,0 Hz, 1H), 7,60 (dt, <i>J</i> ₁ = 7,7, <i>J</i> ₂ = 1,8 Hz, 1H), 8,53 (ddd, <i>J</i> ₁ = 4,8, <i>J</i> ₂ = 1,8, <i>J</i> ₃ = 0,9 Hz, 1H)	
¹³C NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 31,69; 38,69; 47,24; 52,22; 73,02; 79,01; 121,27; 121,72; 128,33; 136,45; 139,45; 149,42; 155,90	
HRMS (ESI+)	<i>m/z</i> izrač. za C ₁₅ H ₁₉ N ₂ [M+H] ⁺ 227,1548; najden 227,1543	
IR (ATR)	3294, 2926, 2814, 1652, 1613, 1588, 1564, 1470, 1432, 1336, 1311, 1110, 974, 764, 624, 517 cm ⁻¹	
HPLC	<i>t_R</i> = 2,37 min, 95,4 % čistost pri 220 nm (metoda B)	

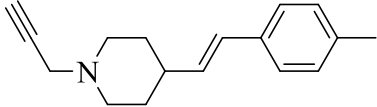
4.8.5. SINTEZA (Z)-4-(-metilstiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (**27**)

Sintezo spojine **27** smo izvedli iz spojine **12** (0,067 g, 0,23 mmol, 1,0 ekv.), HCl (4 M v 1,4-dioksanu, 4 mL), MeCN (10 mL), K₂CO₃ (0,10 g, 0,72 mmol, 3,1 ekv.) in propargil bromida (80 % raztopina v toluenu, 0,033 mL, 0,30 mmol, 1,3 ekv.) po splošnih postopkih odstranitve Boc zaščite in sledeče alkilacije piperidinskega dušika. Za izvedbo kolonske kromatografije smo uporabili mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 1/2, V/V.

IUPAC ime	(Z)-4-(-metilstiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidin (27)	
Izgled	Rumena amorfna snov	
Tališče	T _{TAL} = 85–86 °C	
Izkoristek	49,0 %	
TLC	R _f (EtOAc/n-heksan) = 1/2, V/V) = 0,21	
¹H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,49–1,57 (m, 2H), 1,72–1,76 (m, 2H), 2,20–2,26 (m, 3H), 2,35 (s, 3H), 2,52–2,62 (m, 1H), 2,86–2,91 (m, 2H), 3,30 (d, J = 2,4 Hz, 2H), 5,45 (dd, J ₁ = 11,6, J ₂ = 10,0 Hz, 1H), 6,35 (d, J = 11,6 Hz, 1H), 7,15 (s, 4H)	
¹³C NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 21,16; 32,36; 34,45; 47,29; 51,96; 53,42; 72,94; 127,94; 128,43; 128,94; 134,74; 136,33; 136,62	
HRMS (ESI+)	m/z izrač. za C ₁₇ H ₂₂ N [M+H] ⁺ 240,1752; najden 240,1756	
IR (ATR)	3210, 2934, 2858, 2798, 2756, 1466, 1450, 1632, 1335, 1272, 1143, 1109, 1067, 972, 946, 836, 824, 810, 785, 738, 687, 560 cm ⁻¹	
HPLC	t _R = 9,62 min, 100 % čistost pri 220 nm (metoda A)	

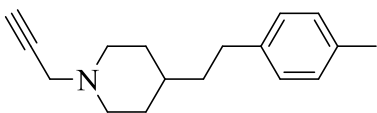
4.8.6. SINTEZA (*E*)-4-(-metilstiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (**28**)

Sintezo spojine **28** smo izvedli iz spojine **13** (0,42 g, 1,39 mmol, 1,0 ekv.), HCl (4 M v 1,4-dioksanu, 5 mL), MeCN (10 mL), K₂CO₃ (0,58 g, 4,20 mmol, 3,0 ekv.) in propargil bromida (80 % raztopina v toluenu, 0,20 mL, 1,80 mmol, 1,3 ekv.) po splošnih postopkih odstranitve Boc zaščite in sledeče alkilacije piperidinskega dušika. Za izvedbo kolonske kromatografije smo uporabili mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 1/3, V/V.

IUPAC ime	<i>(E)</i> -4-(-metilstiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidin (28)	
Izgled	Oranžna amorfna snov	
Tališče	T _{TAL} = 65–67 °C	
Izkoristek	36,4 %	
TLC	R _f (EtOAc/n-heksan) = 1/3, V/V) = 0,25	
¹H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,65 (dt, $J_1 = 12,0$, $J_2 = 3,9$ Hz, 1H), 1,68 (dt, $J_1 = 12,0$, $J_2 = 3,9$ Hz, 1H), 1,88–1,95 (m, 2H), 2,18–2,28 (m, 1H), 2,35–2,41 (m, 3H), 2,43 (s, 3H), 3,02–3,07 (m, 2H), 3,43 (d, $J = 2,5$ Hz, 2H), 6,22 (dd, $J_1 = 16,0$, $J_2 = 7,0$ Hz, 1H), 6,46 (d, $J = 15,9$ Hz, 1H), 7,21 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 7,36 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H)	
¹³C NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 21,09; 32,01; 38,77; 47,21; 52,25; 72,92; 79,07; 125,83; 127,93; 129,13; 133,84; 134,78; 136,62	
HRMS (ESI+)	m/z izrač. za C ₁₇ H ₂₂ N [M+H] ⁺ 240,1752; najden 240,1756	
IR (ATR)	3209, 2933, 2858, 2800, 2756, 1513, 1450, 1427, 1335, 1311, 1271, 1134, 1109, 1067, 1019, 972, 910, 824, 795, 785, 739, 685, 642, 561, 518 cm ⁻¹	
HPLC	$t_R = 9,65$ min, 97,7 % čistost pri 220 nm (metoda A)	

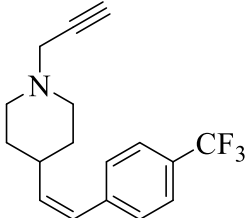
4.8.7. SINTEZA 4-(4-metilfenetil)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (**29**)

Sintezo spojine **29** smo izvedli iz spojine **20** (0,28 g, 0,92 mmol, 1,0 ekv.), HCl (4 M v 1,4-dioksanu, 5 mL), MeCN (10 mL), K₂CO₃ (0,38 g, 2,75 mmol, 3,0 ekv.), Cs₂CO₃ (0,60 g, 1,84 mmol, 2,0 ekv.) in propargil bromida (80 % v toluenu, 0,13 mL, 1,17 mmol, 1,3 ekv.) po splošnih postopkih odstranitve Boc zaščite in sledeče alkilacije piperidinskega dušika. Za izvedbo kolonske kromatografije smo uporabili mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 1/3, V/V.

IUPAC ime	4-(4-metilfenetil)-1-(prop-2-in-1-il)piperidin (29)	
Izgled	Rumena amorfna snov	
Izkoristek	35,6 %	
TLC	R_f (EtOAc/n-heksan) = 1/3, V/V) = 0,26	
¹H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,21–1,36 (m, 3H), 1,52–1,57 (m, 2H), 1,74–1,79 (m, 2H), 2,13–2,20 (m, 2H), 2,23 (t, J = 2,4 Hz, 1H), 2,31 (s, 3H), 2,56–2,60 (m, 2H), 2,86–2,90 (m, 2H), 3,29 (d, J = 2,4 Hz, 2H), 7,05–7,10 (m, 4H)	
¹³C NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 20,97; 32,21; 32,57; 34,68; 38,43; 47,21; 52,55; 72,83; 79,06; 128,17; 128,97; 135,05; 139,58	
HRMS (ESI+)	m/z izrač. za C ₁₇ H ₂₄ N [M+H] ⁺ 242,1909; najden 242,1904	
IR (ATR)	3183, 2932, 2917, 2847, 2798, 2752, 1515, 1451, 1333, 1293, 1270, 1144, 1103, 1080, 974, 850, 800, 784, 739, 559, 506 cm ⁻¹	
HPLC	t_R = 9,75 min, 97,4 % čistost pri 220 nm (metoda A)	

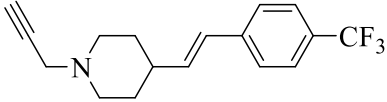
4.8.8. SINTEZA (Z)-1-(prop-2-in-1-il)-4-(4-(trifluorometil)stiril)piperidina (**30**)

Sintezo spojine **30** smo izvedli iz spojine **14** (0,075 g, 0,21 mmol, 1,0 ekv.), HCl (4 M v 1,4-dioksanu, 4 mL), MeCN (10 mL), K₂CO₃ (0,087 g, 0,63 mmol, 3,0 ekv.) in propargil bromida (80 % raztopina v toluenu, 0,030 mL, 0,27 mmol, 1,3 ekv.) po splošnih postopkih odstranitve Boc zaščite in sledeče alkilacije piperidinskega dušika. Za izvedbo kolonske kromatografije smo uporabili mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 2/1, V/V.

IUPAC ime	(Z)-1-(prop-2-in-1-il)-4-(4-(trifluorometil)stiril)piperidin (30)	
Izgled	Rumena oljnata snov	
Izkoristek	81,0 %	
TLC	R_f (EtOAc/n-heksan) = 2/1, V/V) = 0,28	
¹H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,51–1,61 (m, 2H), 1,70–1,74 (m, 2H), 2,19–2,25 (m, 2H), 2,24 (t, J = 2,5 Hz, 1H), 2,45–2,55 (m, 1H), 2,87–2,91 (m, 2H), 3,30 (d, J = 2,5 Hz, 2H), 5,60 (dd, J_1 = 11,7, J_2 = 10,2 Hz, 1H), 6,39 (d, J = 11,7 Hz, 1H), 7,33 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,59 (d, J = 8,2 Hz, 2H)	
¹³C NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 32,21; 34,59; 47,28; 51,82; 73,09; 78,97; 124,24 (d, $J_{C,F}$ = 272,1 Hz); 125,22 (dd, $J_{C,F}$ = 7,9; 3,8 Hz); 126,97; 128,46 (t, $J_{C,F}$ = 32,3 Hz); 128,72; 139,27; 141,23 (q, $J_{C,F}$ = 1,3 Hz)	
HRMS (ESI+)	m/z izrač. za C ₁₇ H ₁₉ F ₃ N [M+H] ⁺ 294,1470; najden 294,1469	
IR (ATR)	3305, 2933, 2805, 1615, 1331, 1167, 1129, 1068, 1017, 973, 851, 634, 603 cm ⁻¹	
HPLC	t_R = 10,21 min, 100 % čistost pri 220 nm (metoda A)	

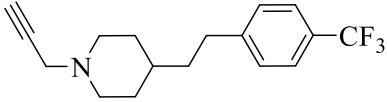
4.8.9. SINTEZA (*E*)-1-(prop-2-in-1-il)-4-(4-(trifluorometil)stiril)piperidina (**31**)

Sintezo spojine **31** smo izvedli iz spojine **15** (0,58 g, 1,63 mmol, 1,0 ekv.), HCl (4 M v 1,4-dioksanu, 10 mL), MeCN (15 mL), K₂CO₃ (0,68 g, 4,92 mmol, 3,0 ekv.) in propargil bromida (80 % raztopina v toluenu, 0,23 mL, 2,1 mmol, 1,3 ekv.) po splošnih postopkih odstranitve Boc zaščite in sledeče alkilacije piperidinskega dušika. Za izvedbo kolonske kromatografije smo uporabili mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 2/1, V/V.

IUPAC ime	<i>(E)</i> -1-(prop-2-in-1-il)-4-(4-(trifluorometil)stiril)piperidin (31)	
Izgled	Beli kristali	
Tališče	T _{TAL} = 72–74 °C	
Izkoristek	85,0 %	
TLC	R _f (EtOAc/n-heksan) = 2/1, V/V) = 0,50	
¹H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,52–1,62 (m, 2H), 1,80–1,84 (m, 2H), 2,12–2,19 (m, 1H), 2,26 (t, <i>J</i> = 2,4 Hz, 1H), 2,25–2,32 (m, 2H), 2,92–2,96 (m, 2H), 3,33 (d, <i>J</i> = 2,5 Hz, 2H), 6,27 (dd, <i>J</i> ₁ = 16,0, <i>J</i> ₂ = 6,9 Hz, 1H), 6,41 (d, <i>J</i> = 16,0 Hz, 1H), 7,43 (d, <i>J</i> = 8,1 Hz, 2H), 7,54 (d, <i>J</i> = 8,2 Hz, 2H)	
¹³C NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 31,78; 38,84; 47,17; 52,10; 72,97; 78,95; 121,50 (d, <i>J</i> _{C,F} = 271,6 Hz); 125,35 (q, <i>J</i> _{C,F} = 3,7 Hz); 126,07; 127,03; 128,69 (q, <i>J</i> _{C,F} = 32,4 Hz); 137,62; 140,07 (q, <i>J</i> _{C,F} = 1,3 Hz)	
HRMS (ESI+)	<i>m/z</i> izrač. za C ₁₇ H ₁₉ F ₃ N [M+H] ⁺ 294,1470; najden 294,1464	
IR (ATR)	3157, 2933, 2917, 2806, 1613, 1312, 1160, 1109, 1066, 1055, 972, 866, 831, 736, 600, 579, 517 cm ⁻¹	
HPLC	<i>t</i> _R = 10,19 min, 99,9 % čistost pri 220 nm (metoda A)	

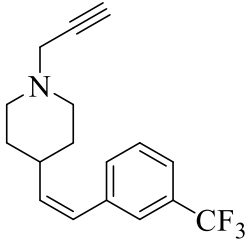
4.8.10. SINTEZA 1-(prop-2-in-1-il)-4-(4-(trifluorometil)fenetil)piperidina (**32**)

Sintezo spojine **32** smo izvedli iz spojine **21** (0,23 g, 0,64 mmol, 1,0 ekv.), HCl (4M v 1,4-dioksanu, 4 mL), MeCN (10 mL), K₂CO₃ (0,27 g, 1,95 mmol, 3,0 ekv.) in propargil bromida (80 % raztopina v toluenu, 0,92 mL, 0,83 mmol, 1,3 ekv.) po splošnih postopkih odstranitve Boc zaščite in sledeče alkilacije piperidinskega dušika. Za izvedbo kolonske kromatografije smo uporabili mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 1/2, V/V.

IUPAC ime	1-(prop-2-in-1-il)-4-(4-(trifluorometil)fenetil)piperidin (32)	
Izgled	Rjava amorfna snov	
Tališče	T _{TAL} = 31–33 °C	
Izkoristek	7,3 %	
TLC	R _f (EtOAc/n-heksan) = 1/2, V/V) = 0,12	
¹H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,23–1,37 (m, 3H), 1,54–1,60 (m, 2H), 1,74–1,78 (m, 2H), 2,14–2,20 (m, 2H), 2,23 (t, J = 2,4 Hz, 1H), 2,65–2,70 (m, 2H), 2,86–2,90 (m, 2H), 3,29 (d, J = 2,4 Hz, 2H), 7,26–7,29 (m, 2H), 7,50–7,53 (m, 2H)	
¹³C NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 2,14; 32,91; 34,71; 37,97; 47,17; 52,45; 72,89; 79,11; 124,35 (q, J _{C,F} = 271,9 Hz); 125,20 (q, J _{C,F} = 7,9 Hz); 128,02 (q, J _{C,F} = 32,3 Hz) 128,56; 146,76	
HRMS (ESI+)	m/z izrač. za C ₁₇ H ₂₁ F ₃ N [M+H] ⁺ 296,1626; najden 296,1625	
IR (ATR)	3153, 2932, 2852, 2798, 1615, 1429, 1318, 1157, 1116, 1093, 1065, 1017, 978, 910, 854, 831, 735, 682, 637, 598, 552, 511 cm ⁻¹	
HPLC	t _R = 10,29 min, 100 % čistost pri 220 nm (metoda A)	

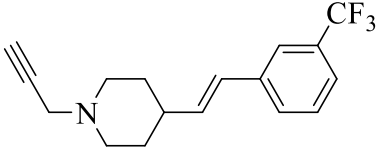
4.8.11. SINTEZA (Z)-1-(prop-2-in-1-il)-4-(3-(trifluorometil)stiril)piperidina (**33**)

Sintezo spojine **33** smo izvedli iz spojine **16** (0,050 g, 0,14 mmol, 1,0 ekv.), HCl (4 M v 1,4-dioksanu, 4 mL), MeCN (5 mL), K₂CO₃ (0,058 g, 0,42 mmol, 3,0 ekv.), Cs₂CO₃ (0,091 g, 0,28 mmol, 2,0 ekv.) in propargil bromida (80 % raztopina v toluenu, 0,020 mL, 0,18 mmol, 1,3 ekv.) po splošnih postopkih odstranitve Boc zaščite in sledeče alkilacije piperidinskega dušika. Za izvedbo kolonske kromatografije smo uporabili mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 1/3, V/V.

IUPAC ime	(Z)-1-(prop-2-in-1-il)-4-(3-(trifluorometil)stiril)piperidin (33)	
Izgled	Rumena oljnata snov	
Izkoristek	26,8 %	
TLC	R_f (EtOAc/n-heksan) = 1/3, V/V) = 0,18	
¹H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,63 (dt, $J_1 = 12,7$, $J_2 = 2,6$ Hz, 1H), 1,66 (dt, $J_1 = 11,6$, $J_2 = 3,5$ Hz, 1H), 1,75 (dd, $J_1 = 12,8$, $J_2 = 2,2$ Hz, 2H), 2,26–2,32 (m, 3H), 2,44–2,55 (m, 1H), 2,93–2,98 (m, 2H), 3,35 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H), 5,60 (dd, $J_1 = 11,6$, $J_2 = 10,2$ Hz, 1H), 5,41 (d, $J = 11,7$ Hz, 1H), 7,39–7,51 (m, 4H)	
¹³C NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 31,83; 34,35; 47,10; 51,69; 73,79; 78,08; 123,37 (q, $J_{C,F} = 3,8$ Hz); 124,09 (q, $J_{C,F} = 272,6$ Hz); 125,21 (q, $J_{C,F} = 3,8$ Hz); 127,08; 128,72; 130,63 (q, $J_{C,F} = 32,2$ Hz); 131,60; 138,20; 138,45	
HRMS (ESI+)	m/z izrač. za C ₁₇ H ₁₉ NF ₃ [M+H] ⁺ 294,1470; najden 294,1466	
IR (ATR)	3306, 2933, 2850, 2804, 2757, 1688, 1444, 1327, 1162, 1122, 1092, 1072, 972, 905, 807, 703, 696, 656, 628 cm ⁻¹	
HPLC	$t_R = 10,13$ min, 95,9 % čistost pri 220 nm (metoda A)	

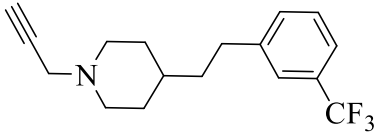
4.8.12. SINTEZA (*E*)-1-(prop-2-in-1-il)-4-(3-(trifluorometil)stiril)piperidina (**34**)

Sintezo spojine **34** smo izvedli iz spojine **17** (0,19 g, 0,53 mmol, 1,0 ekv.), HCl (4 M v 1,4-dioksanu, 10 mL), MeCN (10 mL), K₂CO₃ (0,22 g, 1,59 mmol, 3,0 ekv.), Cs₂CO₃ (0,35 g, 1,07 mmol, 2,0 ekv.) in propargil bromida (80 % raztopina v toluenu, 0,077 mL, 0,69 mmol, 1,3 ekv.) po splošnih postopkih odstranitve Boc zaščite in sledeče alkilacije piperidinskega dušika. Za izvedbo kolonske kromatografije smo uporabili mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 1/3, V/V.

IUPAC ime	<i>(E)</i> -1-(prop-2-in-1-il)-4-(3-(trifluorometil)stiril)piperidin (34)	
Izgled	Zelena oljnata snov	
Izkoristek	70,1 %	
TLC	R_f (EtOAc/n-heksan) = 1/3, V/V) = 0,18	
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,56 (dt, $J_1 = 12,1$, $J_2 = 3,7$ Hz, 1H), 1,59 (dt, $J_1 = 12,1$, $J_2 = 3,7$ Hz, 1H), 1,79–1,85 (m, 2H), 2,11–2,20 (m, 1H), 2,26 (t, $J = 2,4$ Hz, 1H), 2,29 (dt, $J_1 = 11,8$, $J_2 = 2,3$ Hz, 2H), 2,92–2,97 (m, 2H), 3,33 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H), 6,24 (dd, $J_1 = 16,0$, $J_2 = 6,9$ Hz, 1H), 6,41 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H), 7,38–7,45 (m, 2H), 7,51 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,58 (s, 1H)	
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 31,87; 38,86; 47,24; 52,19; 73,01; 79,02; 122,64 (q, $J_{C,F} = 3,9$ Hz); 123,49 (q, $J_{C,F} = 3,9$ Hz); 124,16 (q, $J_{C,F} = 272,3$ Hz); 127,03; 128,88; 129,18; 130,85 (q, $J_{C,F} = 32,1$ Hz); 136,90; 138,38	
HRMS (ESI+)	m/z izrač. za C ₁₇ H ₁₉ NF ₃ [M+H] ⁺ 294,1470; najden 294,1465	
IR (ATR)	3306, 2934, 2849, 2804, 2755, 1444, 1329, 1201, 1162, 1120, 1094, 1071, 965, 900, 792, 696, 662, 628 cm ⁻¹	
HPLC	$t_R = 10,16$ min, 99,8 % čistost pri 220 nm (metoda A)	

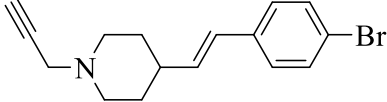
4.8.13. SINTEZA 1-(prop-2-in-1-il)-4-(3-(trifluorometil)fenetil)piperidina (**35**)

Sintezo spojine **35** smo izvedli iz spojine **22** (0,27 g, 0,76 mmol, 1,0 ekv.), HCl (4 M v 1,4-dioksanu, 5 mL), MeCN (10 mL), K₂CO₃ (0,32 g, 2,32 mmol, 3,1 ekv.), Cs₂CO₃ (0,50 g, 1,53 mmol, 2,0 mmol) in propargil bromida (80 % raztopina v toluenu, 0,11 mL, 0,99 mmol, 1,3 ekv.) po splošnih postopkih odstranitve Boc zaščitve in sledeče alkilacije piperidinskega dušika. Za izvedbo kolonske kromatografije smo uporabili mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 1/3, V/V.

IUPAC ime	1-(prop-2-in-1-il)-4-(3-(trifluorometil)fenetil)piperidin (35)	
Izgled	Rumeno-oranžna oljnata snov	
Izkoristek	29,0 %	
TLC	R_f (EtOAc/n-heksan) = 1/3, V/V) = 0,20	
¹H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,21–1,26 (m, 2H), 1,34 (dt, $J_1 = 11,1$, $J_2 = 3,7$ Hz, 1H), 1,54–1,60 (m, 2H), 1,73–1,80 (m, 2H), 2,14–2,21 (m, 2H), 2,22 (t, $J = 2,4$ Hz, 1H), 2,66–2,70 (m, 2H), 2,86–2,91 (m, 2H), 3,28 (d, $J = 2,46$ Hz, 2H), 7,33–7,44 (m, 4H)	
¹³C NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 32,10; 32,89; 34,82; 38,03; 47,13; 52,43; 72,86; 79,07; 122,51 (q, $J_{C,F} = 3,8$ Hz); 124,21 (q, $J_{C,F} = 272,2$ Hz); 124,88 (q, $J_{C,F} = 3,7$ Hz); 128,63; 130,51 (q, $J_{C,F} = 31,8$ Hz); 131,64; 143,48	
HRMS (ESI+)	m/z izrač. za C ₁₇ H ₂₁ NF ₃ [M+H] ⁺ 296,1626; najden 296,1629	
IR (ATR)	3308, 2923, 2849, 2804, 2757, 1449, 1329, 1199, 1161, 1121, 1072, 976, 900, 879, 800, 735, 735, 702, 660, 631 cm ⁻¹	
HPLC	$t_R = 10,25$ min, 98,7 % čistost pri 220 nm (metoda A)	

4.8.14. SINTEZA (*E*)-4-(4-bromostiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (**36**)

Sintezo spojine **36** smo izvedli iz spojine **18** (0,36 g, 0,98 mmol, 1,0 ekv.), HCl (10 mL), MeCN (15 mL), K₂CO₃ (0,41 g, 2,97 mmol, 3,0 ekv.), Cs₂CO₃ (0,64 g, 1,96 mmol, 2,0 ekv.) in propargil bromida (80 % raztopina v toluenu, 0,14 mL, 1,26 mmol, 1,3 ekv.) po splošnih postopkih odstranitve Boc zaščite in sledeče alkilacije piperidinskega dušika. Za izvedbo kolonske kromatografije smo uporabili mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 1/2, V/V.

IUPAC ime	<i>(E)</i> -4-(4-bromostiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidin (36)	
Izgle	Beli kristali	
Tališče	T _{TAL} = 103–106 °C	
Izkoristek	34,2 %	
TLC	R _f (EtOAc/n-heksan) = 1/2, V/V) = 0,16	
¹H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,54 (dt, $J_1 = 12,2$, $J_2 = 3,4$ Hz, 1H), 1,57 (dt, $J_1 = 12,3$, $J_2 = 3,6$ Hz, 1H), 1,77–1,83 (m, 2H), 2,08–2,17 (m, 1H), 2,19–2,30 (m, 3H), 2,91–2,96 (m, 2H), 3,32 (d, $J = 2,2$ Hz, 2H), 6,15 (dd, $J_1 = 16,0$, $J_2 = 6,9$ Hz, 1H), 6,31 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H), 7,21 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,41 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H)	
¹³C NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 31,92; 38,85; 47,24; 52,21; 72,98; 79,04; 127,13; 127,56; 130,12; 131,53; 135,77; 136,57	
HRMS (ESI+)	<i>m/z</i> izrač. za C ₁₆ H ₁₉ NBr [M+H] ⁺ 304,0701; najden 304,0706	
IR (ATR)	3150, 2929, 2850, 2798, 2745, 1485, 1466, 1423, 1328, 1310, 1135, 1117, 1098, 1069, 1007, 970, 906, 848, 822, 798, 754, 715, 579, 516 cm ⁻¹	
HPLC	<i>t_R</i> = 10,00 min, 100 % čistost pri 220 nm (metoda A)	

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV

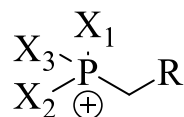
Pripravili smo optično čiste *cis* ali *trans* analoge 1-(prop-2-in-1-il)piperidina in tudi njihove reducirane derivate. Sinteza spojin je bila sestavljena iz šestih ključnih korakov, ki smo jim v primeru reduciranih derivatov dodali še enega.

Izhajali smo iz komercialno dostopne piperidin-4-karboksilne kisline, ki v svoji strukturi vsebuje elektrofilni in nukleofilni center. V prvi stopnji sinteze smo na amsko skupino uvedli Boc zaščitno skupino po splošnem postopku uvedbe Boc zaščite. S tem smo bistveno zmanjšali reaktivnost nukleofilnega amina in preprečili nastanek potencialnih stranskih produktov v naslednjih reakcijskih stopnjah. Kot topilo smo uporabili zmes vode, v kateri je dobro topna sol piperidin-4-karboksilne kisline, in 1,4-dioksana, primernejšega topila za di-*terc*-butil dikarbonat (33).

5.1.1. SINTEZA WEINREBOVEGA AMIDA IN REDUKCIJA DO ALDEHIDA

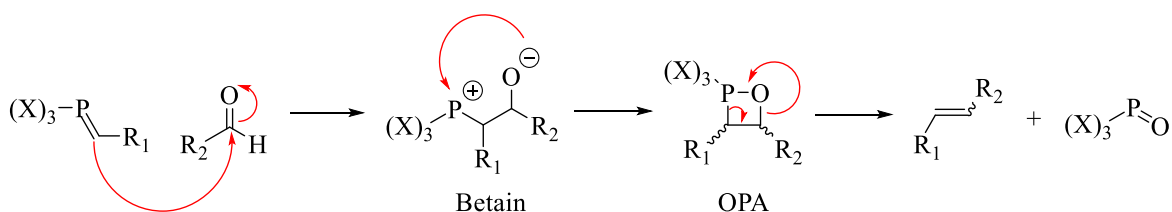
Redukcija karboksilne kisline do aldehida je lahko težavna, saj je reakcijo težko ustaviti na stopnji aldehida. Ta se namreč pogosto reducira naprej do alkohola. V drugi in tretji reakcijski stopnji smo zato karboksilno kislino reducirali do aldehida preko Weinrebovega amida, ki smo ga pripravili iz *N,O*-dimetilhidroksilaminijevega klorida s postopkom tvorbe amidne vezi. Slabše reaktivno karboksilno kislino smo aktivirali z dodatkom kombinacije sklopitvenih reagentov TBTU, EDC in HOBt. Z dodatkom pomožnega nukleofila DMAP smo skrajšali dolg reakcijski čas in omejili tvorbo stranskih produktov, povezanih z uporabo sklopitvenih reagentov.

Ena ključnih prednosti Weinrebovega amida je poleg enostavne priprave ta, da omogoča selektivno redukcijo karboksilne kisline do ketona ali aldehida, kar sta leta 1981 ugotovila Nahm in Weinreb. *N*-metoksi-*N*-metilamide sta ob prisotnosti Grignardovega reagenta ali organolitijevih spojin v THF reducirala do ketonov. Ob uporabi prebitnega LiAlH_4 pa sta *N*-metoksi-*N*-metilamide reducirala predvsem do aldehydov, količina nastalih primarnih alkoholov je bila zanemarljiva. Mehanistično gledano metoksi skupina Weinrebovega amida preko induktivnega efekta olajša nukleofilni napad na karbonilni ogljik. Pri tem nastane s kovinskimi ioni keliran intermediat, ki je stabilen pri nizkih temperaturah. Do



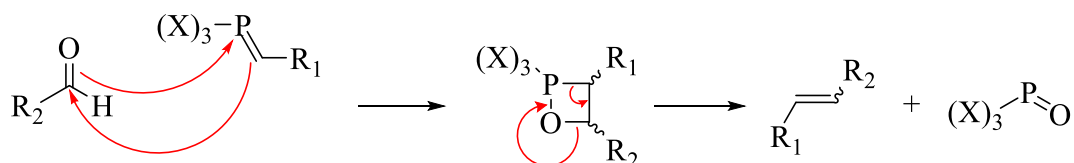
Slika 19: Splošna struktura ilidov.

Predlaganih je bilo več različnih mehanizmov poteka reakcije, pomembnejša pa sta predvsem dva. Prvi mehanizem poteka Wittigove reakcije preko betaina, predstavljenega na sliki 20, je predlagal sam Wittig s sodelavci. Obsega nukleofilno adicijo ilida na karbonil, pri čemer nastane intermediat betain. Le-ta se ciklizira do oksafosfetana (OPA), ki razpade do alkena in fosfin oksida. Raziskovalci so ta mehanizem kasneje zavrnil, saj spektroskopsko nekompleksiran betain v reakcijski zmesi nikoli ni bil detektiran.



Slika 20: Predlagani mehanizem poteka Wittigove reakcije preko betaina.

Danes veljaven mehanizem, predstavljen na sliki 21, sta predlagala Vedejs in Snoble in obsega direktno ireverzibilno [2+2] cikloadicijo ilida in aldehida do OPA. Ta nato podleže ireverzibilni in stereospecifični razklenitvi obroča, tako da nastaneta alken in fosfin oksid. Stereokemija produkta alkena je določena že v prehodnem stanju prvega koraka - cikloadicije. Pri reakciji med aldehydom in nestabiliziranim alkilidentrifeniilfosforanom se karbonilna C=O vez in ilidna P-C vez približata pod relativno velikim kotom, kar povzroči precej hitro tvorbo vezi in rehibridizacijo atomov, ki tvorijo OPA obroč. Na P vezani substituenti medtem ostanejo v tetraedrični obliki, zato je energetsko ugodnejše prehodno stanje *cis*-OPA, ki potem razpade do *Z*-alkena. Pri reakciji med aldehydom in stabiliziranim ilidom pa sta tvorba vezi in rehibridizacija počasnejši, geometrija substituentov okoli P pa je podobna trigonalno bipiramidalni. Energetsko ugodnejše prehodno stanje je zato *trans*-OPA, ki razpade do *E*-alkena (37, 38).



Slika 21: Danes veljaven mehanizem Wittigove reakcije preko direktne ireverzibilne [2+2] cikloadicije ilida in aldehida do OPA.

Pri izvedbi reakcij smo uporabili semi-stabilizirane ilide. Le-te smo sintetizirali iz trifenilfosfina in ustreznega benzil halida, potekla je nukleofilna substitucija tipa S_N2 . Wittigovo reakcijo smo izvajali v brezvodnem THF, s čemer smo zmanjšali možnosti hidrolize ilidov. Dodani NaHMDS je močna baza, s katero smo odcepili proton na reaktivnem ogljiku v ilidu. Z uporabo semi-stabiliziranih ilidov v večini primerov pričakovano nismo dosegli večje regiospecifičnosti, čeprav je količina *trans*-izomerov prevladovala nad *cis*-izomeri. Zgolj *trans*-izomer smo dobili pri sintezi spojin **10** in **11** iz spojin **4** in **6**. Pri sintezi spojine **18** iz spojine **9** smo z NMR detektirali prisotnost obeh izomerov, vendar *cis*-izomera nismo mogli izolirati. Prevladovanje *trans*-izomerov nad *cis* lahko razložimo s tem, da je substituent, vezan na aldehydu, velik piperidinski obroč, ki se s substituentom, vezanim na ilid, sterično najmanj ovira pri *trans*-izomerih.

5.1.3. REDUKCIJA DVOJNE VEZI

Del produktov Wittigove reakcije smo reducirali s pomočjo katalitskega hidrogeniranja. Čeprav je nasičena vez termodinamsko stabilnejša od nenasičene, adicija vodika ne poteče samodejno. Potreben je dodatek katalizatorja, mi smo uporabili paladij na ogljiku. Vodik se adsorbira na površino nosilca s katalizatorjem, pri čemer disociira, prav tako se na površino adsorbira alken. Pride do adicije enega in nato še drugega vodika na molekulo alkena. Ker je ta adsorbiran na nosilec s katalizatorjem, do adicije vodika lahko pride samo iz ene smeri – *sin*-adicija. Mehanizem reakcije se imenuje Horiuti-Polanyijev mehanizem (39).

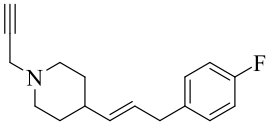
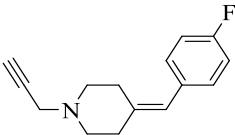
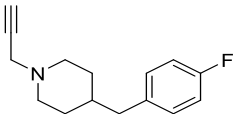
5.1.4. ODSTRANITEV BOC ZAŠČITE IN ALKILACIJA

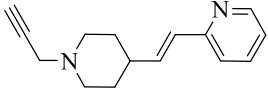
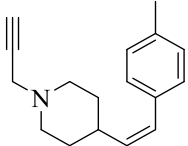
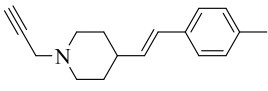
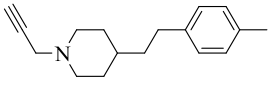
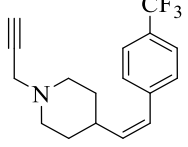
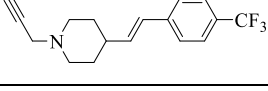
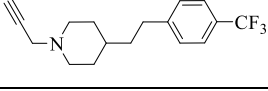
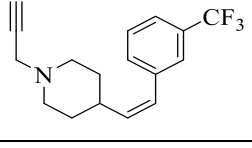
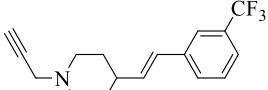
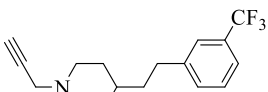
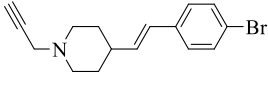
Boc zaščitno skupino smo odstranili z acidolizo ter nastali produkt takoj alkilirali s propargil bromidom, ki je elektrofilno alkilirajoče sredstvo. Hkrati je tudi lakrimator, zato smo reakcijo izvajali v inertni atmosferi. Z dodatkom baz K_2CO_3 in Cs_2CO_3 smo nevtralizirali sproščeno kislino. Ker je reakcija občutljiva na svetlobo, smo bučko ovili v aluminijasto folijo (40).

5.2. REZULTATI IN KOMENTAR BIOKEMIJSKEGA TESTIRANJA

Končnim spojinam smo biokemijsko ovrednotili zaviralno aktivnost na encimih MAO-A in MAO-B. Rezultati, ki se nahajajo v preglednici V, so podani kot rezidualna aktivnost (RA) pri 100 μM zaviralca. RA je definirana kot razmerje med aktivnostjo encima v prisotnosti zaviralca in aktivnostjo encima brez zaviralca ter je podana v odstotkih. Zaviralcem z RA manjšo od 50 % smo izračunali IC_{50} na podlagi določitve RA pri sedmih različnih koncentracijah zaviralca. IC_{50} predstavlja koncentracijo spojine, ki je potrebna za 50 % zaviranje encima *in vitro*.

Preglednica V: Rezultati biokemijskega vrednotenja končnih sintetiziranih spojin.

Oznaka spojine	Struktura	hMAO-A RA [%] pri 100 μM ali IC_{50}	hMAO-B RA [%] pri 100 μM ali IC_{50}
<u>23</u>		62 %	24,6 μM
<u>24</u>		161 μM	48,8 μM
<u>25</u>		77 %	60 %

<u>26</u>		81 %	0,730 μ M
<u>27</u>		62 %	19,2 μ M
<u>28</u>		57 %	0,147 μ M
<u>29</u>		68 %	0,159 μ M
<u>30</u>		80 %	1,51 μ M
<u>31</u>		65 %	18,6 nM
<u>32</u>		62 %	10,9 nM
<u>33</u>		0,858 μ M	9,35 μ M
<u>34</u>		65 %	0,550 μ M
<u>35</u>		72 %	0,502 μ M
<u>36</u>		54 %	21,2 nM

Ugotovili smo, da naše spojine bistveno močnejše zavirajo izoformo MAO-B kot MAO-A. Izmed 14 spojin smo kar 13 spojinam lahko izračunali IC_{50} na MAO-B, medtem ko sta samo 2 spojini dovolj zavirali MAO-A, da smo jima izračunali IC_{50} . Po svoji jakosti zaviranja na MAO-B v nanomolarnem območju izstopajo predvsem 3 spojine, najmočnejši zaviralec **32** z $IC_{50} = 10,9$ nM, **31** z $IC_{50} = 18,6$ nM in **36** z $IC_{50} = 21,2$ nM.

Izoformo MAO-B močnejše zavirajo *trans* izomeri produktov, kar velja za vse *cis/trans* pare spojin. *Trans* izomeri so za 1-2 velikostna razreda močnejši zaviralci. Spojina **33** je edina spojina, ki izkazuje *cis/trans* izomerijo in smo ji hkrati izračunali vrednosti IC_{50} na obeh izoformah. Ugotovili smo, da je njena jakost zaviranja MAO-A za en velikostni razred večja kot na MAO-B.

S sintezo reduciranih derivatov smo želeli preveriti vpliv nasičenosti vezi na jakost inhibicije encimov. Ugotovili smo, da imajo prav vse reducirane spojine (pari spojin **28** in **29**, **34** in **35**, **31** in **32**) primerljivo jakost delovanja kot njihovi *trans* analogi.

Preverili smo tudi vpliv posameznih substituentov na aktivnost spojin. Ugotovili smo, da daljšanje ali krajšanje verige negativno vpliva na zaviralno aktivnost na MAO-B, saj so imele spojine **23** z $IC_{50} = 24,6$ μ M, **24** z $IC_{50} = 48,8$ μ M in **25** z RA = 60 % daleč najnižjo jakost. Močnejši zaviralci so bile spojine, ki so bile na benzenovem obroču substituirane na *para* mestu, kar je najbolj razvidno iz parov spojin z enakim trifluorometilnim substituentom na *para* in *meta* mestu (**30**, **31** in **33**, **34**). Izmed spojin, substituiranih na *para* mestu so spojine s halogenom učinkovitejše od tistih brez substituentov. Metilna skupina (**27**, **28**, **29**) in trifluorometilna skupina (**30**, **31**, **32**) sta si po velikosti precej podobni, se pa močno razlikujeta po elektronegativnosti. Glede na to, da ima skupina spojin s trifluorometilnim substituentom v povprečju za en velikostni razred večjo jakost od skupine spojin z metilnim substituentom, lahko sklepamo, da halogeni v aktivnem mestu encimov tvorijo dodatne interakcije.

6. SKLEP

V prvem delu magistrske naloge smo načrtovali in uspešno sintetizirali 14 1-(prop-2-in-1-il)piperidinskih analogov, ki izkazujejo zaviralno delovanje na MAO. V nadaljevanju smo spojine biološko ovrednotili na izoliranih hMAO-A in hMAO-B ter na podlagi rezultatov sklepali o odnosu med strukturo in delovanjem naših spojin.

V večstopenjski sintezi smo poskušali sintetizirati *cis*, *trans* in reducirane derivate z različnimi substituenti na benzenovem obroču ter podaljšano ali skrajšano verigo. Ključna stopnja sinteze je bila Wittigova reakcija, s katero smo s pomočjo semi-stabiliziranih ilidov sintetizirali alkene. Med reakcijo je običajno nastalo 3–4-krat več *trans* izomera, kar je verjetno posledica steričnega oviranja precej voluminoznih substituentov na vsaki strani dvojne vezi.

Med biološkim vrednotenjem spojin smo le-tem določili RA, najmočnejšim med njimi smo izračunali tudi IC₅₀ vrednost. Ugotovili smo, da so spojine v splošnem močnejši zaviralci MAO-B kot MAO-A. Nadalje so MAO-B bistveno bolj zavirali *trans* derivati, kar sovпада z literaturnimi podatki o podolgovati obliki aktivnega mesta tega encima. Ugotovili smo tudi, da je aktivnost reduciranih derivatov primerljiva njihovim *trans* analogom. Z daljšanjem ali krajšanjem verige se je jakost zaviranja MAO zmanjšala. Močnejši zaviralci so bile spojine s *para* substitucijo na benzenu, katerih substituent je vseboval vsaj en halogen. Kot najbolj obetavne spojine so se izkazale spojina **32** z IC₅₀ = 10,9 nM, **31** z IC₅₀ = 18,6 nM in **36** z IC₅₀ = 21,2 nM.

Zaključimo lahko, da spojini (*E*)-1-(prop-2-in-1-il)-4-(4-(trifluorometil)stiril)piperidin (**31**) in 1-(prop-2-in-1-il)-4-(4-trifluorometil)fenetil)piperidin (**32**) predstavljata pomembno izhodišče za nadaljnje raziskovanje novih nanomolarnih zaviralcev MAO-B kot potencialnih zdravilnih učinkovin za terapijo nevrodegenerativnih bolezni.

7. LITERATURA

1. Finberg JPM: Update on the pharmacology of selective inhibitors of MAO-A and MAO-B: Focus on modulation of CNS monoamine neurotransmitter release. *Pharmacology & Therapeutics* 2014; 143 (2): 133-152.
2. Edmondson DE, Mattevi A, Binda C, Li M, Hubalek F: Structure and mechanism of monoamine oxidase. *Current Medicinal Chemistry* 2004; 11 (15): 1983-1993.
3. Youdim MBH, Edmondson D, Tipton KF: The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nature Reviews Neuroscience* 2006; 7 (4): 295-309.
4. Tong JC, Meyer JH, Furukawa Y, Boileau I, Chang LJ, Wilson AA, Houle S, Kish SJ: Distribution of monoamine oxidase proteins in human brain: implications for brain imaging studies. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 2013; 33 (6): 863-871.
5. Edmondson DE, Binda C, Mattevi A: The FAD Binding Sites of Human Monoamine Oxidases A and B. *Neurotoxicology* 2004; 25 (1-2): 63-72.
6. Edmondson DE, Binda C, Wang J, Upadhyay AK, Mattevi A: Molecular and Mechanistic Properties of the Membrane-Bound Mitochondrial Monoamine Oxidases. *Biochemistry* 2009; 48 (20): 4220-4230.
7. Upadhyay AK, Borbat PP, Wang J, Freed JH, Edmondson DE: Determination of the oligomeric states of human and rat monoamine oxidases in the outer mitochondrial membrane and octyl beta-D-glucopyranoside micelles using pulsed dipolar electron spin resonance spectroscopy. *Biochemistry* 2008; 47 (6): 1554-1566.
8. Binda C, Newton-Vinson P, Hubalek F, Edmondson DE, Mattevi A: Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders. *Nature structural biology* 2002; 9 (1): 22-26.
9. Edmondson DE, Binda C, Mattevi A: Monoamine oxidases A and B: membrane-bound flavoenzymes of medical importance. *Handbook of flavoproteins, Vol 1: Oxidases, Dehydrogenases and Related Systems*. Walter de Gruyter GMBH, Berlin, 2013: 139-154.
10. Milczek EM, Binda C, Rovida S, Mattevi A, Edmondson DE: The 'gating' residues Ile199 and Tyr326 in human monoamine oxidase B function in substrate and inhibitor recognition. *Febs Journal* 2011; 278 (24): 4860-4869.

11. Edmondson DE, Binda C, Mattevi A: Structural insights into the mechanism of amine oxidation by monoamine oxidases A and B. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2007; 464 (2): 269-276.
12. De Colibus L, Li M, Binda C, Lustig A, Edmondson DE, Mattevi A: Three-dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO A): Relation to the structures of rat MAO A and human MAO B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102 (36): 12684-12689.
13. Carradori S, Silvestri R: New Frontiers in Selective Human MAO-B Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 2015; 58 (17): 6717-6732.
14. Boyer EW, Shannon M: The serotonin syndrome. *New England Journal of Medicine* 2005; 352 (11): 1112-1120.
15. Gillman PK: Advances Pertaining to the Pharmacology and Interactions of Irreversible Nonselective Monoamine Oxidase Inhibitors. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 2011; 31 (1): 66-74.
16. Onofrj M, Bonanni L, Thomas A: An expert opinion on safinamide in Parkinson's disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 2008; 17 (7): 1115-1125.
17. Youdim MBH, Bakhle YS: Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. *British Journal of Pharmacology* 2006; 147: 287-296.
18. Matveychuk D, Nunes E, Ullah N, Velazquez-Martinez CA, MacKenzie EM, Baker GB: Comparison of phenelzine and geometric isomers of its active metabolite, beta-phenylethylidenehydrazine, on rat brain levels of amino acids, biogenic amine neurotransmitters and methylamine. *Journal of Neural transmission* 2013; 120 (6): 987-996.
19. Frieling H, Bleich S: Tranylcyproamine - New perspectives on and "old" drug. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 2006; 256 (5): 268-273.
20. Finberg JPM, Youdim MBH: Pharmacological properties of the anti-Parkinson drug rasagiline; modification of endogenous brain amines, reserpine reversal, serotonergic and dopaminergic behaviours. *Neuropharmacology* 2002; 43 (7): 1110-1118.
21. Youdim MBH, Gross A, Finberg JPM: Rasagiline [N-propargyl-1R(+)-aminoindan], a selective and potent inhibitor of mitochondrial monoamine oxidase B. *British Journal of Pharmacology* 2001; 132 (2): 500-506.

22. Dawson TM, Dawson VL: Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* 2003; 302 (5646): 819-822.
23. Galter D, Buervenich S, Carmine A, Anvret M, Olson L: ALDH1 mRNA: presence in human dopamine neurons and decreases in substantia nigra in Parkinson's disease and in the ventral tegmental area in schizophrenia. *Neurobiology of Disease* 2003; 14: 637-647.
24. Drukarch B, van Muiswinkel FL: Drug Treatment of Parkinson's Disease: Time for phase II. *Biochemical Pharmacology* 2000; 59: 1023-1031.
25. Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H: Alzheimer's disease. *Lancet* 2006; 368 (9533): 387-403.
26. Elhwuegi AS: Central monoamines and their role in major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2004; 28 (3): 435-451.
27. Kores Plesničar B: Epidemiologija, etiologija, klinična slika in diagnostika depresije. *Farmaceutski vestnik* 2006; 57: 241-244.
28. Bačar C, Koder S: Farmakoterapija depresivnih motenj. *Farmaceutski vestnik* 2006; 57: 245-250.
29. Huremović D: Načrtovanje in sinteza derivatov *N*-propargilpiperidina kot potencialnih zaviralcev monoaminooksidaze tipa B in butirilholinesteraze. Magistrska naloga. Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani, 2016
30. Yanez M, Fraiz N, Cano E, Orallo F: Inhibitory effects of cis- and trans-resveratrol on noradrenaline and 5-hydroxytryptamine uptake and on monoamine oxidase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006; 344 (2): 688-695.
31. Von der Eltz H, Guder HJ, Muhlegget K: New hydrolase substrates. United States Patent, Patent number 4900822, Date of patent Feb. 13, 1990.
32. Košak U, Knez D, Coquelle N, Brus B, Pišlar A, Nachon F, Brazzolotto X, Kos J, Colletier JP, Gobec S: *N*-Propargylpiperidines with naphthalene-2-carboxamide or naphthalene-2-sulfonamide moieties: Potential multifunctional anti-Alzheimer's agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2017; 25 (2): 633-645.
33. Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, Pečar S: Farmaceutska kemija III: Vaje in Seminarji. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2010: 1-9.
34. Nahm S, Weinreb SM: *N*-methoxy-*N*-methylamides as effective acylating agents. *Tetrahedron Letters* 1981; 22 (39): 3815-3818.

35. Qu B, Collum DB: Mechanism of acylation of lithium phenylacetylide with a Weinreb amide. *Journal of Organic Chemistry* 2006; 71 (18): 7117-7119.
36. http://pubs.acs.org/subscribe/journals/ci/30/i12/html/12georg_box.html (dostopano: 24. 5. 2017)
37. Byrne PA, Gilheany DG: The modern interpretation of the Wittig reaction mechanism. *Chemical Society Reviews* 2013; 42 (16): 6670-6696.
38. Vedejs E, Fleck TJ: Kinetic (not equilibrium) factors are dominant in Wittig reactions of conjugated ylides. *Journal of the American Chemical Society* 1989; 111 (15): 5861-5871.
39. Horiuti I, Polanyi M: Exchange reactions of hydrogen on metallic catalysts. *Transactions of the Faraday Society* 1934; 30: 1164-1172.
40. http://www.apolloscientific.co.uk/downloads/msds/OR01606_msds.pdf (dostopano: 25. 5. 2017)
41. http://www.mirs.gov.si/fileadmin/um.gov.si/pageuploads/Dokpdf/Dogodki/Razno/Mer_ske_enote_predstavitev.pdf (dostopano: 3. 5. 2017)