

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



KATARINA GRABRIJAN

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



KATARINA GRABRIJAN

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA DIPEPTIDNIH ZAVIRALCEV
IMUNOPROTEASOMA**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF DIPEPTIDE
IMUNOPROTEASOME INHIBITORS**

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Aleša Obreze, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Marka Jukiča, mag. farm. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo in na Inštitutu Jožef Stefan.

Zahvala

Zahvaljujem se prof. dr. Alešu Obrezi, mag. farm. in asist. dr. Marku Jukiču, mag. farm. za strokovne nasvete, pomoč pri eksperimentalnem delu in izredno hiter pregled magistrske naloge. Hvala tudi predsedniku komisije prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm. in izr. prof. dr. Igorju Locatelliju za zelo hiter pregled naloge.

Posebna zahvala pa gre moji družini: staršem, starim staršem, bratu, sestri in Boštjanu. Hvala za vso podporo in pomoč tekom študija in med pisanjem magistrske naloge.

IZJAVA:

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Aleša Obreze, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Marka Jukiča, mag. farm.

Katarina Grabrijan

Predsednik komisije: prof. dr. Samo Kreft, mag. farm.

Član komisije: izr. prof. dr. Igor Locatelli, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	I
KAZALO SLIK	II
KAZALO PREGLEDNIC	IV
POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1. UVOD	1
1.1. Sistem ubikvitin-proteasom	I
1.2. 20S proteasom	2
1.3. Imunoproteasom	4
1.3.1. Vloga imunoproteasoma pri boleznih	4
1.3.1.1. Vloga imunoproteasoma pri infekcijah	5
1.3.1.2. Vnetne in avtoimunske bolezni	5
1.3.1.3. Rak	6
1.3.1.4. Bolezni centralnega živčnega sistema in staranje	7
1.3.1.5. Vloga imunoproteasoma v neimunskih celicah	7
1.4. Bakterijski proteasom – <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7
1.5. Zaviralci proteasoma	8
1.5.1. Nespecifični zaviralci proteasoma	8
Bortezomib	8
Karfilzomib	9
Iksazomib	9
Marizomib	10
1.5.2. Selektivni zaviralci specifičnih podenot proteasoma	10
ONX-0914	11
UK-101	11
1.6. Nekovalentni zaviralci	12
1.7. Kovalentni zaviralci	12
1.7.1. Oksatiazoloni	13
2. NAMEN DELA	15
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1. MATERIALI	17
Reagenti	17
Topila	17
Laboratorijska oprema	17
3.2. METODE	18
Kromatografske metode	18
Spektroskopske metode	18
Določanje talilnega intervala	19
Računalniška programska oprema	19
4. EKSPERIMENTALNO DELO	20
4.1. UVEDBA BENZIL KARBAMATNE ZAŠČITNE SKUPINE NA AMINSKO SKUPINO AMINOKISLIN	20
4.2. SKLOPITVENE REAKCIJE Z AMINOKISLINSKIMI AMIDI	24
4.3. SINTEZA OKSATIAZOLONKEGA OBROČA	40

Sinteza modelne spojine:	45
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	47
5.1. ZAŠČITA AMINO SKUPINE: Uvedba benziloksikarbonilne skupine na aminsko skupino aminokislin (sinteza spojin 1–4)	47
5.1.1. Zaščita amino skupine: uvedba t-butiloksikarbonilne skupine na aminsko skupino L-fenilalanin amida (sinteza spojine 33a)	49
5.2. SKLOPITVENE REAKCIJE na z benzil karbamatom zaščitene aminokislinah (sinteza spojin 5–16).....	50
5.3. CIKLIZACIJA končnih amidov do 1,3,4-oksotiazol-2-ona (poskusi sintez).....	53
5.4. BIOKEMIJSKO VREDNOTENJE SPOJIN	55
6. SKLEP.....	56
7. LITERATURA	58

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz razgradnje proteinov s proteasomom. Najprej preko encimov E1, E2 in E3 poteče ubikvitinizacija substratov (povzeto po 13)	1
Slika 2: Različne vrste proteasomov (povzeto po 23)	3
Slika 3: Shematski prikaz konstitutivnega proteasoma in imunoproteasoma (povzeto po 3).....	4
Slika 4: Strukturna formula bortezomiba	8
Slika 5: Strukturna formula karfilzomiba.....	9
Slika 6: Strukturna formula predzdravila iksazomiba	9
Slika 7: Strukturna formula marizomiba	10
Slika 8: β 5c in β 5i podenoti (imuno) proteasoma in razlike v njihovih vezavnih žepih (povzeto po 26).....	10
Slika 9: Aktivno mesto (povzeto po 26).....	10
Slika 10: Strukturna formula zaviralca ONX-0914.....	11
Slika 11: Strukturna formula UK-101	11
Slika 12: Med encimom in zaviralcem pride najprej do nekovalentne interakcije, nato pa nastane (ireverzibilna) kovalentna vez (povzeto po 7).....	13
Slika 13: Predlagan mehanizem kovalentne vezave oksotiazolonov s treoninom v aktivnem mestu (povzeto po 24)	13
Slika 14: Vezavni žepi v aktivnem mestu	15
Slika 15: Sintezni načrt priprave dipeptida z 1,3,4-oksotiazol-2-ona bojno glavo	16
Slika 16: Zgoraj: Reakcijska shema sinteze benziloksikarbonilfenilalanina (1) iz fenilalanina in benzil kloroformata. Spodaj: Reakcijska shema sinteze benziloksikarboniltriptofana (2) iz triptofana in benzil kloroformata.	20

Slika 17: Zgoraj: Reakcijska shema sinteze beziloksikarbonillevcina (3) iz levcina in benzil kloroformata. Spodaj: Reakcijska shema sinteze benziloksikarbonilizolevcina (4) iz izolevcina in benzil kloroformata.	22
Slika 18: Reakcijska shema sinteze benzil (1-((2-amino-2-oksoetil)amino)-1-okso-3-fenilpropan-2-il)karamata (5) iz spojine 1 in glicinamida, benzil (1-((1-amino-1-okso-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-okso-3-fenilpropan-2-il)karamata (6) iz spojine 1 in L-alaninamida in benzil (1-((1-amino-1-okso-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-okso-3-fenilpropan-2-il)karamata (7) iz spojine 1 in L-fenilalaninamida.....	24
Slika 19: Reakcijska shema sinteze benzil(1-((2-amino-2-oksoetil)amino)-3-(1H-indol-3-il)-1-okso-3-fenilpropan-2-il)karamata (8) iz spojine 2 in glicinamida, benzil (1-((1-amino-1-okso-3-fenilpropan-2-il)amino)-3-(1H-indol-3-il)-1-okso-3-fenilpropan-2-il)karamata (9) iz spojine 2 in L-alaninamida in benzil (1-((1-amino-1-okso-3-fenilpropan-2-il)amino)-3-(1H-indol-3-il)-1-okso-3-fenilpropan-2-il)karamata (10) iz spojine 2 in L-fenilalaninamida.....	28
Slika 20: Reakcijska shema sinteze benzil (1-((2-amino-2-oksoetil)amino)-4-metil-1-okso-3-fenilpropan-2-il)karamata (11) iz spojine 3 in glicinamida, sinteze benzil (1-((1-amino-1-okso-3-fenilpropan-2-il)amino)-4-metil-1-okso-3-fenilpropan-2-il)karamata (12) iz spojine 3 in L-alaninamida in benzil (1-((1-amino-1-okso-3-fenilpropan-2-il)amino)-4-metil-1-okso-3-fenilpropan-2-il)karamata (13) iz spojine 3 in L-fenilalaninamida	32
Slika 21: Reakcijska shema sinteze benzil (1-((2-amino-2-oksoetil)amino)-3-metil-1-okso-3-fenilpropan-2-il)karamata (14) iz spojine 4 in glicinamida, sinteze benzil (1-((1-amino-1-okso-3-fenilpropan-2-il)amino)-3-metil-1-okso-3-fenilpropan-2-il)karamata (15) iz spojine 4 in L-alaninamida in sinteze benzil (1-((1-amino-1-okso-3-fenilpropan-2-il)amino)-3-metil-1-okso-3-fenilpropan-2-il)karamata (16) iz spojine 4 in L-fenilalaninamida.....	36
Slika 22: Splošna reakcijska shema ciklizacije	40
Slika 23: Reakcijska shema sinteze spojin 17–19 iz spojin 14–16 in klorokarbonilsulfenil klorida.....	41
Slika 24: Reakcijska shema sinteze benzil (3-metil-1-okso-1-((1-(2-okso-1,3,4-oksotiazol-5-il)-2-fenilet)amino)propan-2-il)karamata (30) iz benzil (1-((1-amino-1-okso-3-fenilpropan-2-il)amino)-3-metil-1-okso-3-fenilpropan-2-il)karamata (16) in klorokarbonilsulfenil klorida	42
Slika 25: Reakcijska shema sinteze benzil (3-(1H-indol-3-il)-1-okso-1-((2-okso-1,3,4-oksotiazol-5-il)metil)amino)propan-2-il)karamata (31) iz benzil (1-((2-amino-2-	

oksoetil)amino)-3-(1H-indol-3-il)-1-oksopropan-2-il)karbamata (8) in klorokarbonilsulfenil klorida	43
Slika 26: Reakcijska shema sinteze benzil (3-metil-1-okso-1-((1-(2-okso-1,3,4-oksotiazol-5-il)-2-feniletil)amino)pentan-2-il)karbamata (32) iz benzil (1-((1-amino-1-okso-3-fenilpropan-2-il)amino)-3-metil-1-oksopentan-2-il)karbamata (12) in klorokarbonilsulfenil klorida	44
Slika 27: Reakcijska shema sinteze terc-butil (1-(2-okso-1,3,4-oksotiazol-5-il)-2-feniletil) karbamata (33b) iz Boc zaščenega L-fenilalaninamida (33a)	45
Slika 28: Mehanizem Schotten-Baumannove reakcije (prirejeno po 35)	49
Slika 29: Mehanizem Boc zaščite (povzeto po 36)	50
Slika 30: Mehanizem reakcije z EDC in HOBt (povzeto po 37)	51
Slika 31: Mehanizem reakcije s TBTU (povzeto po 38)	52
Slika 32: Mehanizem ciklizacije do 1,3,4-oksotiazol-2-ona (prirejeno po 41)	55

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Količine izhodne spojine in dodanih reagentov pri sintezah spojin 8–10....	29
Preglednica II: Količine izhodne spojine in dodanih reagentov pri sintezah spojin 11–13	33
Preglednica III: Količine izhodne spojine in dodanih reagentov pri sintezah spojin 14–1637	
Preglednica IV: R1 in R2 fragmenti spojin	40
Preglednica V: Količine izhodne spojine in reagenta pri sintezah spojin 14–16	42

POVZETEK

Ubikvitin proteasomski sistem (UPS) je glavni sistem za razgradnjo proteinov v evkariontskih celicah. Preko sistema UPS se uravnavajo številni ključni celični procesi. Standardna oblika proteasoma je 26S proteasom, kjer poteka razgradnja z ubikvitinom označenih proteinov. Poleg te obstaja še več drugih oblik proteasomov: 20S proteasom, timoproteasom, spermatoproteasom in imunoproteasom. Imunoproteasom se navadno izraža v celicah imunskega sistema. Ker njegov nastanek inducirajo vnetni citokini, se ob vnetju izraža tudi v drugih celicah. Povezali so ga z nastankom vnetnih, avtoimunskih in nevrodegenerativnih bolezni. Zaviralci proteasoma se že uporabljajo v terapiji malignih bolezni. V ta namen so registrirani trije zaviralci: bortezomib, karfilzomib in iksazomib. Vsi trije so neselektivni in povzročajo številne neželene učinke, zato gre razvoj v smeri iskanja selektivnih zaviralcev, predvsem na $\beta 5i$ -podenoto imunoproteasoma, ki ima kimotripsinu podobno delovanje. Ta naj bi imela glavno vlogo v razvoju bolezni.

Namen magistrske naloge je bila sinteza dipeptidnih zaviralcev z 1,2,4-oksatazolo-2-onsko »bojno glavo« (warhead). Želeli smo sintetizirati nekovalentne in kovalentne zaviralce, ki bi se selektivno vezali v kimotripsinu podobno podenoto imunoproteasoma. Prileganje načrtovanih spojin v aktivno mesto smo preverili z molekulskim sidranjem. Oksatazoloni so selektivni zaviralci $\beta 5i$ -podenote imunoproteasoma. Gre za močne elektrofile, ki se kovalentno vežejo s katalitičnim treoninom v aktivnem mestu. Zaradi interakcije tako s hidroksilno kot amsko skupino in konformacijskih sprememb v aktivnem mestu so selektivni na kimotripsinu podobno podenoto. Za začetno aminokislino sintetiziranih dipeptidov smo izbrali eno izmed štirih aminokislin: Phe in Trp, ki imata veliki aromatski stranski skupini, ter Leu in Ile z manjšima alifatskima stranskima verigama. Nanje smo vezali benziloksidkarbonilno skupino z uporabo benzil kloroformata. Karbamatna skupina nam je služila za zaščito amske skupine. V naslednjem koraku smo nanje z uporabo sklopitvenega reagenta vezali aminokislinske amide. Izbrali smo po eno izmed treh aminokislin z različno velikimi stranskimi skupinami, ki so imele karboksilno skupino spremenjeno v amid. Končni amid smo z uporabo reagenta klorokarbonilsulfenil klorida ciklizirali do 1,3,4-oksatazolo-2-ona.

Brez večjih težav smo sintetizirali 12 dipeptidov, ki smo jih načrtovali kot nekovalentne zaviralce. V naslednji stopnji smo jih želeli ciklizirati, vendar nam v uporabljenih razmerah ciklizacija ni uspela. Kovalentnih zaviralcev tako nismo uspeli sintetizirati. Sintetizirane

spojine smo tudi biokemijsko ovrednotili. Encimu smo določili rezidualno aktivnost, ki je bila v primeru naših spojin 100-odstotna. Nobena izmed sintetiziranih spojin ni zavrla β 5i-podenote.

Ključne besede: imunoproteasom, ubikvitin proteasom sistem, β 5i-podenota, dipeptidni zaviralci, 1,3,4-oksataiazol-2-on

ABSTRACT

Ubiquitin proteasome system (UPS) is the main system for degradation of proteins in eukaryotic cells. Several key cellular processes are managed through the UPS system. The standard form of the proteasome is 26S proteasome, where degradation with ubiquitin-labelled proteins takes place. In addition to this, there are many other forms of proteasomes, such as 20S proteasome, thymoproteasome, spermatoproteasome and immunoproteasome. Immunoproteasome is usually expressed in cells of the immune system. Because its formation is induced by inflammatory cytokines, it also occurs during inflammation in other cells. It was linked to the formation of inflammatory, autoimmune and neurodegenerative diseases. Proteasome inhibitors are being used in the treatment of malignancies already. There are three registered proteasome inhibitors: bortezomib, carfilzomib and ixazomib. All three are non-selective and because of this, they cause many side effects. Therefore, development is oriented in the direction of finding inhibitors selective for the β 5i-subunit of immunoproteasome. A chymotrypsin-like subunit plays a significant role in the development of the disease.

The main goal of the work for the master's thesis was the synthesis of dipeptide inhibitors with a 1,2,4-oxathiazol-2-one warhead. We wanted to synthesize non-covalent and covalent inhibitors that would selectively bind to a chymotrypsin-like subunit of immunoproteasomes. We checked binding of the designed compounds using molecular docking. Oxathiazolones have been shown to be selective inhibitors of the β 5i subunit of immunoproteasome. Oxathiazolones are strong electrophiles which covalently bind to catalytic threonine in the active site. Due to their interaction with the hydroxyl and amine group and further conformational changes in the active site, they are selective for the chymotrypsin-like subunit. We started our synthesis with four L-amino acids to which we bound benzyloxy carbonyl group using benzyl chloroformate. Two of the selected amino acids have large aromatic side groups (Phe, Trp) and other two have smaller aliphatic side

chains (Leu, Ile). The carbamate group served for protection of the amine group. We selected three different amino acids that had a carboxylic group modified into the primary amide. On protected amino acids we introduced one of this three amino acid amides using a coupling reagent. The terminal amide was used for cyclization to 1,3,4-oxathiazol-2-one using a chlorocarbonylsulfonyl chloride as reagent.

Without difficulties we synthesized twelve dipeptides, planned as non-covalent inhibitors. In the next stage we wanted to prepare cyclic derivatives, but failed. Under the used conditions cyclization failed. We failed in synthesizing of covalent inhibitors. Synthesized compounds were also biochemically evaluated, but proved inactive.

Key words: immunoproteasome, ubiquitin proteasome system, $\beta 5i$ subunit, dipeptide inhibitors, 1,3,4-oxathiazol-2-one

SEZNAM OKRAJŠAV

Ala	alanin
AK	aminokislina
ATR	oslabljena popolna odbojnost (IR spektroskopija)
br	razširjen signal (broad signal)
CD8	označevalec pripadnosti 8-citotoksične celice T
CP	proteasom
d	doublet
DMF	dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DSS	natrijev dekstran sulfat
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
ER	endoplazemski retikulum
ESI	ionizacija z elektrosprejem (masna spektrometrija)
Et₃N	trietilamin
Et₂O	dietileter
EtOAc	etilacetat
EQ	ekvivalent
E1	ubikvitin aktivirajoči encim
E2	ubikvitin konjugirajoči encim
E3	ubikvitin ligaza
Gly	glicin
GM-CSF	granulocitno-makrofagne kolonije stimulirajoči faktor
Hex	heksan
HOBt	N-hidroksibenzotriazol
HRMS	masna spektrometrija visoke ločljivosti
iCP	imunoproteasom
IFN-γ	interferon gama
IL	interlevkin
Ile	izolevcin
IR	infrardeča spektroskopija
J	sklopitvena konstanta (jedrska magnetna resonanca)
k	kvartet
Leu	levcin

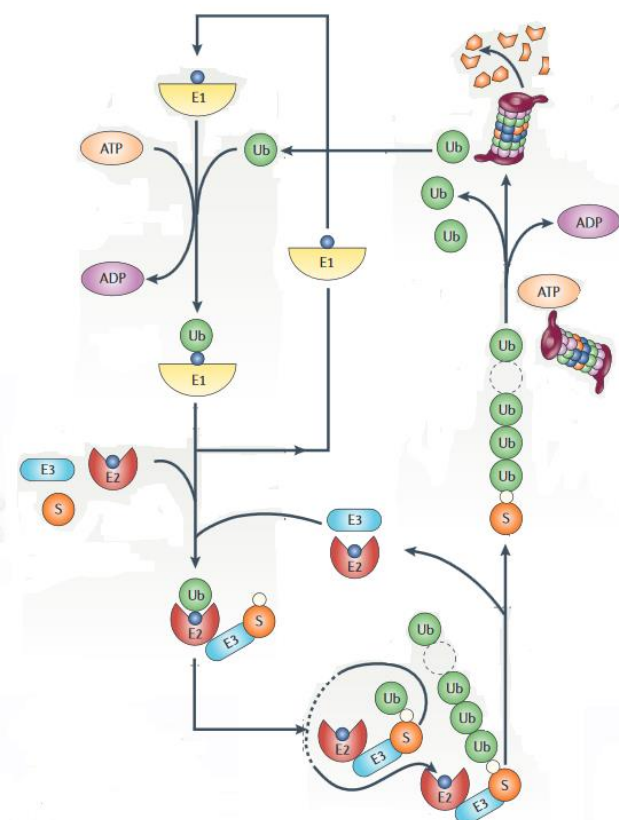
LMP7	β 5-podenota imunoproteasoma
m	multiplet
MF	mobilna faza
MHC	poglavitni kompleks tkivne skladnosti
MS	masna spektrometrija
MM	multipli mielom (diseminirani plazmocitom)
NF-κB	jedrni dejavnik κ B
NMM	<i>N</i> -metilmorfolin
NMR	jedrska magnetna resonanca
PD	farmakodinamika
Phe	fenilalanin
PK	farmakokinetika
Rf	retencijski faktor
s	singlet
TBTU	O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronijev tetrafluoroborat
THF	tetrahidrofuran
Th	T-celice pomagalke
Thr	treonin
TLC	tankoplastna kromatografija
TNF-α	tumorski dejavnik nekroze alfa
Trp	triptofan
Ub	ubikvitin
UPS	ubikvitin proteasomski sistem
ZU	zdravilna učinkovina
δ	kemijski premik (jedrska magnetna resonanca)
η	izkoristek reakcije

1. UVOD

Proteini dajejo strukturo celicam in organizmu, omogočajo gibanje, celično delitev, encimske reakcije in medcelično signaliziranje. V celicah nastajajo tudi nepravilno zviti in poškodovani proteini, ki motijo njihovo normalno delovanje. Proteini so podvrženi nenehni razgradnji in resintezi. Gre za dinamičen proces, ki je natančno reguliran. Evkariontske celice imajo dva sistema razgradnje proteinov. Nekateri proteini se razgrajujejo preko lizosomov. To so z membrano obdani mešički, ki vsebujejo različne kisle proteaze – katepsine in hidrolaze. Z lizosomi se razgrajujejo endocitirani, fagocitirani in pinocitirani proteini. Druga pot razgradnje je natančneje regulirana. To je razgradnja proteinov s proteasomom, ki večinoma poteka preko vezave molekul ubikvitina (1, 2, 3).

1.1. Sistem ubikvitin-proteasom

Razgradnja citoplazemskih, jedrnih in membranskih proteinov večinoma poteka preko



Slika 1: Shematski prikaz razgradnje proteinov s proteasomom. Najprej preko encimov E1, E2 in E3 poteče ubikvitinizacija substratov (povzeto po 13)

ubikvitin-proteasomskega sistema (UPS). Protein, namenjen za razgradnjo, je najprej označen z ubikvitinom. Ubikvitin (Ub) je polipeptid, zgrajen iz 76 AK. Vsebuje sedem lizinskih ostankov. Za proces razgradnje s proteasomom je najpomembnejši lizin-48, preko katerega se tvori poliubikvitinska veriga. Ub se najprej adenilira na C-končnem Gly, nato pa pride do premestitve in tvorbe tiolnega estra z E1 (ubikvitin aktivirajoči encim). Ub se nato premesti na E2 (ubikvitin konjugirajoči encim), kjer ponovno pride do tvorbe tioestra. Ker obstaja več vrst E2 encimov, je ta korak že bolj specifičen. E3 (ubikvitin ligaza) pripelje E2 v bližino substrata, kjer nato pride do

premestitve substrata. Obstaja več sto E3 izoencimov. E3 določa, kateri substrat se bo

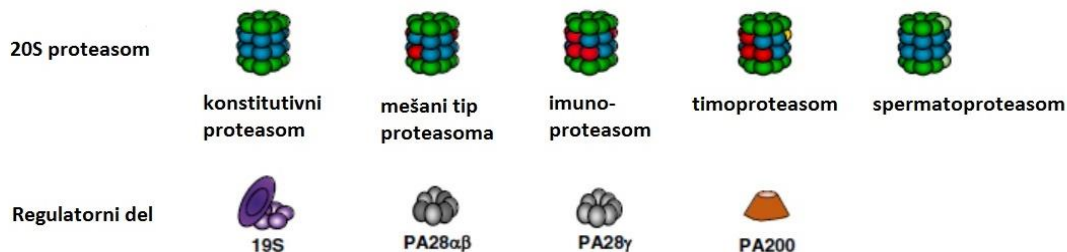
ubikvitiniral. Različne proteine prepoznajo različne E3 ligaze in se nanje vežejo, s čimer je zagotovljena specifičnost UPS sistema. V tem je tudi razlog za različno občutljivost proteinov na razgradnjo z UPS. Molekula Ub se kovalentno pripne na substrat s tvorbo amidne vezi med C-terminalnim glicinskim ostankom Ub in stransko NH₂ skupino lizina na substratu (4). Proces se večkrat ponovi, pri čemer pride do tvorbe poliubikvitinske verige. Ubikvitinizacija je reverzibilen proces in lahko poteka v obratni smeri z deubikvitinirajočimi encimi. Označen protein je prepoznan z 19S regulatornim delom 26S proteasoma, pri čemer pride do vstopa proteina v 20S jedro in njegove razgradnje.

Proteasom se izraža v jedru in citoplazmi celic. Pravilna funkcija UPS je nujna za celično rast, saj regulira mitozo preko razgradnje ciklinov, od ciklinov odvisnih kinaz in od ciklinov odvisnih zaviralcev kinaz. Prav tako je vpleten v razgradnjo transkripcijskih faktorjev, regulatornih proteinov in angiogenezo (3, 5, 6, 7).

1.2. 20S proteasom

Proteolitični del ubikvitinskega sistema je 26S proteasom (konstitutivni proteasom). Gre za multikatalitični, od ATP odvisni in okoli 2,5 MDa velik protein sodčkaste oblike. Sestavljen je iz dveh podenot, 20S jedra in 19S regulatornega dela. Pokrov proteasoma predstavljata dve 19S enoti, vsaka na svojem delu sodčka. To je regulatorni del, ki skrbi za specifičnost substratov. Gre za multifunkcijski kompleks, ki regulira delovanje proteasoma preko identifikacije substrata, vezave, deubikvitinizacije, odvitja proteinov in s premestitvijo proteinov v jedrni del proteasoma. Vsebuje mesto za vezavo ubikvitiniranih proteinov, encim, ki depolimerizira ubikvitinsko verigo, in šest ATPaz, ki razvijejo substrat in ga prenesejo v jedrni del (1,5). 20S jedro predstavlja jedrni del. Velik je 720 kDa in sestavljen iz 28 različnih podenot. Ima dva zunanja α -obročja, ki ju sestavlja po sedem α -podenot, in dva notranja β -obročja, ki ju prav tako sestavlja po sedem β -podenot. Zunanja α -obročja tvorita odprtino, skozi katero vstopi substrat. Delujeta kot vrata in z dinamično odpiranja določata hitrost ter dolžino peptidnih produktov, ki nastanejo z razgradnjo. Notranja β -obročja vsebujeta po tri katalitična mesta, ki razgrajujejo proteine. Dve β 1-podenoti imata kaspazi podobno proteolitično aktivnost in cepita vezi za kislimi ostanki, β 2 imata tripsinu podobno proteolitično aktivnost in cepita za bazičnimi ostanki in β 5 kimotripsinu podobno proteolitično aktivnost in cepita vez za hidrofobnimi ostanki. Razlike v afiniteti do različnih substratov, ki jih cepijo β -podenote, so posledica razlik v vezavnih žepih aktivnega mesta in ne samega katalitičnega mehanizma, saj v vseh poteka hidroliza na N-terminalnem

nukleofilnem treoninu (Thr). Proteasom spada med endoproteaze. Nukleofilni Thr napade karbonylni C-atom v peptidni vezi, pri čemer se tvori intermediat acil-encim. Po adiciji molekule vode le-ta razpade in sprostijo se Thr ter peptida z novim C- in N-koncem (8). Proteine cepi v majhne, 3–20 aminokislinskih ostankov velike peptide (1, 9, 10).



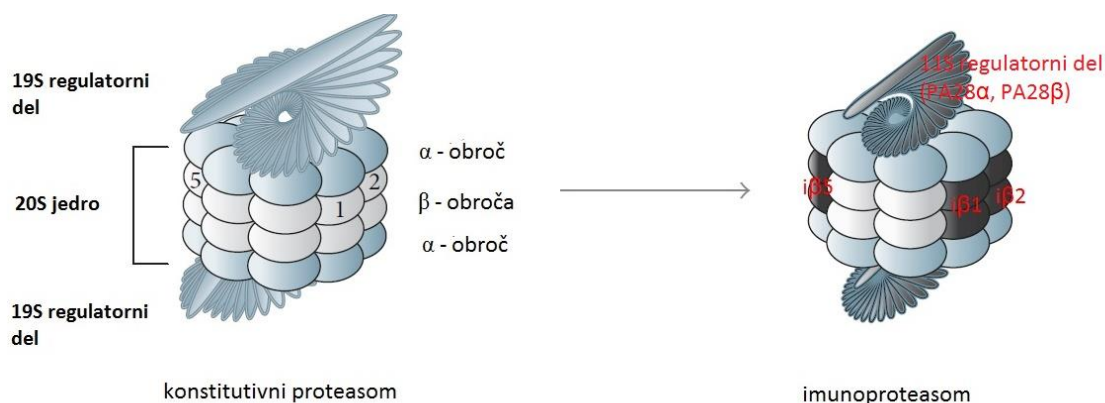
Slika 2: Različne vrste proteasomov (povzeto po 23)

Pri vretenčarjih najdemo tri glavne razrede proteasomov: timoproteasom, ki se izraža v epiteljskih celicah skorje timusa, imunoproteasom, ki se normalno izraža v monocitih in limfocitih, in konstitutivni proteasom, ki se izraža v večini ostalega tkiva (8). Med spermatogenezo nastaja spermatoproteasom, kjer pride do vgradnje drugačne α -podenote; $4\alpha s$ (11). Poleg teh se v tkivih nahaja tudi mešan tip proteasoma, kjer pride le do vgradnje $\beta 5i$ -podenote (LMP7), $\beta 1$ in $\beta 2$ pa ostaneta konstitutivni. LMP7 je edina inducibilna podenota, ki se lahko neodvisno od ostalih dveh vgradi v preproteasom ter le-ta nato tudi dozori (4, 12).

Poleg konstitutivnega proteasoma (26S) ostaja proteasom (CP) tudi v prosti obliki 20S. Kot tak nima pripetega regulatornega dela in razgrajuje proteine, poškodovane med oksidativnim stresom. Oksidacija povzroči konformacijske spremembe v proteinih, pri čemer pride do izpostavitve hidrofobnih ostankov. Zaradi tega se lahko oksidirani proteini neposredno vežejo na α -obroč CP in ga odprejo ter vstopijo v katalitično jedro. Polovica vseh proteasomov v organizmu naj bi obstajala v prosti 20S obliki (2).

Poleg 19S regulatornega dela obstajata še dva regulatorja PA200 in 11S/PA28. Prvi je prisoten le v jedru celic in verjetno sodeluje pri popraviljanju DNA. Drugi obstaja v dveh oblikah glede na to, ali je prisoten v jedru ali citoplazmi. Njegova sinteza je spodbujena z IFN- γ (2).

1.3. Imunoproteasom



Slika 3: Shematski prikaz konstitutivnega proteasoma in imunoproteasoma (povzeto po 3)

Imunoproteasom je pomemben proteolitični protein, ki skrbi za homeostazo in imunost organizma. Izhaja iz konstitutivnega proteasoma in se večinoma izraža v imunskih celicah. V teh igra pomembno vlogo, saj razgrajuje znotrajcelične proteine, kot so proteini virusnega izvora. Pri vnetju, npr. pri infekcijah ali avtoimunskih boleznih, je izražanje imunoproteasoma spodbujeno z IFN- γ in TNF- α . S tem se pet podenot proteasoma zamenja z učinkovitejšimi, v beta obroču β 1, β 2, β 5 zamenjajo β 1i, β 2i, β 5i in 19S regulatorni kompleks zamenja 11S regulatorni kompleks, sestavljen iz proteasomskega aktivatorja α in PA28 β . Spremeni in izboljša se mu proteolitična aktivnost, saj poleg ubikvitiniziranih proteinov razgrajuje tudi druge, npr. virusne proteine, oksidirane proteine (9).

Navadno do izražanja imunoproteasoma pride v celicah organov imunskega sistema. Izraža se v limfocitih, monocitih, vranici, priželjcu in dendritičnih celicah ter antigen predstavitvenih celicah ostalih organov, kot so pljuča, ledvica, jetra, debelo in tanko črevo. Zaradi stimulusa specifičnih faktorjev, kot sta TNF- α in IFN- γ , in nespecifičnih dejavnikov, kot so staranje in okoljski stresni dejavniki, lahko do izražanja pride tudi v ostalih tkivih in celicah (5). Pogosto je povečano izražanje imunoproteasoma pri vnetnih boleznih in raku (13).

1.3.1. Vloga imunoproteasoma pri boleznih

Izražanje imunoproteasoma (iCP) in vnetnih citokinov je povečano pri Alzheimerjevi bolezni, Huntingtonovi bolezni, degeneraciji rumene pege, revmatoidnem artritisu, miozitisu inkluzijskih teles, miofibrilarnih miopatijah, amiotrofični lateralni sklerozi in Crohnovi bolezni. Prav tako so koncentracije iCP podenot povečane pri malignih boleznih, kot so diseminirani plazmacitom, primarni fibrosarkom pri mačkah, rak pljuč, debelega črevesa in

prostate (8). Povečano izražanje naj ne bi bilo le posledica večjih koncentracij citokinov, ampak ima iCP vlogo tudi v razvoju in napredovanju bolezni. Imunoproteasom med vnetnim odzivom pomembno vpliva na razgradnjo poškodovanih proteinov, ki nastanejo zaradi oksidativnega stresa ali s citokini spodbujene sinteze (13).

1.3.1.1. Vloga imunoproteasoma pri infekcijah

Ob okužbah z virusi, bakterijami ali glivami pride do s citokini (IFN- $\alpha\beta\gamma$, TNF- α) spodbujenega izražanja imunoproteasoma. Do zamenjave konstitutivnega proteasoma pride v jetrnih celicah in ostalih organih, razen v možganih. Fiziološka vloga imunoproteasoma je predstavitev antigenskih peptidov na MHC razred 1 proteinih, ki jih nato prepoznajo receptorji citotoksičnih T limfocitov. Pri stimulaciji s citokini pride do povečanega izražanja MHC1 proteinov na površini celic. β 5i-podenota cepi peptidno vez za AK z velikimi alifatskimi in aromatskimi stranskimi verigami in taki substrati so najprimernejši za vezavo na MHC1. iCP večinoma razgrajuje peptide do velikosti 8–9 AK, če so daljši, jih naprej razgradijo aminopeptidaze v citoplazmi. Prenášalec TAP nato prenese peptide v endoplazemski retikulum (ER), kjer jih aminopeptidaze lahko dodatno skrajšajo. V ER se s pomočjo vezave šaperonov kalretikulina in kalneksina sestavi kompleks MHC1/b2m. Preneseni peptidi se nato vežejo na MHC1/b2m kompleks, ki se sprostí iz šaperona kalretikulina, ki je v lumnu ER in transmembranskega šaperona kalneksina, ter izstopi iz ER. Nato skozi Golgijev aparat in celično membrano pride na površino celice. Pomanjkanje imunoproteasoma v mišjih modelih je vodilo do manjše aktivacije CD8 T celic pri okužbah z virusi hepatitisa B in gripe. Zaradi drugačnih preferenc v cepljenju vezi med konstitutivnim in imunoproteasomom prvi ni vedno sposoben pripraviti epitopa, ki ga imunski sistem prepozna (M1 peptid virusa gripe in reverzna transkriptaza pri virusu HIV) (9, 12, 14).

1.3.1.2. Vnetne in avtoimunske bolezni

Vnetni citokini igrajo pomembno vlogo pri nastanku imunoproteasoma. Povečano izražanje iCP je značilno za ulcerozni kolitis, Crohnovo bolezen, vnetno črevesno bolezen in hepatitis. Pri teh boleznih je v tkivu povečano izražanje β 1i- in β 2i-podenot. Na transgenih miših so ugotovili, da se β 1i-podenota pogosteje izraža v vnetem tkivu pri z DSS povzročenem kolitisu, in da miši, ki ne morejo sintetizirati β 1i-podenote, te bolezni sploh ne razvijejo. Z zaviranjem imunoproteasoma je prišlo do zmanjšanja vnetja in manjših okvar sluznice debelega črevesa (13). Pri revmatoidnem artritisu so z zaviralci β 5i zmanjšali število avtoimunskih protiteles, nastajanje IFN- γ in IL-2 v T celicah in preprečili diferenciacijo Th1

celic. V kliničnih študijah so pri lupusu z zaviralci CP zmanjšali nastajanje IFN- α in avtoimunskih protiteles v reaktivnih plazmatkah. S tem so ustavili napredovanje bolezni. Imunoproteasom je vpleten tudi v patogenezo pri humoralni zavrnitveni reakciji, kjer pride do povečanega izražanja β 2i. Pri multipli sklerozi so z zaviralci upočasnili napredovanje bolezni (15).

Imunoproteasom je vpleten v patogenezo vnetja preko vpliva na T celice (na diferenciacijo naivnih CD4 T limfocitov v Th1 in Th17 celice), preko NF- κ B poti in sinteze vnetnih citokinov v makrofagih. Vpliv na to ima predvsem β 5i-podenota (9). Zaviranje LMP7 zmanjša diferenciacijo vnetnih T celic pomagalk (Th1 in Th17) in hkrati spodbudi proizvodnjo protivnetnih T celic. Zmanjša se proizvodnja vnetnih citokinov IL-6, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-23. Zavre tudi aktivacijo NF- κ B, s tem da zavira razgradnjo njegovega zaviralca I κ B (16).

Avtovnetne bolezni, s skupnim imenom PRAS (s proteasomom povezan avtovnetni sindrom), pa so posledica mutacije LMP7 podenote in se kažejo v zmanjšani sposobnosti iCP, da razgradi poškodovane proteine. Pri tem pride do nalaganja le-teh v proteinske agregate (11).

1.3.1.3. Rak

Zaviralci proteasoma v rakavih celicah spodbujajo apoptozo. Rakave celice so namreč metabolno aktivnejše in se aktivneje razmnožujejo. S tem proizvajajo več nenormalnih proteinov. V rakavih celicah zaviralci CP sprožijo apoptozo že pri nižjih koncentracijah kot pri normalnih celicah. Najbolj očitno je to pri raki krvnih celic, kot je diseminirani plazmacitom (14). Pri izražanju imunoproteasoma prihaja do velikih razlik pri različnih vrstah raka. Pri raku grla, vratu, glave, ledvic in kožnem raku je izražanje zmanjšano, medtem ko so pri diseminiranem plazmicitomu, raku prostate in pljučnem raku ugotovili povečano izražanje imunoproteasoma. Na splošno v rakavih celicah pride do povečanega izražanja proteasoma v primerjavi z normalnimi celicami zaradi hitre celične delitve, povečanega oksidativnega stresa in povišane koncentracije citokinov. Tako so tudi na *in vitro/in vivo* modelih potrdili, da s selektivnim zaviranjem imunoproteasoma delujemo protirakavo in s tem zmanjšamo toksičnost terapije v primerjavi z neselektivnimi zaviralci proteasoma (13). Z zaviranjem proteasoma preprečimo tudi aktivacijo NF- κ B in s tem zavremo angiogenezo. Pri nastanku raka lahko sodelujeta tudi regulatorja celičnega cikla

p53 in p27^{Kip1}. S tem, da sprožita apoptozo, delujeta protitumorno, zato z zaviranjem njune razgradnje preko proteasoma zaviramo nastanek malignih celic (7, 17,).

1.3.1.4. Bolezni centralnega živčnega sistema in staranje

Rast pričakovane življenjske dobe se kaže tudi v večji pojavnosti nevrodegenerativnih bolezni (Parkinsonova, Alzheimerjeva bolezen, prionska bolezen, demenca z Lewijevimi telesci). Nevrodegenerativne bolezni so povezane z nalaganjem napačno zvitih proteinov, iz katerih nastajajo toksični proteinski agregati (hiperfosforilirani Tau, α -sinuklein, amiloidni plaki, huntingtin). Normalna proteostaza omogoča preživetje nevronov in okvare v tem mehanizmu povzročijo bolezni. Za razliko od konstitutivnega se imunoproteasom navadno ne izraža v možganskih celicah. Študije so pokazale povečano koncentracijo imunoproteasoma pri Alzheimerjevi bolezni, Huntingtonovi bolezni in amiotrofični lateralni sklerozi. Druge študije pa so pokazale, da pri Alzheimerjevi bolezni pride do okvare ligaze E3, kar vodi v okvaro delovanja UPS sistema.

Tudi pri Huntingtonovi bolezni obstaja povezava med napredovanjem bolezni in povečanim izražanjem β 5i in β 1i. Zaradi kroničnega vnetja se s staranjem poveča koncentracija imunoproteasoma v možganskem tkivu. Imunoproteasom je namreč odgovoren za odstranjevanje zaradi oksidacije okvarjenih proteinov in ribosomskih produktov. Imel naj bi tako fiziološko kot tudi patološko vlogo v centralnem živčnem sistemu (13, 18, 19).

1.3.1.5. Vloga imunoproteasoma v neimunskih celicah

Imunoproteasom regulira diferenciacijo skeletnih mišic. Prav tako naj bi reguliral maso srčne mišice pri diabetičnih miših (zmanjšanje mase in s tem zmanjšanje funkcije). Okvara β 5i zavre adipogenezo in s tem povzroči lipodistrofijo. Imunoproteasom naj bi imel vlogo v metabolnih boleznih in boleznih endokrinega sistema. Zaznali so tudi izražanje imunoproteasoma (β 5i-podenote) v različnih pljučnih celicah (9).

1.4. Bakterijski proteasom – *Mycobacterium tuberculosis*

Prokariotski 20S proteasom ima enako strukturo kot evkariotski, le da ima bolj odprte cilindrične konce. Poleg tega ima le eno vrsto aktivne β -podenote, ki posnema kimotripsinsko aktivnost evkariotske β 5-podenote, kjer proteolitično aktivnost prav tako opravlja OH skupina N-končnega Thr. *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) povzroča tuberkulozo. Z njo je okužena tretjina svetovnega prebivalstva, pojavljajo se sevi, odporni na več antibiotikov. Problem pri običajni terapiji predstavlja predvsem mirujoča Mtb, ki se

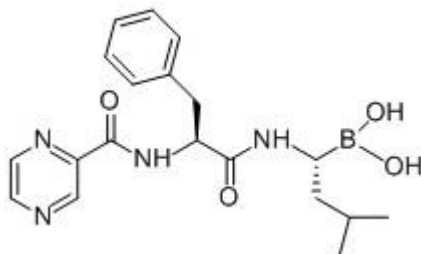
ne razmnožuje. Za mirujočo Mtb je pravilno delovanje proteasoma pomembno, saj tako lahko preživi v stresnem okolju gostitelja. Mtb spada med aktinobakterije, ki so med bakterijami edine, ki izražajo proteasom. Z njegovimi zaviralci bi dosegli selektivnost med bakterijami. 1,3,4-oksatriazol-2-oni z vezanim manjšim aromatskih delom so se izkazali za dobre selektivne zaviralce Mtb proteasoma in niso aktivni na človeškem proteasomu (20, 21).

1.5. Zaviralci proteasoma

Zaviralci proteasoma se uporabljajo v terapevtske namene in za raziskave njegove strukture in funkcije. Večina jih deluje tako na konstitutivni proteasom kot imunoproteasom. Gre za majhne peptidne molekule z elektrofilno bojno glavo na C-terminalnem koncu. Te napadejo nukleofilno hidroksilno stransko skupino Thr1 β -podenote. V fazi kliničnih preizkušanj je več zaviralcev, večina za terapijo rakov hematopoetskih celic, trije zaviralci so bili odobreni s strani FDA in EMA (13, 22). Večinoma gre za peptidne učinkovine, ki posnemajo vezavo naravnih substratov z oblikovanjem antiparalelne β verige v vezavnem mestu, kjer poteka cepitev vezi (8). Zato so tudi metabolno nestabilni in imajo nizko biološko uporabnost (23).

1.5.1. Nespecifični zaviralci proteasoma

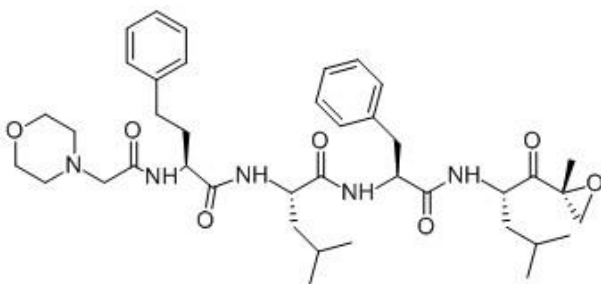
Bortezomib



Slika 4: Strukturna formula bortezomiba

Bortezomib (Velcade®, Millenium: The Takeda Oncology Company) se od leta 2003 uporablja pri terapiji diseminiranega plazmacitoma (multiplega mieloma) in limfoma plaščnih celic (22). Gre za boronski derivat dipeptida z zaviralnim delovanjem na vse tri katalitične podenote CP in iCP. Enako močno zavira β 5c-, β 5i- in β 1i-podenote. Tvori reverzibilni tetraedrski kompleks s katalitičnim Thr1 ostankom na β -OH mestu. Ima majhno moč zaviranja, zato je potrebna aplikacija v visokih odmerkih. Resni neželeni učinek, ki ga povzroča, je periferna nevropatija, ki pa naj ne bi bila posledica zaviralnega delovanja na proteasom (13, 24).

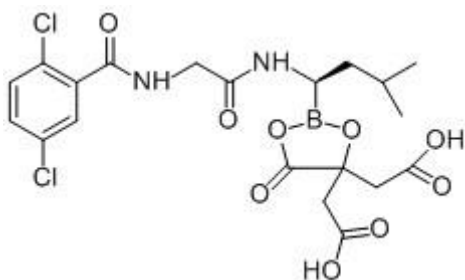
Karfilzomib



Slika 5: Strukturna formula karfilzomiba

Karfilzomib (Kyprollis®, Onyx Pharmaceuticals Inc.) je tetrapeptid z epoksiketonsko bojno glavo in je derivat epoksimicina. Proteasom zavira ireverzibilno. V mehanizmu sta vpletena tako aminska kot β -OH skupina katalitičnega Thr, ki preko dvakratnega nukleofilnega napada tvorita morfolinski obroč z epoksiketonom. Študije so pokazale, da enako močno zavira β 5- in β 5i-podenoti, na ostale katalitične podenote pa ima minimalen vpliv. Zato naj bi bilo zaviranje kimotripsinu podobne podenote dovolj za protirakavo delovanje. Gre za zelo učinkovit zaviralec proteasoma, vendar je problem pojav odpornosti, saj je znan kot substrat za P-glikoprotein. Leta 2012 je bil registriran pri FDA za uporabo pri terapiji diseminiranega plazmacitoma in drobnoceličnega pljučnega raka (9, 13).

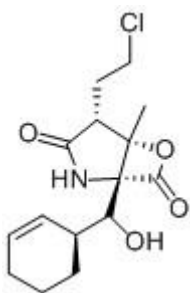
Iksazomib



Slika 6: Strukturna formula predzdravila iksazomiba

Iksazomib (Ninlaro®, Millenium: The Takeda Oncology Company) je derivat borove kisline. Od leta 2015 je registriran pri FDA in se uporablja v terapiji multiplega mieloma v kombinaciji z lenalidomidom in deksametazonom. V obliki predzdravila je peroralno uporaben. Gre za citratni ester borove kisline, ki v vodni raztopini (plazma) razpade in sprosti aktivno borovo kislino. Mehanizem delovanja je enak kot pri bortezomibu. Zaviralno deluje tako na iCP kot CP. Najmočneje zavira kimotripsinu podobno podenoto, v višjih koncentracijah pa deluje tudi na ostali dve (24, 25).

Marizomib



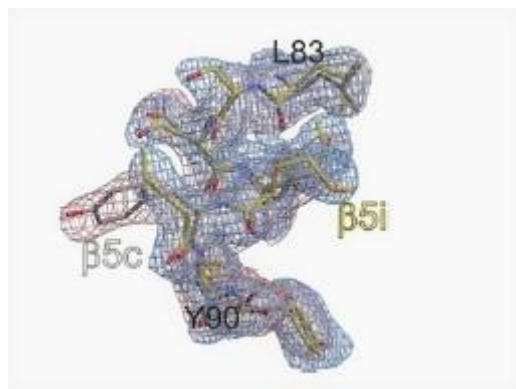
Slika 7: Strukturna formula marizomiba

Marizomib (salinosporamid A) je edini ireverzibilni nepeptidni zaviralec proteasoma v kliničnih študijah za zdravljenje multiplega mieloma, levkemije in trdnih tumorjev. Gre za sekundarni metabolit morske bakterije *Salinispora tropica*. V primerjavi z ostalimi zaviralci gre za majhno molekulo. Mehanizem delovanja vključuje β -laktonski obroč, ki s katalitičnim Thr tvori ester. Pri tem izstopi klorid in nastane ciklični eter. V mehanizmu je vključena tudi prosta amino skupina Thr, ki pozitivno vpliva na obstojnost kompleksa. Deluje na β 2- in β 5-podenoto. Zaradi visoke biološke uporabnosti (dobra absorpcija iz prebavnega trakta) je mogoča njegova aplikacija *per os*. Njegova slabost pa je kratka biološka razpolovna doba (8, 11).

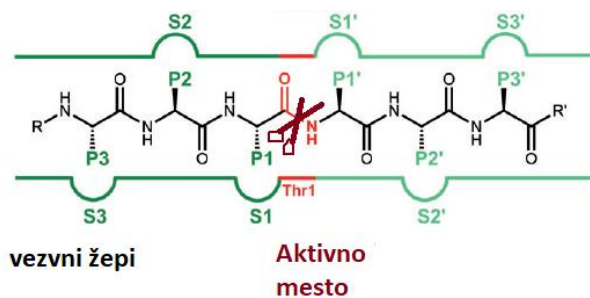
1.5.2. Selektivni zaviralci specifičnih podenot proteasoma

Vloga imunoproteasoma v številnih bolezenskih stanjih in potreba po zmanjšanju neželenih učinkov neselektivnih zaviralcev je vodila do razvoja na posamezne podenote selektivnih zaviralcev proteasoma. Večina teh spojin ima peptidno strukturo in delujejo na β 1i- ali β 5i-podenoto (13).

Pri poskusih z usmerjenimi mutacijami na β 5-podenotah v proteasomu kvasovk so odkrili, da je kimotripinu podobna aktivnost najpomembnejša za razgradnjo proteinov, tudi zaradi sposobnosti, da cepi peptidno vez za hidrofobnimi aminokislinskimi (AK) ostanki (14).



Slika 8: β 5c in β 5i podenoti (imuno) proteasoma in razlike v njihovih vezavnih žepih (povzeto po 26)



Slika 9: Aktivno mesto (povzeto po 26)

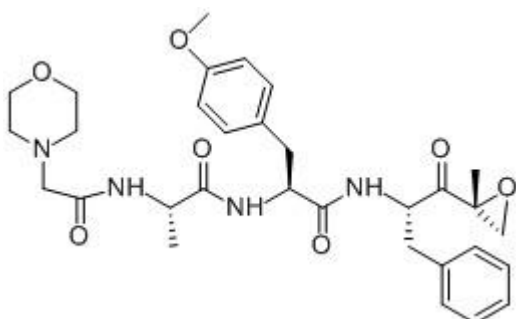
imunoproteasoma so dobro poznane. V vezavnem kanalu so na N- in C-koncu od mesta

Pri raziskovanju strukture mišjega in kvasovkinega proteasoma in imunoproteasoma so ugotovili razlike v vezavnih žepih med posameznimi podenotami, s čimer so omogočili načrtovanje selektivnih zaviralcev. Vse tri podenote proteasoma in

cepitve vezi definirani vezavni žepi S1, S2, S3, S4 ... in S1', S2', S3' ..., v katere se nato vežejo različne P stranske skupine zaviralcev (in substratov). $\beta 5i$ ima večji vezavni žep S1 kot $\beta 5c$ in zato lahko sprejme večjo P1 skupino na to mesto. S2 žep je pri njem bolj plitek. Pri S3 vezavnem žepu pa je obratno, $\beta 5i$ potrebuje na tem mestu majhne polarne ostanke. Pri $\beta 1i$ je S1 vezavni žep bolj hidrofoben kot pri $\beta 1c$, S3 žep pa je manjši in polarnejši kot pri konstitutivni podenoti. $\beta 1$ -podenoti imata manjši S1 vezavni žep kot $\beta 5$. Med $\beta 2c$ - in $\beta 2i$ -podenotama so razlike v vezavnih žepih minimalne, zato je selektivnost težko doseči (26, 27).

ONX-0914

ONX-0914 (PR-957) je tripeptidni epoksiketonski zaviralec s selektivnim delovanjem na

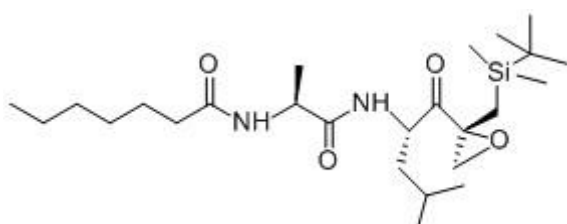


Slika 10: Strukturna formula zaviralca ONX-0914

$\beta 5i$ -podenoto. Elektrofilno glavo predstavlja epoksiketon. Kristalna struktura ONX-0914 v mišjem iCP je omogočila pojasnitev zahtev za selektivnost na $\beta 5i$ -podenoto. Za njegovo vezavo v aktivno mesto sta ključna reaktivna funkcionalna skupina in Phe na P1 mestu. Tako je za selektivnost na $\beta 5i$ potrebna aromatska

skupina na P1 in majhna bolj polarna skupina na P3. Za $\beta 5c$ -podenoto je potrebna majhna hidrofobna veriga na P1 mestu (zaradi drugačne orientacije Met45) in velika nepolarna stranska veriga na P3 mestu. Zaradi njegove selektivnosti na iCP je potencialno uporaben pri zdravljenju vnetnih in avtoimunskih bolezni in je v predkliničnih študijah pri revmatoidnem artritisu, lupusu in vnetni črevesni bolezni. Zmanjša izločanje vnetnih citokinov (IL-6, IL-23, TNF- α) in ovira diferenciacijo Th1 in Th17 celic, s čimer se zmanjša vnetje in s tem poškodba tkiva. Učinkovite terapevtske koncentracije so daleč pod maksimalnim dnevnim odmerkom in je tako učinkovitejši od etanercepta (zaviralec TNF- α) (9, 13, 15).

UK-101



Slika 11: Strukturna formula UK-101

UK-101 je močen peptidni zaviralec z epoksiketonsko bojno glavo, selektiven na $\beta 1i$ -podenoto iCP. V bistveno manjši meri zavira tudi $\beta 5c$ -podenoto. Nastal je z optimizacijo eponemicina. Za selektivnost je

pomembna linearna n-heptanojska skupina, saj se lepo prilega v hidrofobni S3 žep na stiku β 1i- in β 2i-podenot. V raziskavah se je izkazal kot učinkoviti sprožitelj apoptoze pri raku prostate, za katerega je značilno povečano izražanje β 5i-podenote (8, 15).

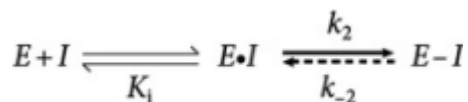
1.6. Nekovalentni zaviralci

Čeprav je večina učinkovin nekovalentnih zaviralcev, je na področju proteasoma drugače. Raziskav na tem področju je malo. Kot najučinkovitejše so se izkazale naravne makrociklične spojine (TMC-95), ki delujejo zaviralno na vse tri podenote CP, derivati statinov, ki spadajo med psevdopeptide in so selektivni na kimotripsinsko podenoto, ter substituirani psoralenski derivati, ki so prav tako selektivni na β 5. Pri večini gre za velike molekule, kar zmanjšuje njihovo biološko uporabnost. Prednost nekovalentnih zaviralcev je v tem, da so lahko bolj selektivni in stabilni. Prav elektrofilna glava kovalentnih zaviralcev lahko zaradi velike reaktivnosti reagira z drugimi encimi, kar zmanjša selektivnost in je tudi občutljivejša na kemijske pretvorbe. Manj stabilna, reverzibilna vez z encimom lahko vpliva na boljšo farmakokinetiko, saj se učinkovina ne veže popolnoma na prvo tarčo, s katero pride v stik, ampak je na razpolago tudi drugje (23, 28).

1.7. Kovalentni zaviralci

Na splošno so kovalentni zaviralci v današnjem času nezaželeni zaradi reaktivnosti in velike zmnožnosti za toksične učinke. S premišljenim načrtovanjem lahko dosežemo ustrezno varnost in učinkovitost. Kovalentni zaviralci imajo več prednosti. Zaradi velike moči inhibicije jih lahko uporabljamo v manjših dnevni odmerkih, s čimer se zmanjšajo učinki na druge tarče. Ne tekmujejo za vezavno mesto z endogenimi substrati. Zaradi neodvisnosti farmakodinamike od farmakokinetike se lahko doseže podaljšano delovanje, saj je odvisno od ponovne sinteze proteinov. Tako lahko uporabljamo tudi učinkovine s kratkim razpolovnim časom, s čimer zmanjšamo sistemsko izpostavljenost. Zmanjšamo lahko pogostost odmerjanja. Manjša je tudi verjetnost nastanka rezistence zaradi mutacije na vezavnem mestu. Dodatno lahko povečamo selektivnost z optimizacijo nekovalentnih interakcij ostalih delov molekule z aktivnim mestom. Kovalentni zaviralci so lahko majhne molekule, zaradi česar imajo boljšo biološko uporabnost. Za kovalentno vezavo je najprej potrebna nekovalentna interakcija med zaviralcem in peptidom, s čimer se elektrofilna glava dovolj približa nukleofilu v aktivnem mestu, da z njim tvori kovalentno vez (29, 30, 31).

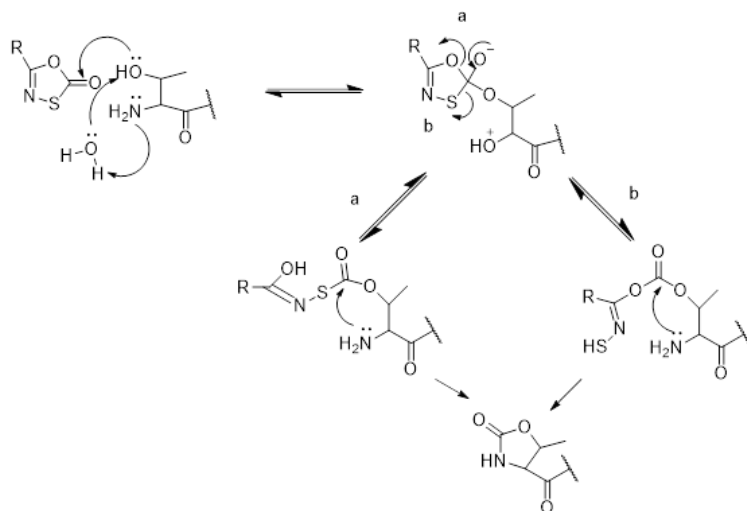
Slika 12: Med encimom in zaviralcem pride najprej do nekovalentne interakcije, nato pa nastane (ireverzibilna) kovalentna vez (povzeto po7)



Specifičnost zaviralcev proteasoma določa njihova peptidna veriga z njenimi stranskimi verigami, ki se prilegajo v vezavne žepe. Za povečanje jakosti imajo pripete različne elektrofilne glave, ki v vezavnem mestu s Thr1 tvorijo kovalentno vez. Kot uporabne bojne glave se pri zaviranju proteasoma uporabljajo aldehidi, vinil sulfoni, vinil amidi, boronska kislina, α,β -epoksiketoni, α -ketoaldehidi, β -laktoni in oksatiazoloni. Različni farmakofori tvorijo različno stabilne kovalentne vezi v aktivnem mestu. Visoka reaktivnost posameznih skupin poveča jakost zaviralcem, nekatere skupine pa poleg tega določajo tudi večjo selektivnost na posamezne katalitične β -podenote. Pri mehanizmu interakcije α,β -epoksiketonov in α -ketoaldehydov s Thr v aktivnem mestu sta vključena tako OH skupina kot prosta NH_2 , kar poveča selektivnost na treoninske proteaze (8).

1.7.1. Oksatiazoloni

Spojine z oksatiazolonom kot bojno glavo so bile odkrite kot zaviralci bakterijskega proteasoma (Mtb). Kasneje so ugotovili, da so selektivni tudi na podenoto $\beta 5i$ -imunoproteasoma, saj ima le-ta podobne sposobnosti stabilizacije nastalega kompleksa oksatiazolon-treonin kot bakterijski proteasom. Ostale podenote v okolici aktivnega mesta



Slika 13: Predlagan mehanizem kovalentne vezave oksatiazolonov s treoninom v aktivnem mestu (povzeto po 24)

nimajo primernih AK, ki bi prispevale vodikove vezi. Mehanizem vezave tako poteka v dveh korakih. Hidroksilna skupina napade oksatiazolon, pride do tvorbe intermediata (karbontioat)-encim. Tega nato napade aktivirana NH_2 skupina, kar privede do ciklične karbonilacije OH in NH_2 skupine Thr. V nadaljevanju

pride do konformacijske spremembe v aktivnem mestu, s čimer se kompleks stabilizira. Oksatiazoloni prehajajo celično membrano in znotraj celic delujejo zaviralno na CP. Poskusi

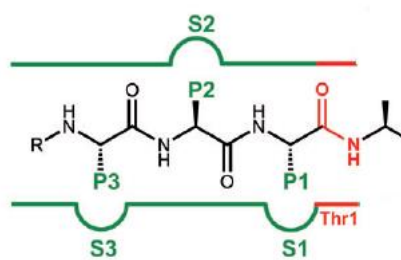
z derivati oksatiazolonov so dokazali večjo selektivnost in močnejše zaviralno delovanje na β 5i kot pri ONX-0914. Pomanjkljivost oksatiazolonskih derivatov je njihova slaba stabilnost v vodnih raztopinah, kar vpliva na njihovo *in vivo* aktivnost in uporabnost (14, 23, 32).

2. NAMEN DELA

Imunoproteasom je encim, ki je v preteklih letih zbudil veliko zanimanje raziskovalcev. Narejene so bile številne raziskave na področju vloge imunoproteasoma in proteasoma v avtoimunskih, nevrodegenerativnih, avtoimnih in rakavih boleznih ter na področju poznavanja kristalne strukture (mišji, iz *Saccharomyces cerevisiae*, *Mycobacterium tuberculosis*), s čimer so delno pojasnili vloge posameznih podenot. Vse to je spodbudilo k iskanju bolj specifičnih zaviralcev posameznih podenot imunoproteasoma. Že znani in v terapiji uporabljeni zaviralci proteasoma so nespecifični in ne razlikujejo med proteasomom in imunoproteasomom ter ne med njunimi podenotami. Da je dosežena zadostna inhibicija, je potreben vnos zaviralcev v visokih odmerkih, kar lahko povzroči pojav resnih neželenih učinkov (14). Če so ti neželeni učinki sprejemljivi pri terapijah malignih bolezni, pa niso za dolgotrajno zdravljenje avtoimunskih in nevrodegenerativnih bolezni.

Kot omenjeno že prej, so bili oksatiazoloni spoznani kot selektivni zaviralci imunoproteasomske podenote $\beta 5i$ zaradi zmožnosti ostalih aminokislin v aktivnem mestu, da stabilizirajo nastali kompleks (32). 1,3,4-oksatiazol-2-on je dober elektrofil in reagira z nukleofilno β -OH skupino katalitičnega Thr1.

Namen magistrske naloge je sintetizirati dipeptidni zaviralec $\beta 5i$ -podenote imunoproteasoma z oksatiazolonsko »bojno glavo« (warhead). Z izbiro primernih



Slika 14: Vezavni žepi v aktivnem mestu

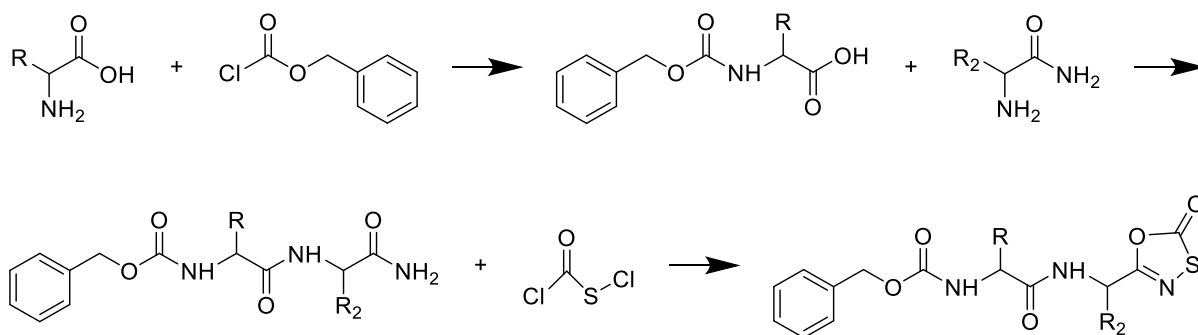
aminokislin, ki naj bi zavzele mesto v S1 in S2 žepkih aktivnega mesta, bomo sintetizirali dipeptidne zaviralce, ki se bodo najprej nekovalentno vezali v aktivno mesto imunoproteasoma, kar bo omogočilo nadaljnjo kovalentno interakcijo med oksatiazolonom in Thr1 v aktivnem mestu $\beta 5i$ -podenote.

Načrtovane spojine bomo preverili z molekularnim sidranjem v $\beta 5c$ -podenoto proteasoma. Zaradi večjih omejitev v velikosti aktivnega mesta, kot pri $\beta 5i$ -podenoti, se bodo spojine, ki se prilegajo v konstitutivno podenoto, zagotovo sidrale tudi v imunoproteasomsko podenoto.

Sintetizirane spojine, ki so načrtovane kot nekovalentni in kovalentni zaviralci, bodo na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo biokemijsko ovrednotili. Določili bodo rezidualno aktivnost encima.

Sinteza bo potekala v treh stopnjah. Za začetek sinteze smo izbrali štiri različne (levosučne) aminokislino, ki jih bomo v prvi stopnji zaščitili z benziloksikarbonilno zaščito (Cbz) naaminskem koncu. Nato bomo izvedli spajanje zaščitene aminokislino z drugo aminokislino, ki je na karboksilnem delu spremenjena v amid. Izbrali smo tri različno velike aminokislinske amide (glicinamid, alaninamid, fenilalaninamid). Končni amidni del dipeptida bo služil za mesto sinteze 1,3,4-oksataazol-2-ona. Ciklizacijo bomo izvedli z reagentom klorokarbonilsulfenil kloridom po postopku, opisanem v literaturi.

Iz štirih začetnih aminokislin, ki jim bomo pripeli tri različne aminokislinske amide, bomo dobili 12 različnih dipeptidov. Za začetne aminokislino smo izbrali različno velike hidrofobne stranske verige (aromske in razvejane alifatske), ki smo jim pripeli veliko hidrofobno benziloksikarbonilno skupino. Te naj bi zasedle mesto v S2 vezavnem žepu. Nanje smo pripeli tri različno velike aminokislinske amide, od glicin amida brez stranske verige do fenilalanina amida z veliko hidrofobno stransko verigo. Različne kombinacije aminokislinskih ostankov nam bodo omogočile, da vidimo, kaj se najboljše prilega v vezavno mesto in tako omogoči pripeti elektrofilni glavi, da se dovolj približa katalitičnemu Thr1 za kovalentno interakcijo. Peptidni del se mora namreč vezati v taki konformaciji, da se oksatazolonaska glava dovolj približa Thr1.



Slika 15: Sintezni načrt priprave dipeptida z 1,3,4-oksatazo-2-lonsko bojno glavo

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

Reagenti

Pri sintezah smo uporabljali naslednje reagente:

- L-triptofan, Sigma-Aldrich, $\geq 99,0$ %, Lot# 030M0174V,
- L-fenilalanin, Sigma-Aldrich, ≥ 98 %, Lot# BCBQ1493V,
- L-levcin, Sigma-Aldrich, ≥ 98 %, Lot# BCBQ1493V,
- L-izolevcin, Sigma-Aldrich, ≥ 98 %, Lot# SLBN6755V,
- Klorokarbonilsulfenil klorid, Acros Organics, 95 %, Lot# A0336064,
- Glicinamid hidroklorid, AK Scientific, Inc., 98 %, Lot# 9071917P,
- L-fenilalaninamid, AK Scientific, Inc., 98 % (GC), Lot# JL31331,
- L-alaninamid hidroklorid, AK Scientific, Inc. 98 % (HPLC), Lot# 60228B,
- Benzil kloroformat, Aldrich Chemistry, ≥ 98 %, Lot# STBD5229V

ter ostale reagente proizvajalcev Merck, Acros Organics, Sigma-Aldrich, TCI, Apollo Sci. in Alfa Aesar.

Topila

Pri sinteznem delu v laboratoriju smo uporabljali topila proizvajalcev Acros Organics, Fluka, Merck, Sigma-Aldrich in Panreac. Brezvodna topila (DMF, CH_2Cl_2 , CH_3CN , dioksan) smo pripravili po standardnih postopkih, brezvodni CH_2Cl_2 smo pripravili z destilacijo in jih hranili nad molekularnimi siti z velikostjo por 4 Å. Za pripravo raztopin in pri ekstrahiranjah smo uporabljali prečiščeno vodo.

Laboratorijska oprema

V laboratoriju smo uporabljali standardno laboratorijsko opremo:

- rotavaporja Büchi Rotavapor R-205 s črpalko Büchi Vac[®] V-500 in Büchi Rotavapor R-114 s črpalko Vacuubrand PC 3001,
- tehtnico Kern EG220-3NM,
- analizno tehtnico Mettler Toledo AG245,

- UV-detektor CAMAG UV-cabinet II ($\lambda = 254 \text{ nm} / 366 \text{ nm}$),
- magnetna mešala o IKA[®]RCT basic IKAMAG,
- steklovino različnih proizvajalcev.

3.2. METODE

Kromatografske metode

- Tankoplastna kromatografija (TLC)

Uporabljali smo ploščice TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem. Razvijali smo jih v različnih mobilnih fazah (različne zmesi MeOH, EtOAc, Et₂O, CH₂Cl₂, Hex, petroletra). Za detekcijo spojin na TLC ploščicah smo uporabljali UV detektor pri valovni dolžini 254 nm in orositveni reagent ninhidrin. Pri tankoplastni kromatografiji smo izračunali retencijski faktor posameznih spojin. Metodo smo uporabljali za spremljanje poteka reakcij in izolacij, prisotnosti stranskih produktov in določanje najboljše mobilne faze pri čiščenju s kolonsko kromatografijo. Zaradi potrebe po dodatnem čiščenju produkta smo uporabljali preparativni TLC, za kar smo uporabili plošče PTLC Silica gel 60 F254 (Merck) z 1mm debelim nanosom na steklenem nosilcu. Ploščo smo razvili v mobilni fazi, lise postrgali in s topilom ekstrahirali spojino s silikagela.

- Kolonska kromatografija

Uporabljali smo stacionarno fazo silikagel (Merck), Silica Gel 60 z velikostjo delcev 0,040–0,063 mm in različne mobilne faze (različne kombinacije topil MeOH, EtOAc, Et₂O CH₂Cl₂, Hex, petroleter). Steklene kolone so bile različnih premerov in dolžin. Topilo smo skozi kolono pošiljali z zračnim nadtlakom, uporabljali smo »flash« kromatografijo. Zbranim frakcijam smo mobilno fazo odparili pod znižanim tlakom. Kolonsko kromatografijo smo uporabljali za čiščenje produktov reakcij.

Spektroskopske metode

- Jedrska magnetna resonanca (NMR)

Spektre smo posneli na spektrometru Bruker Avance DPX 400 MHz na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Vzorce smo raztopili v devteriranih topilih DMSO-d₆ in

CDCl₃. Kot interni standard smo uporabili tetrametilsilan (TMS). Kemijski premiki (δ) so podani v ppm, sklopitvene konstante (J) pa v Hz.

- Masna spektrometrija (MS)

Masne spektre smo najprej posneli na spektrometru Advion expression L na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Uporabljena tehnika ionizacije je bila ESI.

Masni spektri spojin od **5** do **19** so bili nato posneti še na spektrometru Q-TOF Premier (Micromass, Waters, Manchester, Velika Britanija) v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani. Vrsta meritve je bila HRMS in uporabljena tehnika ionizacije ESI.

- Infrardeča spektroskopija (IR)

Spektre spojin smo posneli na spektrometru PerkinElmer Spectrum BX System FT-IR na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Uporabljali smo ATR («attenuated total reflectance» – oslABLJena popolna odbojnost) tehniko snemanja.

Določanje talilnega intervala

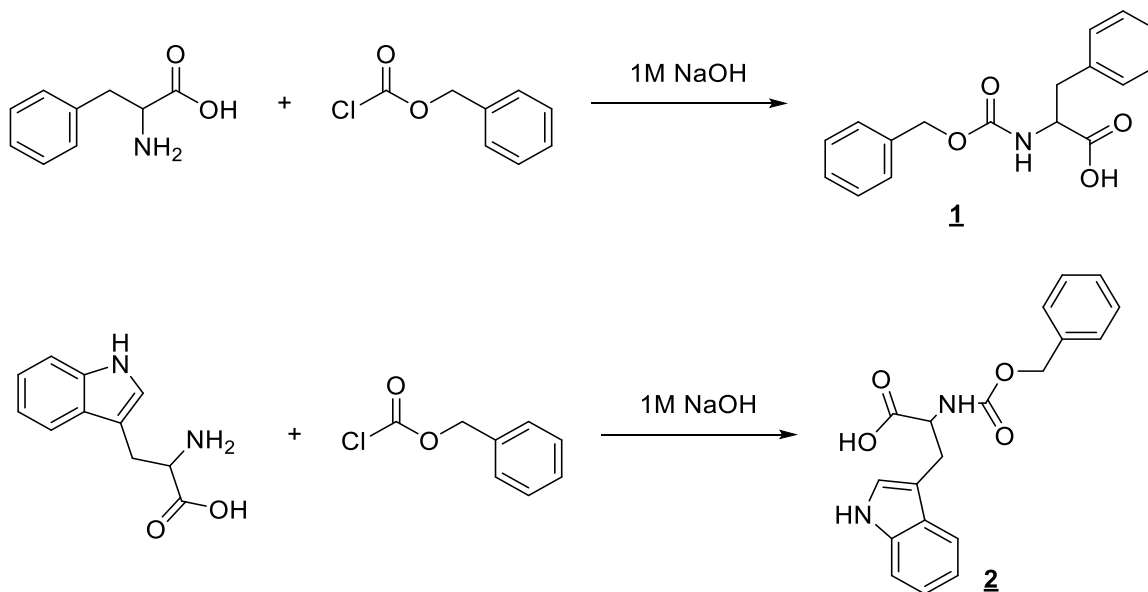
Temperaturo tališč oziroma taline intervale smo določevali na Koflerjevem talilnem mikroskopu z ogrevalno mizico Leica. Tališča so nekorigirana. Vrednosti tališč iz literature smo iskali s pomočjo podatkovne zbirke SciFinder[®].

Računalniška programska oprema

Za risanje reakcijskih shem, struktur spojin in poimenovanje spojin z IUPAC imeni smo uporabljali računalniški program ChemDraw Professional 16.0 (PerkinElmer Informatics, Inc.). Za molekulsko sidranje smo uporabili program OEDocking 3.2.0.2 (OpenEye Scientific Software, Inc.). Spektre NMR smo procesirali s programom MestRe-C 4.8.6.0 (Mestrelab Research, S.L.). Znanstvene članke smo iskali s pomočjo podatkovne zbirke SciFinder[®] in PubMed.

4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1. UVEDBA BENZIL KARBAMATNE ZAŠČITNE SKUPINE NA AMINSKO SKUPINO AMINOKISLIN



Slika 16: Zgoraj: Reakcijska shema sinteze benziloksikarbonilfenilalanina (**1**) iz fenilalanina in benzil kloroformata.

Spodaj: Reakcijska shema sinteze benziloksikarboniltriptofana (**2**) iz triptofana in benzil kloroformata.

Sinteza benziloksikarbonilfenilalanina (spojina **1):**

V 250-mililitrsko bučko smo natehtali 2,001 g (165,19 g/mol, 12,1 mmol) L-fenilalanina in ga raztopili v 20 ml 1 M NaOH (20 mmol). Bučko smo postavili na ledno kopel in s stekleno pipeto v ohlajeno raztopino dodali 2,3 ml (1,195 g/ml, 170,59 g/mol, 16,1 mmol) benzil kloroformata. Čez nekaj minut smo odstavili ledno kopel in pustili reakcijsko zmes, da se je mešala pri sobni temperaturi. Po eni uri mešanja se je zmes preveč zgostila zaradi obarjanja produkta, zato smo dodali še 10 ml topila. Potek reakcije smo preverjali vsako uro s TLC. Reakcijo smo ustavili po treh urah. Reakcijsko zmes smo prenesli v lij ločnik in ekstrahirali z Et₂O (20 ml). Organsko fazo smo zavrgli, vodno pa nakisali z 1 M HCl do pH 2. Ob dodajanju kisline je začel izpadati produkt. Vodno fazo smo nato ekstrahirali z EtOAc (3 × 50 ml). Organske faze smo združili in jih spirali z destilirano vodo (20 ml) in nasičeno raztopino NaCl (20 ml). Organsko fazo smo sušili z Na₂SO₄, sušilno sredstvo odfiltrirali in topilo odparili pod znižanim tlakom. V bučki je ostala rjavkasta oljnata tekočina.

Zaradi prisotnih nečistoč smo izvedli prekristalizacijo iz heksana. Oborila se je drobna bela oborina, ki smo jo odfiltrirali z vakumsko črpalko. Oborino smo spirali s heksanom in pustili, da se posuši na zraku.

Molekulska formula: C₁₇H₁₇NO₄

Molekulska masa: 299,33 g/mol

Videz: drobna bela amorfna oborina

Izkoristek reakcije: m = 3,051 g, η = 84,3 %

Rf: 0,46 (MF = CH₂Cl₂ : MeOH = 7 : 1)

Temperatura tališča: 79–80 °C (lit.)

MS (ESI+): m/z: 322,16 ([M+Na]⁺, 100 %)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3.189 (dk, J₁ = 5,6 Hz, J₂ = 14 Hz, 2H, PhCH₂CH), 4.729 (k, J = 4,8 Hz, 1H, CH), 5.126 (s, 2H, PhCH₂O), 7.161–7.403 (m, 11H, ArH, NH)

IR (ATR) (cm⁻¹): 3307, 3023, 2921, 1690, 1524, 1496, 1454, 1420, 1322, 1295, 1259, 1225, 1193, 1045, 1029, 1010, 986, 899, 759, 735, 694, 678, 631, 560, 510

Sinteza benziloksikarboniltriptofana (spojina 2):

Postopek je bil enak kot pri prejšnji sintezi. V bučko smo natehtali 5,058 g (204,23 g/mol, 24,8 mmol) L- triptofana in ga raztopili v 50 ml 1 M NaOH (50 mmol). Dodali smo 4,6 ml benzil kloroformata (1,195 g/ml, 170,59 g/mol, 32,2 mmol). Med mešanjem v reakcijski zmesi ni prišlo do obarjanja. Izvedli smo enak postopek izolacije in prekristalizacijo in heksana.

Molekulska formula: C₁₉H₁₈N₂O₄

Molekulska masa: 338,36 g/mol

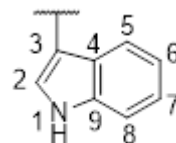
Videz: drobna rjava amorfna oborina

Izkoristek reakcije: m = 6,89 g, η = 82,2 %

Rf: 0,23 (MF = CH₂Cl₂ : MeOH = 7 : 1)

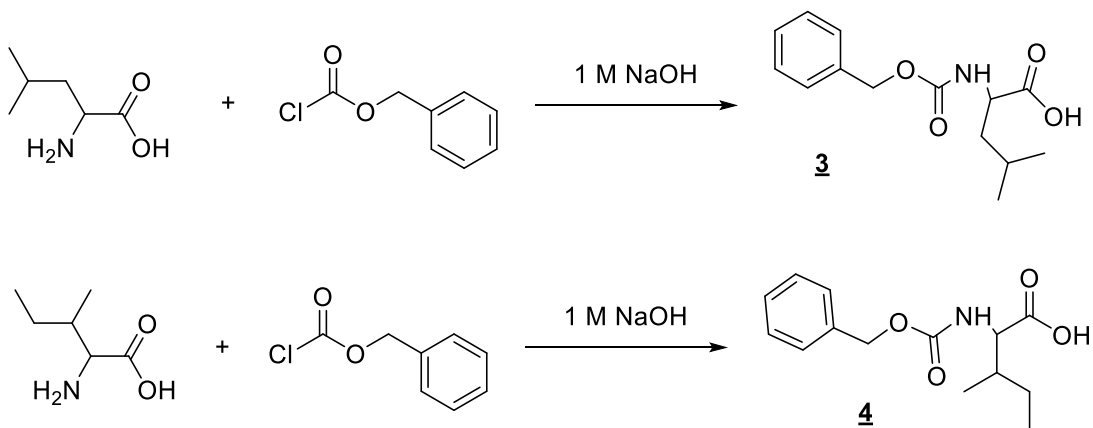
Temperatura tališča: 166–167 °C (lit.)

MS (ESI+): m/z: 361,19 ([M+Na]⁺, 100 %).



$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3), δ (ppm): 3.350–3.383 (m, 2H, CHCH_2 -indol), 4.726–4.782 (m, 1H, NHCHCOOH), 5.129 (k, $J = 10$ Hz, 2H, PhCH_2OOC), 6.979 (s, 1H, indol: H-2), 7.091–7.235 (m, 2H, indol: H-6 in H-7), 7.284–7.391 (m, 6H, ArH in indol: H-8), 7.586 (d, $J = 8$ Hz, 1H, OOCNHCH), 8.062 (s, 1H, indol: H-5)

IR (ATR) (cm^{-1}): 3432, 3318, 3042, 1736, 1697, 1663, 1538, 1457, 1421, 1250, 1229, 1214, -1192, 1145, 1071, 1045, 1013, 977, 912, 827, 738, 700, 619, 579



Slika 17: Zgoraj: Reakcijska shema sinteze beziloksikarbonillevcina (**3**) iz levcina in benzil kloroformata. Spodaj: Reakcijska shema sinteze benziloksikarbonilizolevcina (**4**) iz izolevcina in benzil kloroformata.

Sinteza beziloksikarbonillevcina in benziloksikarbonilizolevcina (spojini **3** in **4**):

V dve 250-mililitrski bučki smo posebej natehtali 5,004 g (131,17 g/mol, 38,1 mmol) levcina in 5,055 g (131,17 g/mol, 38,5 mmol) izolevcina. Izhodni spojini smo raztopili v 50 ml 1 M NaOH (50 mmol). Bučki smo postavili na ledno kopel in med mešanjem v vsako dodali 7,2 ml (1,195 g/ml, 170,59 g/mol, 50,4 mmol) benzil kloroformata. Reakcijski raztopini smo čez nekaj minut odstavili s kopeli in ju naprej mešali pri sobni temperaturi. Pri reakcijah je začela nastajati gosta bela pena. Potek reakcij smo spremljali s TLC. Reakciji smo ustavili čez en dan. Reakcijski zmesi smo posebej prenesli v lij ločnik in ekstrahirali z Et_2O (2×50 ml), organski fazi smo zavrgli, vodni fazi pa smo nakisali z 1 M HCl do pH 3. Nakisani raztopini smo ekstrahirali z EtOAc (3×60 ml). Organske faze posameznih reakcij smo združili in jih spirali z destilirano vodo (1×50 ml) in nasičeno raztopino NaCl (1×50 ml). Organski fazi smo sušili pol ure z Na_2SO_4 , odfiltrirali sušilno sredstvo in odparili topilo pod znižanim tlakom.

Reakcija ni bila uspešna, zato smo postopek ponovili.

Pri reakcijah je nastajala HCl, zato pena, ki je zniževala pH reakcijske zmesi. Zaradi prekisle reakcijske zmesi reakciji nista potekali. Ko smo ponovno nastavili reakciji, smo spremljali pH raztopin s pH lističi. Z dodajanjem 1 M NaOH smo ohranjali pH raztopin v intervalu pH 10–12.

Produkta smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = dietileter : petroleter = 1:1).

Spojina **3**:

Molekulska formula: C₁₄H₁₉NO₄

Molekulska masa: 265,31 g/mol

Videz: svetlo rjava viskozna tekočina

Izkoristek reakcije: m = 3,02 g, η = 24,9 %

Rf: 0,56 (MF = CH₂Cl₂ : MeOH = 7 : 1)

MS (ESI+): m/z: 288,32 ([M+Na]⁺, 100 %)

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 0.846–0.893 (m, 6H, CH₃CHCH₃), 1.452–1.549 (m, 2H, CH₃CH(CH₃)CH₂CH), 1.638–1.655 (m, 1H, CH₃CHCH₃), 3.953–4.011 (m, 1H, NHCHCOOH), 5.037 (s, 2H, PhCH₂OOC), 7.316–7.376 (m, 5H, ArH), 7.586 (d, J = 8,4 Hz, 1H, NH), 12.605 (br s, 1H, COOH)

IR (ATR) (cm⁻¹): 2958, 1700, 1522, 1455, 1410, 1342, 1215, 1120, 1046, 1028, 776, 735, 695, 575

Spojina **4**:

Molekulska formula: C₁₄H₁₉NO₄

Molekulska masa: 265,31 g/mol

Videz: svetlo rjava viskozna tekočina

Izkoristek reakcije: m = 2,55 g, η = 29,9 %

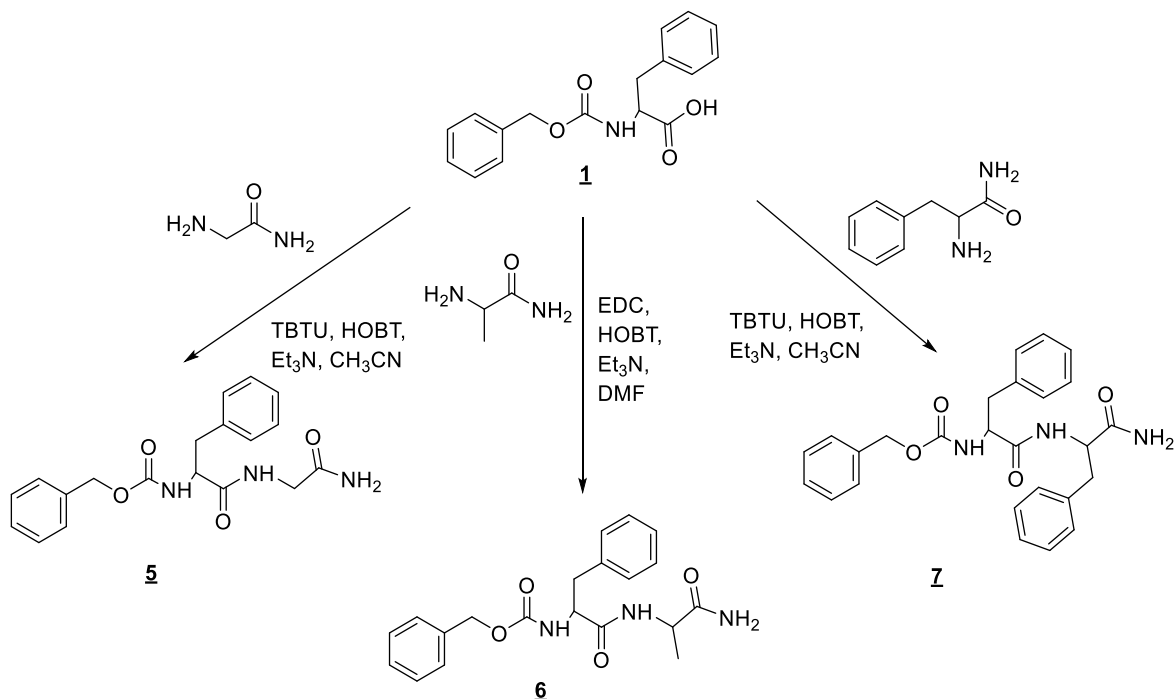
Rf: 0,60 (MF = CH₂Cl₂ : MeOH = 7 : 1)

MS (ESI+): m/z: 288,37 ([M+Na]⁺, 100 %)

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 0.815–0.879 (m, 6H, CH₃CH₂CHCH₃), 1.177–1.247(m, 1H, CH₃CH₂CHCH₃), 1.366–1.428(m, 1H, CH₃CH₂CHCH₃), 1.750–1.798 (m, 1H, CH₃CH₂CHCH₃), 3.902–3.953 (m, 1H, NHCHCOOH), 5.042 (s, 2H, PhCH₂OOC), 7.306–7.378 (m, 5H, ArH), 7.520 (d, J = 8,4 Hz, 1H, NH), 12.591(s, 1H, COOH)

IR (ATR) (cm^{-1}): 2964, 1701, 1518, 1455, 1412, 1332, 1213, 1090, 1040, 908, 775, 735, 695, 578

4.2. SKLOPITVENE REAKCIJE Z AMINOKISLINSKIMI AMIDI



Slika 18: Reakcijska shema sinteze benzil (1-((2-amino-2-oksoetil)amino)-1-okso-3-fenilpropan-2-il)karbamata (**5**) iz spojine **1** in glicinamida, benzil (1-((1-amino-1-oksopropan-2-il)amino)-1-okso-3-fenilpropan-2-il)karbamata (**6**) iz spojine **1** in L-alaninamida in benzil (1-((1-amino-1-okso-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-okso-3-fenilpropan-2-il)karbamata (**7**) iz spojine **1** in L-fenilalaninamida

Sintezna benzil (1-((1-amino-1-oksopropan-2-il)amino)-1-okso-3-fenilpropan-2-il)karbamata (spojina **6**):

V 50-mililitrsko bučko smo natehtali 0,279 g (0,93mmol) spojine **1** in 128 mg (124,57 g/mol, 1,03 mmol) L-alaninamida ter ju raztopili v 10 ml dimetilformamida. Med mešanjem pri sobni temperaturi smo dodali 197 mg (191,7 g/mol, 1,03 mmol) EDC, 139 mg (135,12 g/mol, 1,03 mmol) HOBT in s stekleno pipeto 1 ml (0,726 g/ml, 101,19 g/mol, 7,2 mmol) Et₃N. Potek smo spremljali s TLC. Reakcijsko zmes smo pri sobni temperaturi mešali 72 ur. Nato smo reakcijo ustavili in pod znižanim tlakom odparili topilo. Suh ostanek v bučki smo raztopili v 50 ml EtOAc. Raztopino smo prenesli v lij ločnik in jo ekstrahirali z 10-odstotno citronsko kislino (1 × 50 ml). Vodno fazo smo zavrgli in organsko fazo ekstrahirali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (1 × 50 ml). Organsko fazo smo spirali z destilirano vodo (1 ×

30 ml) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 30 ml). Nato smo jo pol ure sušili z Na₂SO₄, sušilno sredstvo odfiltrirali in odparili etilacetat pod znižanim tlakom.

Molekulska formula: C₂₀H₂₃N₃O₄

Molekulska masa: 369,42 g/mol

Videz: droben bel prašek

Izkoristek reakcije: m = 0,127 g, η = 36,9 %

Rf: 0,48 (MF = CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1)

Temperatura tališča: 223-224°C (lit.)

MS (ESI+): m/z = 392,57 ([M+Na]⁺, 100 %)

HRMS (ESI+): m/z za C₂₀H₂₂N₃O₄ ([M-H])⁻: izračunano 368,1610, izmerjeno 368,1610

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.231 (d, J = 7,2 Hz, 3H, CH₃), 2.668–2.723 (m, 1H, PhCH₂CH), 3.015–3.058 (m, 1H, PhCH₂CH), 4.203–4.291 (m, 2H, CH, CH), 4.942 (s, 2H, PhCH₂O), 7.035 (br s, 1H, NH₂), 7.223–7.333 (m, 11H, ArH in NH₂), 7.541 (d, J = 8,4 Hz, 1H, OCONH), 8.069 (d, J = 7,6 Hz, 1H, CONHCH)

¹³C NMR (400MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 18.02 (CH₃), 37.27 (PhCH₂), 48.04 (CHCONH₂), 56.09 (NHCHCONH), 65.18 (PhCH₂O), 126.18 (C-4'), 127.28, 127.38, 127.58, 127.97, 128.04, 128.20, 129.02, 129.06, 129.12 (Ar-C), 136.91, 137.97 (C-1 in C-1'), 155.86 (OOCNH), 171.13 (NHCHCONH), 174.23 (CONH₂)

IR (ATR) (cm⁻¹): 3375, 3285, 1690, 1668, 1645, 1529, 1497, 1453, 1287, 1258, 1230, 1140, 1040, 740, 696, 628, 609, 557, 506

Sintezna benzil (1-((2-amino-2-oksoetil)amino)-1-okso-3-fenilpropan-2-il)kabamata in benzil (1-((1-amino-1-okso-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-okso-3-fenilpropan-2-il)karbamata (spojini **5 in **7**):**

V dve posušeni dvoglavi 50-mililitrski bučki smo posamično natehtali 0,350 g (1,17 mmol) in 0,510 g (1,70 mmol) spojine **1**. V bučko za sintezo spojine **5** smo dodali 0,129 g (110,54 g/mol, 1,17 mmol) glicinamida (bučka 1). V bučko za sintezo spojine **7** pa smo dodali 0,274 g (164,2 g/mol, 1,67 mmol) L-fenilalaninamida (bučka 2). Raztopili smo jih v 25 ml brezvodnega CH₃CN, ki smo ga pred tem pripravili s sušenjem nad molekularnimi siti. Nato smo dodali 0,563 g (321,08 g/mol, 1,77 mmol) TBTU in 0,236 g (135,12 g/mol, 1,75 mmol) HOBt v bučko 1 in 0,804 g (321,08 g/mol, 2,50 mmol) TBTU in 0,338 g (135,12 g/mol, 2,50

mmol) HOBt v bučko 2. V obe bučki smo s pipeto dodali po 1 ml Et₃N. Spojine so se lepo raztopile, nastala je svetlo rumena bistra raztopina. Po približno eni uri je raztopina postala motno bela. Reakciji smo pustili potekati čez noč na oljni kopeli pri 30 °C. Reakciji smo izvajali v brezvodnih pogojih, bučko smo zaprli s septumom in prepihovali z argonom. Naslednji dan smo reakciji ustavili. Topilo smo uparili in suhi ostanek raztopili v 40 ml/60 ml EtOAc, prenesli v lij ločnik in spirali z 10-odstotno citronsko kislino (2 × 30 ml). Vodni fazi smo zavrgli, organski pa smo spirali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 × 30 ml) in nato še s prečiščeno vodo (1 × 30 ml) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 30 ml).

Organsko fazo iz bučke 1 smo sušili z Na₂SO₄, nato pa sušilno sredstvo odfiltrirali in filtratu odparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo rumeno smolo, ki je vsebovala nečistoče. Produkt smo zato očistili s kolonsko kromatografijo (MF = CH₂Cl₂ : MeOH = 15 : 1).

Med ekstrakcijo iz reakcijske zmesi bučke 2 je nastala penasta emulzija in preprečila dobro ločevanje organske in vodne faze. Po koncu se je v organski fazi začela obarjati drobna bela oborina, ki smo jo naslednji dan odfiltrirali s pomočjo vakumske črpalke. Oborino smo spirali s hladnim EtOAc in pustili, da se posuši na zraku.

Spojina **5**:

Molekulska formula: C₁₉H₂₁N₃O₄

Molekulska masa: 355,39 g/mol

Videz: droben del prašek

Izkoristek reakcije: m = 0,271 g, η = 70,8 %

Rf: 0,38 (MF = CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1)

Temperatura tališča: 217–218 °C (lit.)

MS (ESI+): m/z: 378,49 ([M+Na]⁺, 100 %)

HRMS (ESI+): m/z za C₁₉H₂₂N₃O₄ ([M+H]⁺): izračunano 356,1610, izmerjeno 356,1609

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.694–2.784 (m, 1H, PhCH₂CH), 3.049 (dd, J₁ = 4,4 Hz, J₂ = 9,6 Hz, 1H, PhCH₂CH), 3.604–3.3725 (m, 2H, NHCH₂CONH₂), 4.239–4.296 (m, 1H, NHCHCONH), 4.946 (d, J = 2,8 Hz, 2H, PhCH₂OOC), 7.117 (s, 1H, NH₂), 7.183–7.361 (m, 11H, ArH in NH₂), 7.592 (d, J = 8,4 Hz, 1H, OOCNHCH), 8.256 (t, J = 5,6 Hz, 1H, CONHCH₂CONH₂)

¹³C NMR (400MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 37.24 (PhCH₂), 41.91 (CH₂CONH₂), 56.23 (NHCHCONH), 65.24 (PhCH₂O), 126.22 (C-4'), 127.45 (C-2 in C-6), 127.68 (C-4), 128.04

(C-2' in C-6'), 128.28 (C-3' in C-5'), 129.19 (C-3 in C-5), 136.91 (C-1), 138.13 (C-1'), 155.96 (OOCNH), 170.75 (NHCHCONH), 171.69 (CONH₂)

IR (ATR) (cm⁻¹): 3288, 3061, 2361, 1690, 1644, 1530, 1496, 1454, 1286, 1257, 1135, 1042, 904,744, 694, 562, 512

Spojina **7**:

Molekulska formula: C₂₆H₂₇N₃O₄

Molekulska masa: 445,52 g/mol

Videz: droben bel prašek

Izkoristek reakcije: m = 0,502 g, η = 66,1 %

Rf: 0, 58 (MF = CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1)

Temperatura tališča: 228 °C (lit.)

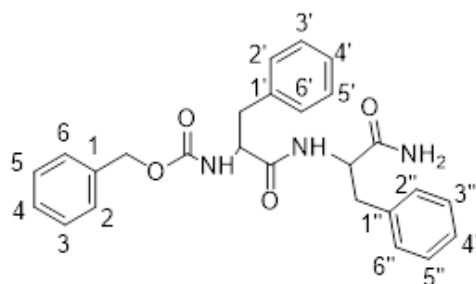
MS (ESI+): m/z = 468,56 ([M+Na]⁺, 100 %)

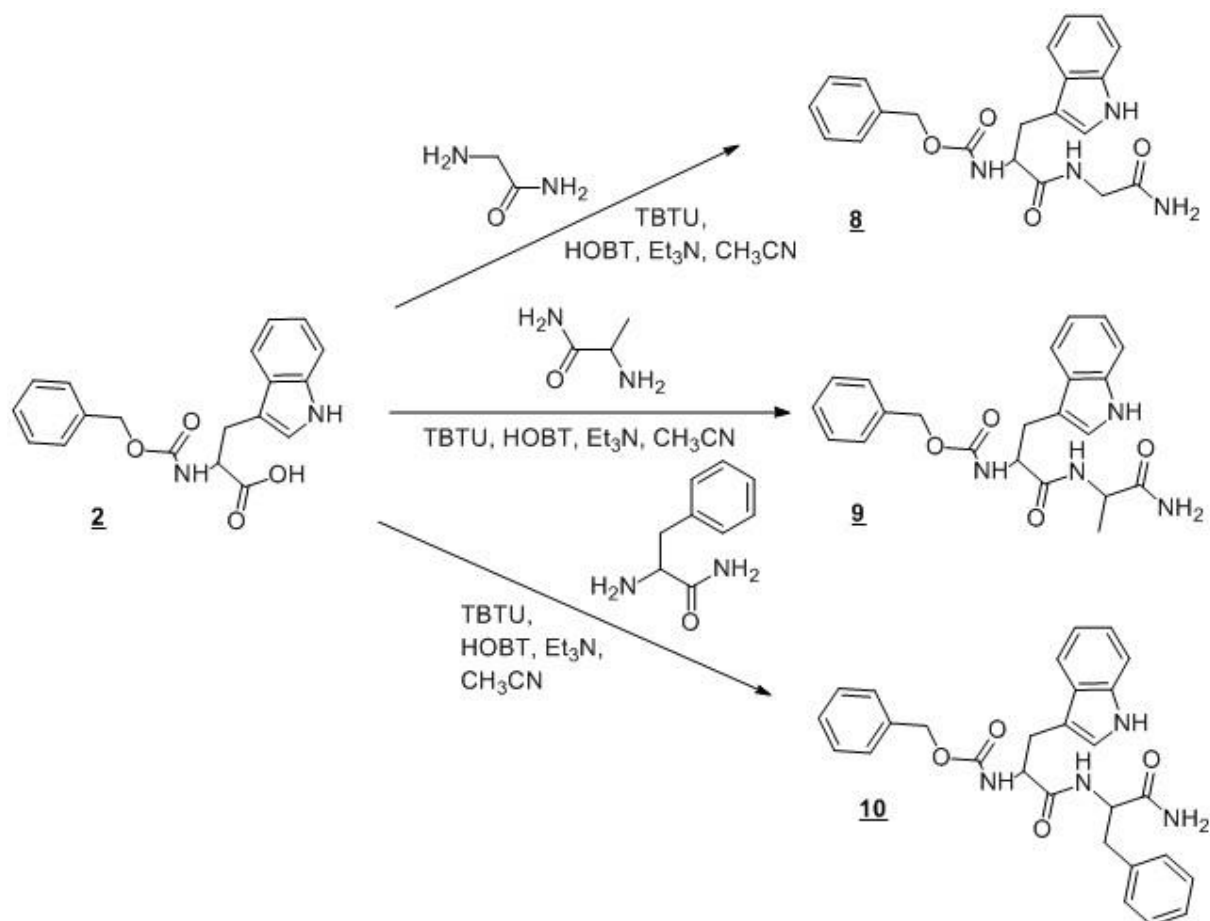
HRMS (ESI+): m/z za C₂₆H₂₈N₃O₄ ([M+H]⁺): izračunano 446,2080, izmerjeno 446,2081

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.645–2.706 (m, 1H, PhCH₂CH), 2.810–2.874 (m, 1H, PhCH₂CH), 2.924 (dd, J₁ = 4,0 Hz, J₂ = 10,0 Hz, 1H, PhCH₂CH), 3.021 (dd, J₁ = 4,8 Hz, J₂ = 8,8 Hz, 1H, PhCH₂CH), 4.197–4.256 (m, 1H, NHCHCONH₂), 4.440–4.495 (m, 1H, OOCNHCHCONH), 4.939 (s, 2H, PhCH₂OOC), 7.124 (br s, 1H, NH₂), 7.183–7.334 (m, 15H, ArH), 7.409 (br s, 1H, NH₂), 7.503 (d, J = 8,8 Hz, 1H, OOCNHCH), 8.048 (d, J = 8 Hz, 1H, CONHCHCONH₂)

¹³C NMR (400MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 37.36, 37.70 (PhCH₂), 53.72 (CHCONH₂), 56.25 (NHCHCONH), 65.18 (PhCH₂O), 126.19, 126.23 (C-4' in C-4''), 126.64, 127.36, 127.64, 128.00, 128.18, 128.27, 129.16, 129.27 (Ar-C), 136.96, 137.69, 138.04 (C-1, C-1' in C-1''), 155.71 (OOCNH), 171.18 (NHCHCONH), 172.69 (CONH₂)

IR (ATR) (cm⁻¹): 3299, 3197, 3027, 2951, 1687, 1638, 1527, 1494, 1454, 1286, 1255, 1229, 1050, 1031, 745, 695, 631, 578, 549, 527, 511





Slika 19: Reakcijska shema sinteze benzil(1-((2-amino-2-oksoetil)amino)-3-(1H-indol-3-il)-1-oksopropan-2-il)karbamata (**8**) iz spojine **2** in glicinamida, benzil (1-((1-amino-1-oksopropan-2-il)amino)-3-(1H-indol-3-il)-oksopropan-2-il)karbamata (**9**) iz spojine **2** in L-alaninamida in benzil (1-((1-amino-1-okso-3-fenilpropan-2-il)amino)-3-(1H-indol-3-il)-1-oksopropan-2-il)karbamata (**10**) iz spojine **2** in L-fenilalaninamida

Sinteza benzil(1-((2-amino-2-oksoetil)amino)-3-(1H-indol-3-il)-1-oksopropan-2-il)karbamata, benzil (1-((1-amino-1-oksopropan-2-il)amino)-3-(1H-indol-3-il)-oksopropan-2-il)karbamata in benzil (1-((1-amino-1-okso-3-fenilpropan-2-il)amino)-3-(1H-indol-3-il)-1-oksopropan-2-il)karbamata (spojine **8, **9** in **10**):**

V tri posušene in z argonom prepihane 50-mililitrske bučke smo natehtali izhodno spojino **2**, glicinamid ali L-alaninamid ali L-fenilalaninamid, TBTU in HOBT. V vsako smo dodali po 25 ml brezvodnega CH₃CN in 1 ml Et₃N (*Preglednica I*). Vsi reagenti so se lepo raztopili, reakcijske zmesi so se obarvale svetlo rumeno. Reakcije smo pustili potekati čez noč na oljni kopeli pri 30 °C.

Naslednji dan smo odparili topilo in suhi ostanek raztopili v 50 ml EtOAc, prenesli v lij ločnik in spirali z 10-odstotno citronsko kislino (2 × 30 ml). Organsko fazo smo nato spirali

z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 × 30 ml), prečiščeno vodo (1 × 30 ml) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 30 ml). Topilo smo odparlili pod znižanim tlakom.

Po sintezi spojine **9** smo s TLC analizo ugotovili, da je produkt nečist. Zato smo ga prekristalizirali iz heksana. Bučko smo postavili v hladilnik in naslednji dan oborino odfiltrirali s pomočjo vakumske črpalke. Oborino smo spirali s heksanom in pustili, da se je produkt posušil na zraku.

Pri ekstrakciji spojine **10** je pri spiranju s kislinsko fazo prišlo do nastanka emulzije, ki se je počasi ločevala. V organski fazi se je nato začel tudi obarjati produkt, zato smo jo prenesli v suho erlenmajerico in pustili, da produkt izpade. Naslednji dan smo ga odfiltrirali in pustili, da se posuši na zraku.

Preglednica I: Količine izhodne spojine in dodanih reagentov pri sintezah spojin **8–10**

Spojina 2	Amid AK	TBTU	HOBt	Produkt
0,516 g (1,53 mmol)	Glicinamid : 0,163 g (110,54 g/mol, 1,47 mmol)	0,712g (321,08 g/mol, 2,25 mmol)	0,338 g (135,12 g/mol, 2,5 mmol)	Spojina 8
0,512 g (1,51 mmol)	L-alaninamid: 0,184 g (124,57 g/mol, 1,47 mmol)	0,712g (321,08 g/mol, 2,25 mmol)	0,299 g (135,12 g/mol, 2,21 mmol)	Spojina 9
0,506 g (1,49 mmol)	L-fenilalaninamid: 0,243 g (164,2 g/mol, 1,48 mmol)	0,712g (321,08 g/mol, 2,25 mmol)	0,299 g (135,12 g/mol, 2,21 mmol)	Spojina 10

Spojina **8**:

Molekulska formula: C₂₁H₂₂N₄O₄

Molekulska masa: 394,43 g/mol

Videz: svetlo oranžen prašek

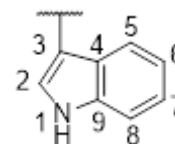
Izkoristek reakcije: m = 0,440 g, η = 73,2 %

Rf: 0,43 (MF = CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1)

Temperatura tališča: 135–136 °C (lit.)

MS (ESI+): m/z = 417,48 ([M+Na]⁺, 100 %)

HRMS (ESI+): m/z za C₂₁H₂₁N₄O₄ ([M-H]⁻): izračunano 393,1563, izmerjeno 393,1569



¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.931 (dd, $J_1 = 4,8$ Hz, $J_2 = 10,0$ Hz, 1H, CHCH₂-indol), 3.154 (dd, $J_1 = 4,4$ Hz, $J_2 = 10,4$ Hz, 1H, CHCH₂-indol), 3.612 (dd, $J_1 = 5,6$ Hz, $J_2 = 11,2$ Hz, 1H, CONHCH₂CONH₂), 3.701 (dd, $J_1 = 6,0$ Hz, $J_2 = 10,8$ Hz, 1H, CONHCH₂CONH₂), 4.259–4.314 (m, 1H, OOCNHCHCONH), 4.952 (s, 2H, PhCH₂OOC), 6.956–6.995 (m, 1H, indol: H-6), 7.047-7.087 (m, 1H, indol: H-7), 7.119 (br s, 1H, NH₂), 7.173 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, indol: H-2), 7.195 (br s, 1H, NH₂), 7.253–7.361 (m, 6H, ArH in indol: H-8), 7.500 (d, $J = 8$ Hz, 1H, indol H-5), 7.626 (d, $J = 8$ Hz, 1H, OOCNHCH), 8.276 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H, CONHCH₂CONH₂), 10.824 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H, indolni NH)

¹³C NMR (400MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 27.47 (CH₂-indol), 41.99 (CH₂CONH₂), 55.61 (NHCHCONH), 65.31 (PhCH₂O), 110.12 (C-3), 111.27 (C-8), 118.17, 118.43 (C-5 in C-6), 120.80 (C-7), 123.82 (C-2), 127.22, 127.51, 127.68, 128.29 (PhC in C-4), 136.03 (C-9), 136.85 (PhC-1), 155.97 (OOCNH), 170.82 (NHCHCONH), 172.02 (CONH₂)

IR (ATR) (cm⁻¹): 3299, 2932, 1661, 1521, 1455, 1247, 1022, 741, 696, 553

Spojina **9**:

Molekulska formula: C₂₂H₂₄N₄O₄

Molekulska masa: 408,46 g/mol

Videz: oranžno-bel prašek

Izkoristek reakcije: m = 0,389 g, η = 62,9 %

Rf: 0,42 (MF = CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1)

Temperatura tališča: 168–170 °C (lit.)

MS (ESI+): m/z = 431,5 ([M+Na]⁺, 100 %)

HRMS (ESI+): m/z za C₂₂H₂₃N₄O₄ ([M-H]⁻): izračunano 407,1719, izmerjeno 407,1718

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.222 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H, CHCH₃), 2.910 (dd, $J_1 = 4,8$ Hz, $J_2 = 10,0$ Hz, 1H, CHCH₂-indol), 3.142 (dd, $J_1 = 4,4$ Hz, $J_2 = 10,4$ Hz, 1H, CHCH₂-indol), 4.219–4.256 (m, 2H, NHCHCONH₂), 4.273–4.328 (m, 1H, NHCHCONH) 4.911–4.984 (m, 2H, PhCH₂OOC), 6.955–7.046 (m, 1H, indol: H-6), 7.049–7.067 (m, 2H, H-7 in NH₂), 7.087 (s, 1H, NH₂), 7.162–7.167 (m 1H, H-2), 7.239–7.355 (m, 6H, ArH in indol: H-8), 7.431 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, indol: H-5), 7.648 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, OOCNHCHCONH), 8.046 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, CONHCHCONH₂), 10.822 (s, 1H, indolni NH)

¹³C NMR (400MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 18.41 (CH₃), 27.64 (CH₂-indol), 48.04 (CHCONH₂), 55.53 (NHCHCONH), 65.24 (PhCH₂O), 110.14 (C-3), 111.28 (C-8), 118.19,

118.55 (C-5 in C-6), 120.84 (C-7), 123.84 (C-2), 127.26, 127.38, 127.65, 128.17, 128.29 (PhC in C-4), 136.05 (C-9), 136.93 (PhC-1), 155.87 (OOCNH), 171.42 (NHCHCONH), 174.18 (CONH₂)

IR (ATR) (cm⁻¹): 3394, 3284, 3197, 3061, 1689, 1638, 1536, 1456, 1417, 1331, 1259, 1230, 1143, 1060, 1028, 738, 684, 637, 580, 551

Spojina **10**:

Molekulska formula: C₂₈H₂₈N₄O₄

Molekulska masa: 484,56 g/mol

Videz: bela oborina

Izkoristek reakcije: m = 0,547 g, η = 75,5 %

Rf: 0,53 (MF = CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1)

Temperatura tališča: 164,5–165,5 °C

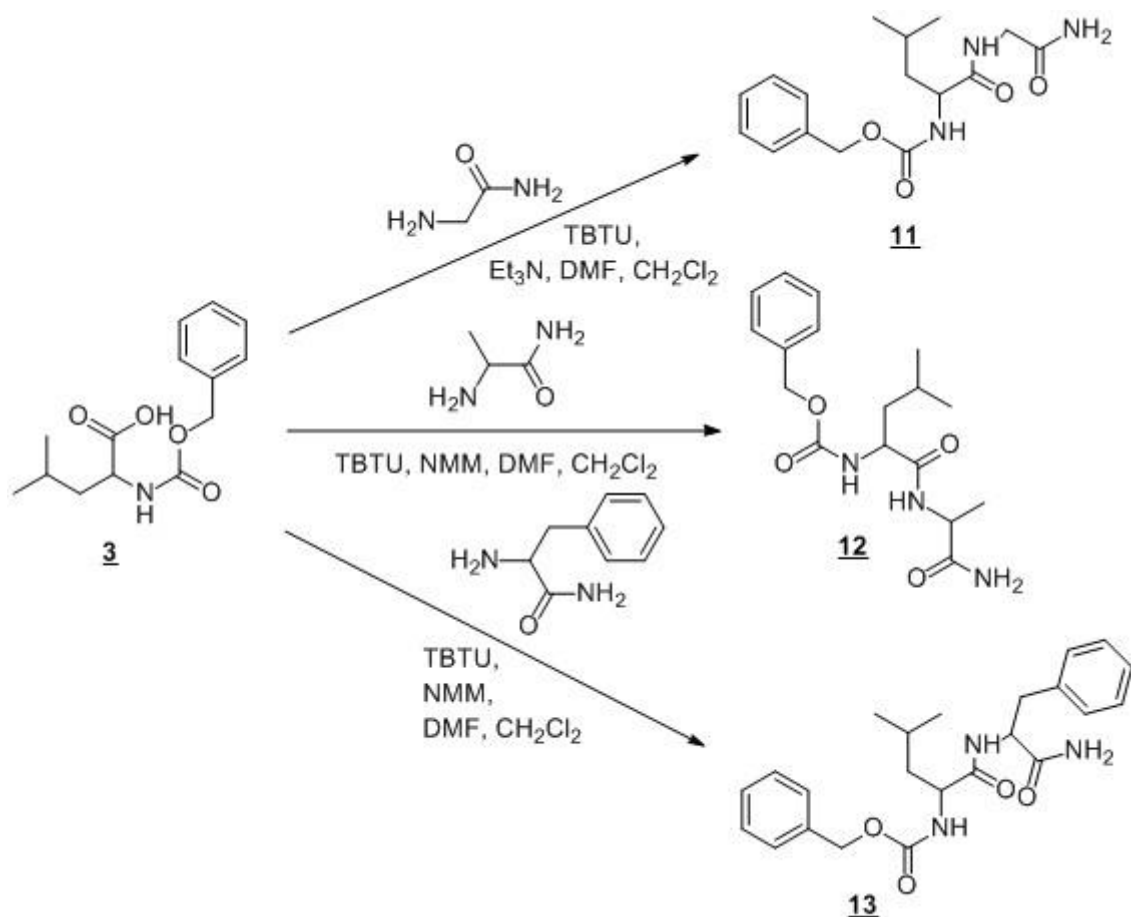
MS (ESI+): m/z = 507,6 ([M+Na]⁺, 100 %)

HRMS (ESI+): m/z za C₂₈H₂₉N₄O₄ ([M+H]⁺): izračunano 485,2189, izmerjeno 485,2177

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 2.852–3.017 (m, 4H, CHCH₂-indol in CHCH₂Ph), 4.252–4.259 (m, 1H, NHCHCONH₂), 4.483–4.497 (m, 1H, NHCHCONH), 4.943 (s, 2H, PhCH₂OOC), 6.955–6.992 (m, 1H, indol: H-6), 7.046–7.067 (m, 2H, indol: H-7 in H-2), 7.081–7.161 (m, 2H, NH₂), 7.185–7.334 (m, 11H, ArH in indol: H-8), 7.403–7.428 (m, 1H, H-5), 7.591 (d, J = 7,2 Hz, 1H, OOCNHCH), 8.015 (d, J = 8 Hz, 1H, CONHCHCONH₂), 10.808 (s, 1H, indolni NH)

¹³C NMR (400MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 27.65 (CH₂-indol), 37.67 (PhCH₂), 53.60 (CHCONH₂), 55.71 (NHCHCONH), 65.26 (PhCH₂O), 110.16, 111.28 (C-3 in C-8), 118.20, 118.41 (C-5 in C-6), 120.82 (C-7), 123.67 (C-2), 127.39, 127.99, 128.29, 129.28 (ArC in C-4), 136.03, 136.90, 137.71 (2 x PhC-1 in C-9), 155.75 (OOCHN), 171.46 (NHCHCONH), 172.71 (CONH₂)

IR (ATR) (cm⁻¹): 3420, 3326, 3265, 3034, 1685, 1654, 1634, 1528, 1494, 1453, 1443, 1299, 1281, 1271, 1258, 1236, 1096, 1035, 777, 744, 732, 695, 671, 619, 603, 574, 559, 528



Slika 20: Reakcijska shema sinteze benzil (1-((2-amino-2-oksoetil)amino)-4-metil-1-oksopentan-2-il)karbamata (**11**) iz spojine **3** in glicinamida, sinteze benzil (1-((1-amino-oksopropan-2-il)amino)-4-metil-1-oksopentan-2-il)karbamata (**12**) iz spojine **3** in L-alaninamida in benzil (1-((1-amino-okso-3-fenilpropan-2-il)amino)-4-metil-1-oksopentan-2-il)karbamata (**13**) iz spojine **3** in L-fenilalaninamida

Sinteza benzil (1-((2-amino-2-oksoetil)amino)-4-metil-1-oksopentan-2-il)karbamata, benzil (1-((1-amino-oksopropan-2-il)amino)-4-metil-1-oksopentan-2-il)karbamata in benzil (1-((1-amino-okso-3-fenilpropan-2-il)amino)-4-metil-1-oksopentan-2-il)karbamata (spojine **11, **12** in **13**):**

V tri posušene 25-mililitrske/50-mililitrske bučke smo natehtali spojino **3** in TBTU. Raztopili smo jih v 5 ml brezvodnega CH_2Cl_2 in 5 ml brezvodnega DMF, ki smo ju pred tem pripravili z destilacijo in sušenjem nad molekularnimi siti. V vsako smo s pipeto dodali bazo in pol ure mešali na oljni kopeli pri $30\text{ }^\circ\text{C}$. Nato smo dodali tudi aminokislinske amide (Preglednica II). Reakcije smo na oljni kopeli pustili potekati čez noč. Reakcije smo izvajali v brezvodnih pogojih, bučke smo prepihovali z argonom. Naslednji dan smo odparili topilo. Suha ostanka pri sintezi spojine **11** in **12** smo raztopili v 40 ml EtOAc in prenesli v lij ločnik. Nato smo spirali z 10-odstotno citronsko kislino ($2 \times 30\text{ ml}$), nasičeno raztopino NaHCO_3

(2 × 30 ml), zavrgli vodne faze in organski fazi sprali še s prečiščeno vodo (1 × 25 ml) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 25 ml). Organski fazi smo nato sušili s Na₂SO₄, sušilno sredstvo čez pol ure odfiltrirali in odparili topilo pod znižanim tlakom. Pri obeh smo dobili temno oranžno smolo. Pri prekristalizaciji iz nekaj ml EtOAc se nam je čez noč oborila zelo drobna bela oborina, ki smo jo odfiltrirali in pustili, da se posuši na zraku.

Suhi ostanek pri spojini **13** smo raztopili v CH₂Cl₂ in izvedli ekstrakcijo pod enakim postopkom kot zgoraj. Ko smo odparili topilo pod znižanim tlakom, smo dobili nečisto rumeno oborino. Zato smo jo prekristalizirali iz nekaj ml EtOAc.

Preglednica II: Količine izhodne spojine in dodanih reagentov pri sintezah spojin **11–13**

Spojina 3	Amid AK	TBTU	Baza	Produkt
1,015 g (3,83 mmol)	Glicinamid: 0,423 g (110,54 g/mol, 3,83 mmol)	1,597 g (321,08 g/mol, 4,97 mmol)	Et₃N: 1,60 ml (101,19 g/mol, 0,726 g/ml, 11,5 mmol)	Spojina 11
0,433 g (1,63 mmol)	L-alaninamid: 0,203 g (124,57 g/mol, 1,63 mmol)	0,786 g (321,08 g/mol, 2,45 mmol)	NMM: 0,72 ml (101,15 g/mol, 0,92 g/ml, 6,55 mmol)	Spojina 12
0,438 g (1,65 mmol)	L-fenilalaninamid: 0,271 g (164,2 g/mol, 1,65 mmol)	0,799 g (321,08 g/mol, 2,49 mmol)	NMM: 0,73 ml (101,15 g/mol, 0,92 g/ml, 6,64 mmol)	Spojina 13

Spojina **11**:

Molekulska formula: C₁₆H₂₃N₃O₄

Molekulska masa: 321,38 g/mol

Videz: bela oborina

Izkoristek reakcije: m = 0,364 g, η = 29,6 %

Rf: 0,34 (MF = CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1)

Temperatura tališča: 119°C

MS (ESI+): m/z = 344,46 ([M+Na]⁺, 100 %)

HRMS (ESI+): m/z za C₁₆H₂₄N₃O₄ ([M+H]⁺): izračunano 322,1767, izmerjeno 322,1760

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 0.845–0.885 (m, 6H, CH₃CHCH₃), 1.440–1.476 (m, 2H, CH₃CH(CH₃)CH₂), 1.583–1.1651 (m, 1H, CH₃CHCH₃), 3.563–3.684 (m, 2H, NHCH₂CONH₂), 3.994–4.061 (m, 1H, OOCNHCHCONH), 4.994–5.066 (m, 2H,

PhCH₂OOC), 7,094 (s, 1H, NH₂), 7.185 (s, 1H, NH₂), 7.305–7.379 (m, 5H, ArH), 7.532 (d, 1H, OOCNHCH), 8.125 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H, CONHCH₂CONH₂)

¹³C NMR (400MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 21.39 (CH₃), 22.99 (CH₃), 24.15 (CH₃CH), 40.07 (CH₃CHCH₂), 41.86 (CH₂CONH₂), 53.19 (NHCHCONH), 65.45 (PhCH₂O), 127.51, 127.69, 127.78, 128.32, 128.48 (Ar-C), 136.91 (C-1), 156.14 (OOCNH), 170.81 (NHCHCONH), 172.50 (CONH₂)

IR (ATR) (cm⁻¹): 3454, 3307, 2955, 1678, 1655, 1545, 1513, 1445, 1370, 1244, 1123, 1036, 1027, 980, 915, 750, 700, 659

Spojina **12**:

Molekulska formula: C₁₇H₂₅N₃O₄

Molekulska masa: 335,40 g/mol

Videz: bela oborina

Izkoristek reakcije: m = 0,306 g, η = 55,9 %

Rf: 0,42 (MF = CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1)

Temperatura tališča: 175-177°C (lit.)

MS (ESI+): m/z = 358,49 ([M+Na⁺], 100 %)

HRMS (ESI+): m/z za C₂₇H₂₆N₃O₄ ([M+H]⁺): izračunano 336,1923, izmerjeno 336,1918

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 0.843–0.811 (m, 6H, CH₃CHCH₃), 1.201 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H, NHCH(CH₃)CONH₂), 1.398–1.478 (m, 2H, CH₃CH(CH₃)CH₂), 1.589–1.656 (m, 1H, CH₃CHCH₃), 4.027 (k, *J* = 6,8 Hz, 1H, NHCHCONH), 4.161–4.233 (m, 1H, NHCHCONH₂), 5.030 (s, 2H, PhCH₂OOC), 7.019 (s, 1H, NH₂), 7.304–7.373 (m, 6H, ArH in NH₂), 7.487 (d, *J* = 8 Hz, 1H, OOCNHCH), 7.870 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H, CONHCHCONH₂)

¹³C NMR (400MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 18.44 (CH₃CHCONH₂), 21.29 (CH₃), 23.07 (CH₃), 24.15 (CH₃CHCH₃), 40.51 (CH₃CHCH₂), 47.81 (CHCONH₂), 53.09 (NHCHCONH), 65.33 (PhCH₂O), 127.56, 127.72, 128.32 (Ar-C), 137.02 (C-1), 155.95 (OOCNH), 171.81 (NHCHCONH), 174.04 (CONH₂)

IR (ATR) (cm⁻¹): 3323, 1674, 1637, 1527, 1454, 1416, 1363, 1281, 1254, 1235, 1048, 754, 703, 670, 638, 593, 571

Spojina **13**:

Molekulska formula: C₂₃H₂₉N₃O₄

Molekulska masa: 411,50 g/mol

Videz: bela oborina

Izkoristek reakcije: m = 0,328 g, η = 48,3 %

Rf: 0,52 (MF = CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1)

Temperatura tališča: 126–127 °C

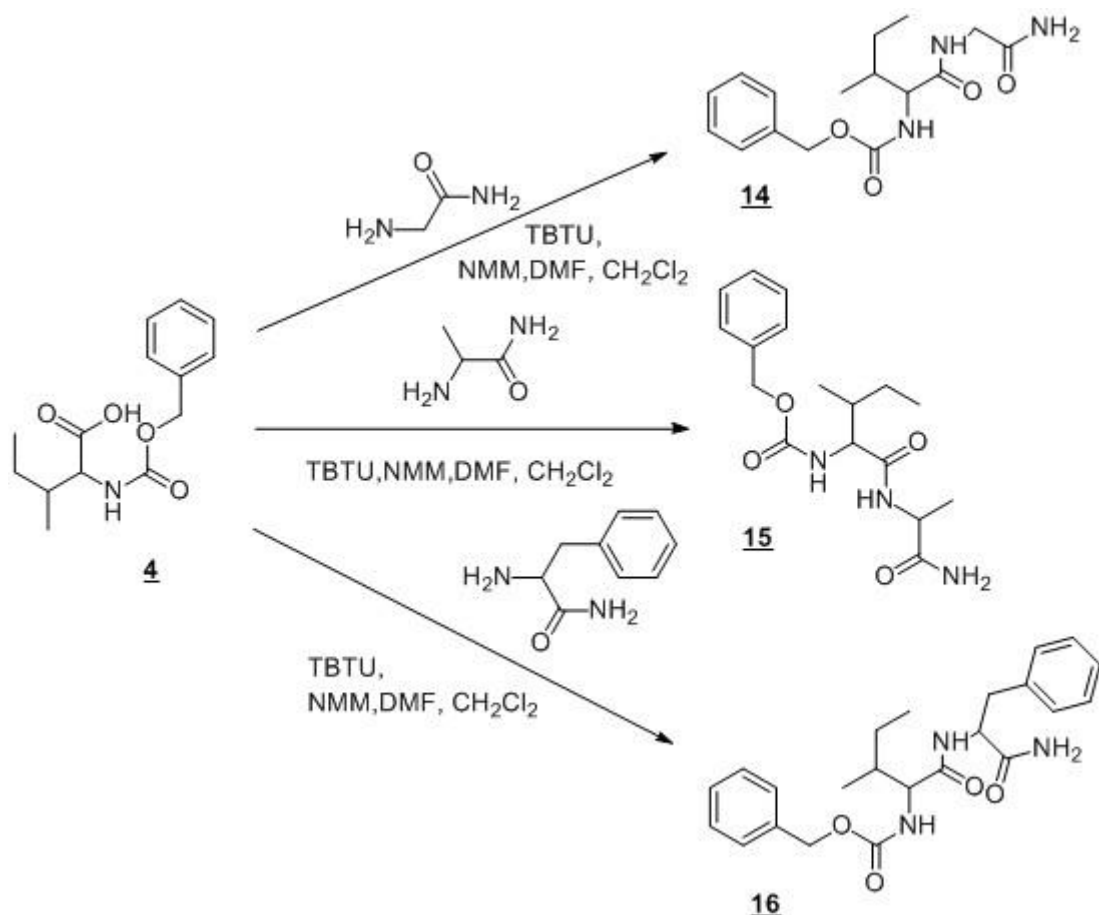
MS (ESI+): m/z = 434,65 ([M+Na]⁺, 100 %)

HRMS (ESI+): m/z za C₂₃H₃₀N₃O₄ ([M+H]⁺): izračunano 412,2236, izmerjeno 412,2232

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 0.818 (dd, J₁ = 6,8 Hz, J₂ = 7,6 Hz, 6H, CH₃CHCH₃), 1.264–1.396 (m, 2H, CH₃CH(CH₃)CH₂), 1.474–1.525 (m, 1H, CH₃CHCH₃), 2.794–2.850 (m, 1H, PhCH₂CH), 2.977–3.024 (m, 1H, PhCH₂CH), 3.940–3.999 (m, 1H, NHCHCONH), 4.420–4.476 (m, 1H, NHCHCONH₂), 5.025 (s, 2H, PhCH₂OOC), 7.112 (s, 1H, NH₂), 7.169–7.233 (m, 5H, ArH-CH₂), 7.315–7.380 (m, 5H, ArH-CH₂OOC), 7.410 (s, 1H, NH₂), 7.450 (d, J = 8 Hz, OOCNHCH), 7.831 (d, J = 8,4 Hz, CONHCHCONH₂)

¹³C NMR (400MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 21.43 (CH₃), 22.88 (CH₃), 24.07 (CH₃CH), 37.57 (PhCH₂), 40,09 (CH₃CHCH₂), 40.71 (NHCHCONH), 53.37 (CHCONH₂), 65.40 (PhCH₂O), 126.16, 127.62, 127.75, 127.93, 128.33, 129.22 (Ar-C), 136.95, 137.67 (C-1 in C-1'), 155.87 (OOCNH), 171.84 (NHCHCONH), 172.69 (CONH₂)

IR (ATR) (cm⁻¹): 3307, 1673, 1641, 1536, 1498, 1444, 1417, 1323, 1264, 1236, 1036, 722, 697, 652, 628, 586, 570, 534



Slika 21: Reakcijska shema sinteze benzil (1-((2-amino-2-oksoetil)amino)-3-metil-1-oksopentan-2-il)karbamata (**14**) iz spojine **4** in glicinamida, sinteze benzil (1-((1-amino-1-oksopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oksopentan-2-il)karbamata (**15**) iz spojine **4** in L-alaninamida in sinteze benzil (1-((1-amino-1-okso-3-fenilpropan-2-il)amino)-3-metil-1-oksopentan-2-il)karbamata (**16**) iz spojine **4** in L-fenilalaninamida

Sinteza benzil (1-((2-amino-2-oksoetil)amino)-3-metil-1-oksopentan-2-il)karbamata, benzil (1-((1-amino-1-oksopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oksopentan-2-il)karbamata in benzil (1-((1-amino-1-okso-3-fenilpropan-2-il)amino)-3-metil-1-oksopentan-2-il)karbamata (spojine **14, **15** in **16**):**

V tri posušene 50-mililitrske bučke smo natehtali spojino **4** in TBTU. Raztopili smo ju v 5 ml brezvodnega CH₂Cl₂ in 5 ml brezvodnega DMF ter s pipeto dodali bazo NMM. Pol ure smo jih mešali na oljni kopeli pri 30 °C, nato pa smo v vsako dodali ustrezní aminokislinski amid (*Preglednica III*). Bučke smo čez noč pustili na oljni kopeli. Naslednji dan smo pod znižanim tlakom odparili topilo in suhe ostanke raztopili v 40 ml EtOAc. Nato smo izvedli standardno izolacijo: 10-odstotna citronska kislina (2 × 30 ml), nasičena raztopina NaHCO₃ (2 × 30 ml), prečiščena voda (25 ml) in nasičena raztopina NaCl (25 ml). Organsko fazo smo sušili s sušilnim sredstvom in odparili topilo.

Pri ekstrakciji spojine **15** je prišlo do obarjanja produkta že pri spiranju s citrsko kislino, zato smo ločili fazi in iz organske faze odfiltrirali produkt.

Preglednica III: Količine izhodne spojine in dodanih reagentov pri sintezah spojin **14–16**

Spojina 3	Amid AK	TBTU	NMM	Produkt
0,450 g (1,7 mmol)	Glicinamid: 0,187 g (110,54 g/mol, 1,69 mmol)	0,817 g (321,08 g/mol, 2,54 mmol)	0,75 ml (101,15 g/mol, 0,92 g/ml, 6,82 mmol)	Spojina 14
0,709 g (2,67 mmol)	L-alaninamid: 0,332 g (124,57 g/mol, 2,67 mmol)	1,12 g (321,08 g/mol, 3,49 mmol)	0,88 ml (101,15 g/mol, 0,92 g/ml, 8,0 mmol)	Spojina 15
0,802 g (3,02 mmol)	L-fenilalaninamid: 0,496 g (164,2 g/mol, 3,02 mmol)	1,26 g (321,08 g/mol, 3,93 mmol)	0,99 ml (101,15 g/mol, 0,92 g/ml, 9,07 mmol)	Spojina 16

Spojina **14**:

Molekulska formula: C₁₆H₂₃N₃O₄

Molekulska masa: 321,38 g/mol

Videz: bela oborina

Izkoristek reakcije: m = 0,381 g, η = 69,9 %

Rf: 0,49 (MF = CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1)

Temperatura tališča: 167 °C

MS (ESI+): m/z = 344,54 ([M+Na]⁺, 100 %)

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 0.802–0.843 (m, 6H, CH₃CH₂CH(CH₃)), 1.079–1.180 (m, 1H, CH₃CH₂CH(CH₃)), 1.392–1.463 (m, 1H, CH₃CH₂CH(CH₃)), 1.698–1.764 (m, 1H, CH₃CH₂CH(CH₃)), 3.578–3.705 (m, 2H, NHCH₂CONH₂), 3.875 (t, J = 7,6 Hz, 1H, OOCNHCHCONH), 4.992–5.065 (m, 2H, PhCH₂OOC), 7.077 (s, 1H, NH₂), 7.196 (s, 1H, NH₂), 7.296–7.398 (m, 5H, ArH), 7.439 (d, J = 8,4 Hz, 1H, OOCNHCH), 8.148 (t, J = 5,6 Hz, 1H, CONHCH₂CONH₂)

¹³C NMR (400MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 10.94 (CH₃), 15.32 (CH₃), 24.36 (CH₂CH₃), 36.04 (CHCH₃), 41.78 (CH₂CONH₂), 65.45 (NHCHCONH), 79.17 (PhCH₂O), 127.62, 127.71, 128.47 (PhC), 136.92 (ArC-1), 156.26 (OOCNH), 170.77 (NHCHCONH), 171.49 (CONH₂)

IR (ATR) (cm⁻¹): 3315, 3286, 2962, 1673, 1637, 1541, 1454, 1422, 1318, 1279, 1265, 1237, 1216, 1138, 1039, 972, 693, 638, 600, 558

Spojina **15**:

Molekulska formula: C₁₇H₂₅N₃O₄

Molekulska masa: 335,40 g/mol

Videz: bela oborina

Izkoristek reakcije: m = 0,809 g, η = 90,3 %

Rf: 0,38 (MF = CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1)

Temperatura tališča: 201–203 °C

MS (ESI+): m/z = 358,49 ([M+Na]⁺, 100 %)

HRMS (ESI+): m/z za C₁₇H₂₆N₃O₄ ([M+H]⁺): izračunano 336,1923, izmerjeno 336,1918

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 0.783–0.842 (m, 6H, CH₃CH₂CH(CH₃)), 1.089–1.145 (m, 1H, CH₃CH₂CH(CH₃)), 1.202 (d, J = 7,2 Hz, 3H, NHCH(CH₃)CONH₂), 1.719–1.742 (m, 1H, CH₃CH₂CH(CH₃)), 3.894 (t, J = 8 Hz, 1H, OOCNHCHCONH), 4.227 (q, J = 7,2 Hz, 1H, NHCHCONH₂), 5.033 (s, 2H, PhCH₂OOC), 7.014 (s, 1H, NH₂), 7.301–7.401 (m, 7H, ArH in NH₂ in OOCNHCHCONH), 7.899 (d, J = 7,6 Hz, 1H, CONHCHCONH₂)

¹³C NMR (400MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 10.99 (CH₃), 15.34 (CH₃), 18.43 (CH₃), 24.25 (CH₃CH₂), 36.40 (CH₃CH₂CH), 47.79 (CHCONH₂), 59.16 (NHCHCONH), 65.37 (PhCH₂), 127.59 (C-2' in C-6'), 127.73 (C-4'), 128.31 (C-3' in C-5'), 137.02 (C-1'), 156.06 (OCONH), 170.65 (CONH), 173.97 (CONH₂)

IR (ATR) (cm⁻¹): 3375, 3294, 2959, 1674, 1635, 1536, 1455, 1417, 1380, 1282, 1267, 1237, 1215, 1136, 1044, 754, 695, 633, 606, 578

Spojina **16**:

Molekulska formula: C₂₃H₂₉N₃O₄

Molekulska masa: 411,50 g/mol

Videz: bela oborina

Izkoristek reakcije: m = 0,980 g, η = 78,8 %

Rf: 0,47 (MF = CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1)

Temperatura tališča: 178–180 °C

MS (ESI+): m/z = 434,65 ([M+Na]⁺, 100 %).

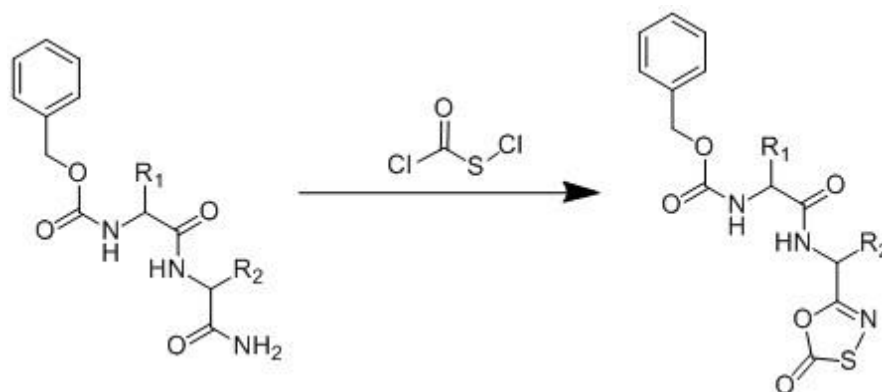
HRMS (ESI+): m/z za C₂₃H₃₀N₃O₄ ([M+H]⁺): izračunano 412,2236, izmerjeno 412,2243

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 0.670–0.761 (m, 6H, CH₃CH₂CH(CH₃)), 1.016–1.037(m, 1H, CH₃CH₂CH(CH₃)), 1.254–1.304 (m, 1H, CH₃CH₂CH(CH₃)), 1.606–1.644 (m, 1H, CH₃CH₂CH(CH₃)), 2.798–2.832 (m, 1H, PhCH₂CH), 2.968–3.004 (m, 1H, PhCH₂CH), 3.815–3.855 (m, 1H, OOCNHCHCONH), 4.470–4.521 (m, 1H, CONHCHCONH₂), 5.033 (s, 2H, PhCH₂OOC), 7.092 (s, 1H, NH₂), 7.139–7.228 (m, 5H, ArH-CH₂), 7.257–7.364 (m, 7H, ArH-CH₂OOC in NH₂ in OOCNHCHCONH), 7.910 (d, J = 8,4 Hz, 1H, CONHCHCONH₂)

¹³C NMR (400MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 10.87 (CH₃), 15.17 (CH₃), 24.15 (CH₃CH₂), 36.31 (CH₃CH), 37.65 (PhCH₂), 53.49 (NHCHCONH), 59.48 (CHCONH₂), 65.43 (PhCH₂O), 126.16, 127.65, 127.76, 127.94, 128.33, 129.17 (Ar-C), 136.97, 137.75 (C-1 in C-1'), 156.02 (OOCNH), 170.82 (NHCHCONH), 172.78 (CONH₂)

IR (ATR) (cm⁻¹): 3375, 3267, 2959, 1686, 1672, 1642, 1541, 1454, 1420, 1313, 1282, 1269, 1239, 1221, 1136, 1042, 773, 759, 744, 724, 699, 689, 651, 601, 573, 567, 547

4.3. SINTEZA OKSATIAZOLONSKEGA OBROČA



Slika 22: Splošna reakcijska shema ciklizacije

Preglednica IV: R₁ in R₂ fragmenti spojin

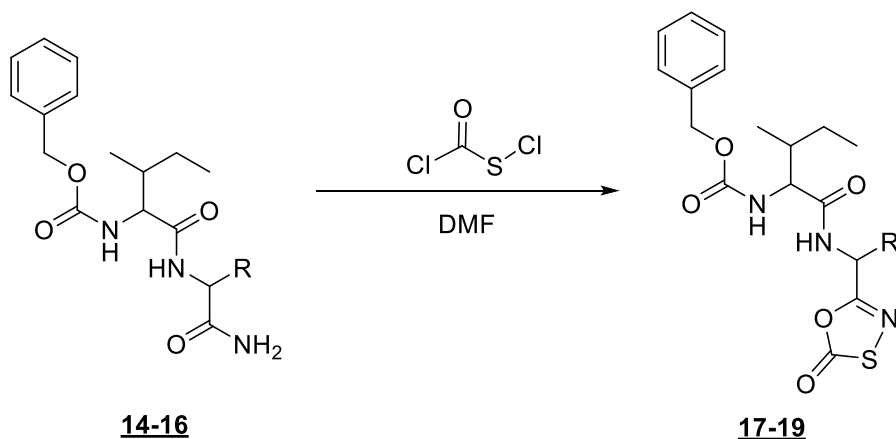
R ₁ :	R ₂ :
	-H
	-CH ₃

Splošen sintezni postopek:

V 25–mililitrsko bučko smo prenesli izhodno spojino (spojine **5-16**) in jo raztopili v 5–10 ml topila. Kot topilo smo večinoma uporabljali brezvodni DMF, pri določenih reakcijah tudi diklorometan, EtOAc in brezvodni tetrahidrofuran. Reakcijsko zmes smo segrevali na oljni kopeli pri 60 °C. Ko se je izhodna spojina raztopila, smo dodali klorokarbonilsulfenil klorid (130,98 g/mol, 1,55 g/ml). Reagent smo najprej dodajali raztopljen v 1 ml topila, nato pa po kapljicah direktno v reakcijsko zmes s stekleno brizgo (velikosti 100 µL). Dodali smo od 1,3 EQ do 2,3 EQ ClCOSCl. Reakcije smo pustili potekati 1 dan, nekatere tudi 2 dni. Večinoma smo reakcije izvajali v brezvodnih pogojih. Bučke smo prepihovali z argonom.

Po ustavitvi reakcije smo topilo odparili pod znižanim tlakom. Ostanek smo raztopili v 20 ml EtOAc in spirali z 10-odstotno citrsko kislino (pri reakcijah, kjer smo kot topilo

uporabljali DMF). Nato smo izvedli ločevanje s kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo večinoma uporabljali Hex : EtOAc = 2 : 1 in Hex : EtOAc = 1 : 1, pa tudi EtOAc : Hex = 2 : 1, in CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1.



Slika 23: Reakcijska shema sinteze spojin **17–19** iz spojin **14–16** in klorokarbonilsulfenil klorida

Sinteza spojin 17, 18 in 19:

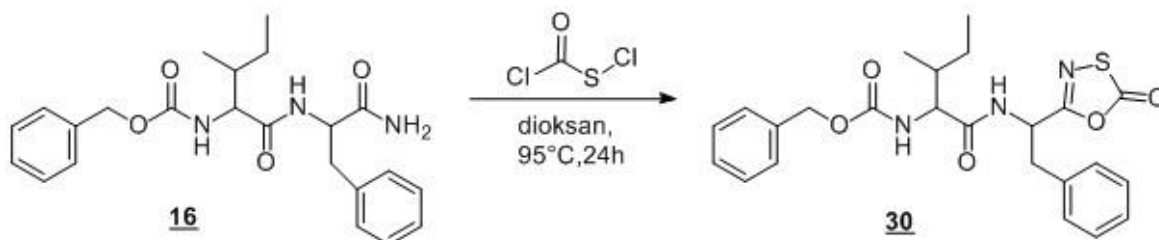
V tri posušene in z argonom prepihane 25-mililitrske bučke smo prenesli izhodne spojine (spojine **14–16**). Nato smo v vsako dodali 5 ml brezvodnega DMF. Raztopine smo na oljni kopeli segreti na 60 °C, da smo dosegli boljše raztapljanje. Kjer se izhodna raztopina še vedno ni popolnoma raztopila, smo dodali še 3 ml brezvodnega DMF. Nato smo bučke umaknili iz oljne kopeli in čez približno 15 minut dodali reagent s stekleno brizgo. Postopek smo ponovili čez pol ure. Potek reakcij smo spremljali s TLC. Čez 5–24 ur smo reakcije ustavili.

Na rotovaporju smo odparili topilo. Ostanek smo raztopili v EtOAc (20 ml), prenesli v lij ločnik in ekstrahirali z 10-odstotno citronsko kislino. Organsko fazo smo sušili s sušilnim sredstvom in ji nato odparili topilo. Dobili smo zmesi več spojin. Najprej smo poskusili s prekristalizacijo, nato pa smo izvedli čiščenje s kolonsko kromatografijo (*Preglednica V*).

R	m (izhodne spojine)	CCl ₂ OS	Čiščenje	Produkt
-H (spojina 14)	0,103 g (0,32 mmol)	2 * 1,3 EQ (130 98 g/mol, 1,552 g/ml, 0,0426 ml)	Prekristalizacija iz nekaj ml EtOAc	Spojina 17
-CH ₃ (spojina 15)	0,270 g (0,81 mmol)	2 EQ (130 98 g/mol, 1,552 g/ml, 0,1359 ml)	KK: Hex : EtOAc = 1 : 1	Spojina 18
-CH ₂ Ph (spojina 16)	0,363 g (0,89 mmol)	1 EQ + 1,3 EQ (130 98 g/mol, 1,552 g/ml, 0,0744 ml, 0,0968 ml)	KK: Hex : EtOAc = 2 : 1	Spojina 19

Po podrobnejših analizah ¹H NMR in HRMS spektrov smo ugotovili, da dobljene spojine niso naši pričakovani produkti.

Kasneje je sinteza oksatiazolonskega obroča uspela (s spojinami z drugačnimi skeletom), zato smo ponovno poskusili s ciklizacijo po spremenjenem postopku.



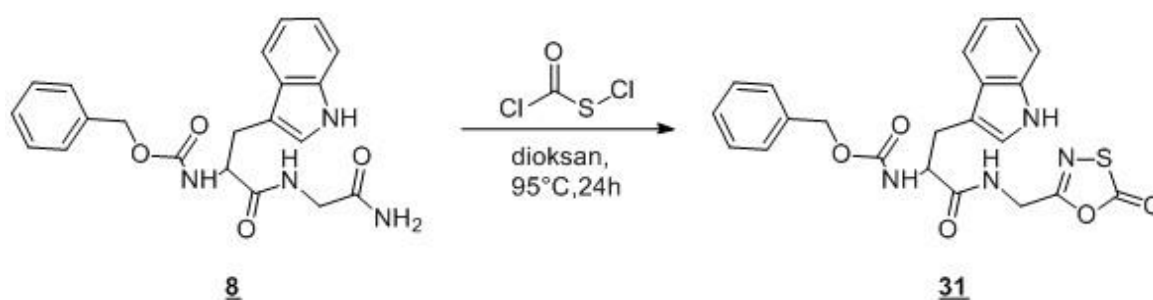
Slika 24: Reakcijska shema sinteze benzil (3-metil-1-okso-1-((1-(2-okso-1,3,4-oksatiazol-5-il)-2-fenil)etil)amino)pentan-2-il)karbamata (**30**) iz benzil (1-((1-amino-1-okso-3-fenilpropan-2-il)amino)-3-metil-1-okso-2-il)karbamata (**16**) in klorokarbonilsulfenil klorida

Sinteza spojine **30**:

V prežarjeno in z argonom preprihano 25-mililitrsko bučko smo prenesli 0,150 g (0,364 mmol) spojine **16** in jo raztopili v 10 ml brezvodnega 1,4-dioksana. Bučko smo segrevali na oljni kopeli pri 95 °C. Ko se je izhodna spojina raztopila, smo dodali 0,232 g (2,187 mmol, 105,99 g/mol) Na₂CO₃. Nato smo po kapljicah s stekleno brizgo dodali 0,092 ml (1,09 mmol, 130,98 g/mol, 1,552 g/ml) klorokarbonilsulfenil klorida. Reakcijsko zmes smo segrevali in

mešali čez noč. Naslednji dan smo dodali 0,254 ml (1,822 mmol, 101,19 g/mol, 0,726 g/ml) Et₃N. Izklopili smo segrevanje in reakcijsko zmes mešali 30 minut. Potek reakcije smo spremljali s TLC. Z vakumsko filtracijo smo odfiltrirali oborino in matičnici uparili topilo. Produkt reakcije je bila zmes več spojin, zato smo izvedli ločevanje s kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili CH₂Cl₂ : MeOH = 40 : 1. Zbranim frakcijam smo uparili topilo in jim posneli ¹H NMR. Ker so bile še vedno nečiste, smo izvedli dodatno ločevanje s pomočjo preparativne TLC ločbe.

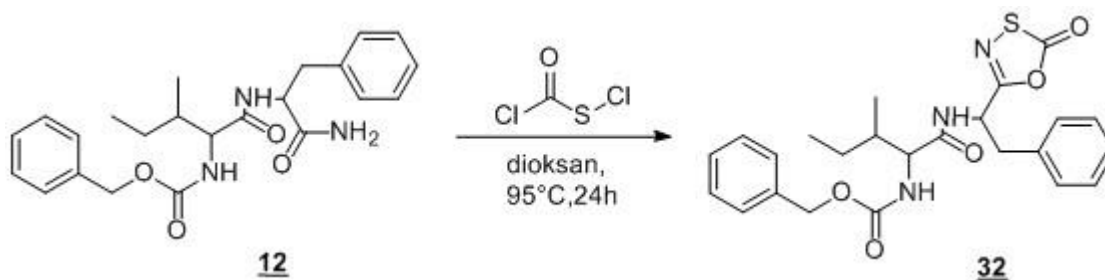
Po analizi MS in ¹H NMR spektrov smo ugotovili, da nismo dobili želene spojine.



Slika 25: Reakcijska shema sinteze benzil (3-(1H-indol-3-il)-1-okso-1-(((2-okso-1,3,4-oksatazazol-5-il)metil)amino)propan-2-il)karbamata (**31**) iz benzil (1-((2-amino-2-oksoetil)amino)-3-(1H-indol-3-il)-1-oksopropan-2-il)karbamata (**8**) in klorokarbonilsulfenil klorida

Sinteza spojine **31**:

V prežarjeno in z argonom preprihano 25-mililitrsko bučko smo prenesli 0,152 g (0,385 mmol) spojine **8** in jo raztopili v 10 ml brezvodnega 1,4-dioksana. Bučko smo segrevali na oljni kopeli pri 95 °C. Ko se je izhodna spojina raztopila, smo dodali 0,245 g (2,311 mmol, 105,99 g/mol) Na₂CO₃. Nato smo po kapljicah s stekleno brizgo dodali 0,097 ml (1,149 mmol, 130,98 g/mol, 1,552 g/ml) ClCOSCl. Reakcijsko zmes smo segrevali in mešali čez noč. Naslednji dan smo dodali 0,269 ml (1,928 mmol, 101,19 g/mol, 0,726 g/ml) Et₃N. Izklopili smo segrevanje in reakcijsko zmes mešali 30 minut. Potek reakcije smo spremljali s TLC. Z vakumsko filtracijo smo odfiltrirali oborino in matičnici uparili topilo. Naredili smo TLC. Kot pri prejšnji reakciji je bilo vidnih več neizrazitih lis podobne razporeditve. Imeli smo težave z izbiro primerne mobilne faze za kolonsko kromatografijo, zato se nismo odločili za čiščenje.

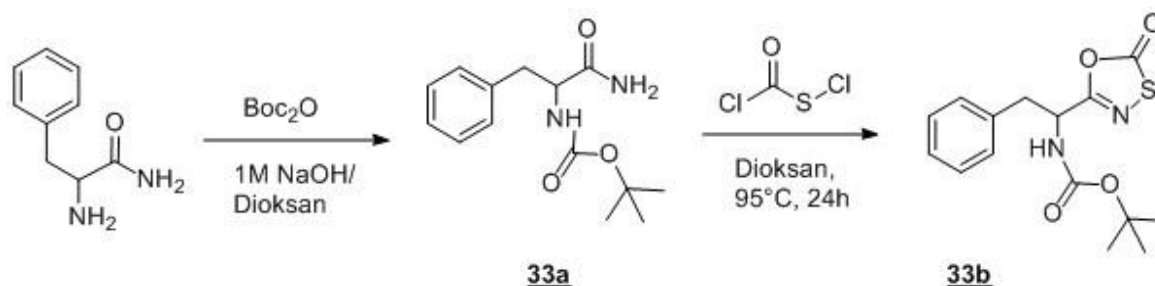


Slika 26: Reakcijska shema sinteze benzil (3-metil-1-okso-1-((1-(2-okso-1,3,4-oksatazol-5-il)-2-feniletil)amino)pentan-2-il)karbamata (**32**) iz benzil (1-((1-amino-1-okso-3-fenilpropan-2-il)amino)-3-metil-1-oksopentan-2-il)karbamata (**12**) in klorokarbonilsulfenil klorida

Sinteza spojine **32:**

V prežarjeno in z argonom prepihano 25-mililitrsko bučko smo prenesli 0,118 g (0,287 mmol) spojine **12** in jo raztopili v 10 ml brezvodnega 1,4-dioksana. Bučko smo segrevali na oljni kopeli pri 95 °C. Ko se je izhodna spojina raztopila, smo dodali 0,182 g (1,720 mmol, 105,99 g/mol) Na₂CO₃. Nato smo po kapljicah s stekleno brizgo dodali 0,073 ml (0,86 mmol, 130,98 g/mol, 1,552 g/ml) klorokarbonilsulfenil klorida. Reakcijsko zmes smo segrevali in mešali čez noč. Naslednji dan smo dodali 0,199 ml (1,43 mmol, 101,19 g/mol, 0,726 g/ml) Et₃N. Izklopili smo segrevanje in reakcijsko zmes mešali 30 minut. Potek reakcije smo spremljali s TLC. Z vakumsko filtracijo smo odfiltrirali oborino in matičnici uparili topilo. Kot pri prejšnji reakciji je bilo vidnih več neizrazitih lis s podobno porazdelitvijo. Imeli smo težave z izbiro primerne mobilne faze za kolonsko kromatografijo, zato je nismo izvedli.

Sinteza modelne spojine:



Slika 27: Reakcijska shema sinteze terc-butil (1-(2-okso-1,3,4-oksataazol-5-il)-2-feniletil) karbamata (**33b**) iz Boc zaščitenega L-fenilalaninamida (**33a**)

Sinteza Boc-fenilalanina:

V bučko smo zatehtali 0,52 g (3,17 mmol, 164,09 g/mol) L-fenilalanin amida in ga raztopili v 10 ml 0,5 M NaOH (5 mmol) in 5 ml dioksana. Bučko smo postavili na ledno kopel in mešali, dokler se ni vse raztopilo. Posebej smo raztopili 1,04 g (4,75 mmol) Boc anhidrida v 5 ml dioksana, raztopino ohladili in jo dodali v bučko. Reakcijo smo pustili potekati čez noč. Pri tem se je reakcijska zmes segrela na sobno temperaturo. Potek reakcije smo spremljali s TLC. Naslednji dan smo na rotavaporju odparili dioksan, ostanku dodali 10 ml destilirane vode in 20 ml EtOAc. Z lijem ločnikom smo ločili fazi in vodno fazo ponovno spirali z 20 ml EtOAc. Pod znižanim tlakom smo uparili topilo. Suhi ostanek smo prekrystalizirali iz heksana.

Molekulska formula: $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$

Molekulska masa: 264,15 g/mol

Videz: bela oborina

Izkoristek reakcije: $m = 0,813 \text{ g}$, $\eta = 97,1 \%$

Rf: 0,59 (MF = CH_2Cl_2 : MeOH = 9 : 1)

Temperatura tališča: 96°C

MS (ESI+): $m/z = 287,34$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 95 %), 187,12 (100 %)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.271-1.431 (m, 9H, CH_3), 3.096 (d, $J = 5,6 \text{ Hz}$, 2H, PhCH_2), 4.395-4.411 (m, 1H, NHCHCONH_2), 5.057-5.104 (m, 1H, OOCNH), 5.505 (br s, 1H, NH_2), 5.856 (br s, 1H, NH_2), 7.265-7.337 (m, ArH)

IR (ATR) (cm^{-1}): 3385, 3343, 3189, 2986, 1682, 1658, 1516, 1495, 1445, 1391, 1365, 1326, 1290, 1266, 1248, 1161, 1087, 1045, 1022, 954, 864, 850, 812, 773, 755, 735, 700, 648, 620, 565, 551, 533, 518

Sinteza spojine 33b:

V prežarjeno in z argonom preprihano bučko smo prenesli 0,25 g (0,95 mmol) Boc L-fenilalanin amida in ga raztopili v 25 ml brezvodnega dioksana. Na magnetnem mešalu smo začeli s segrevanjem na 95 °C. Ko se je izhodna spojina raztopila, smo dodali 0,41 g (3,87 mmol, 105,99 g/mol) Na_2CO_3 . Nato smo s stekleno brizgo dodali 131 μ L (1,55 mmol, 130,98 g/mol, 1,552 g/ml) $ClCOSeI$. Čez eno uro smo dodali še 65 μ L (0,78 mmol) $ClCOSeI$. Namestili smo hladilnik in reakcijsko zmes segrevali čez noč. Naslednji dan smo izključili segrevanje in dodali 0,54 ml (3,88 mmol, 101,19 g/mol, 0,726 g/ml) Et_3N . Reakcijsko zmes smo mešali 15 minut, nato pa smo z vakumsko filtracijo odfiltrirali oborino. Matičnici smo na rotavaporju uparili topilo. Produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF = CH_2Cl_2 : MeOH = 20 : 1). Srednjim frakcijam smo uparili topilo in posneli 1H NMR in MS. Po analizi spektrov smo ugotovili, da nismo dobili zelene spojine.

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. ZAŠČITA AMINO SKUPINE: Uvedba benziloksikarbonilne skupine na aminske skupine aminokislin (sinteza spojin 1–4)

Sintezo smo začeli s štirimi različnimi aminokislinami (L-fenilalanin, L-triptofan, L-levcin, L-izolevcin). Aminokislina v svoji strukturi vsebuje dve reaktivni funkcionalni skupini, amino in karboksilno skupino. V naslednjem koraku smo želeli spajati dve aminokislini in narediti dipeptid, zato smo amino skupino zaščitili v obliki benzil karbamata.

Vse štiri reakcije smo izvajali po istem postopku. Izhodne aminokislinae smo raztopili v 1 M NaOH. Vodno raztopino baze smo uporabili kot topilo, ker so aminokislinae zaradi svoje polarnosti topne v vodi, bistveno manj pa v organskih topilih. V vodnih raztopinah s pH blizu izoelektrične točke so aminokislinae v obliki iona dvojčka (zwitterion). Aminska skupina je protonirana in ima pozitiven naboj, karboksilna skupina pa je ionizirana in ima negativen naboj, vendar se naboja med seboj izničita, zato so AK na zunaj nevtralne. Prav zaradi te navidezne nevtralnosti so v vodi pri tej vrednosti pH slabše topne (topnost v g/100 ml pri 25 °C: izolevcin 4,117, levcin 2,426, fenilalanin 2,965, triptofan 1,136) (34). Dodatek baze tako poskrbi za boljšo topnost, saj aminokislinae pretvori v obliko soli ($\text{COO}^- \text{Na}^+$) samo na karboksilni skupini. Natrijev hidroksid kot baza tudi poskrbi, da je aminska skupina v deprotonirani obliki (NH_2), saj je kot taka dober nukleofil. V nevtralni vodni raztopini je v obliki NH_3^+ in ne reagira z benzil kloroformatom. Tretji razlog, zakaj potrebujemo bazo, je nastajanje HCl med reakcijo. Baza poskrbi za nevtralizacijo nastajajoče kisline, ki bi drugače ustavila reakcijo (NH_2 bi se protoniral in nastal NH_3^+).

Izhodne aminokislinae smo natehtali v bučke, dodali topilo in jih postavili na magnetno mešalo. Mešali smo pri sobni temperaturi, dokler se niso popolnoma raztopile. Pred dodatkom benzil kloroformata smo bučke postavili na ledno kopel (približno 0 °C). Dodali smo ga v presežku, da smo zagotovili zadostno količino za popolno vezavo na amin. Benzil kloroformat je kislinski klorid in zato zelo reaktiven. Karbonilni ogljik je močan elektrofil, saj ga obdajajo elektronegativni atomi, klor pa je dobra izstopajoča skupina. Benzil kloroformat smo dodajali po kapljicah in v ohlajeno reakcijsko zmes. S tem smo preprečili prenasičenje in zmanjšali kinetično energijo molekulam. Tako smo usmerili reakcijo in zmanjšali možnost nastanka stranskih produktov. Nato smo pustili, da se je reakcijska zmes počasi segrela na sobno temperaturo.

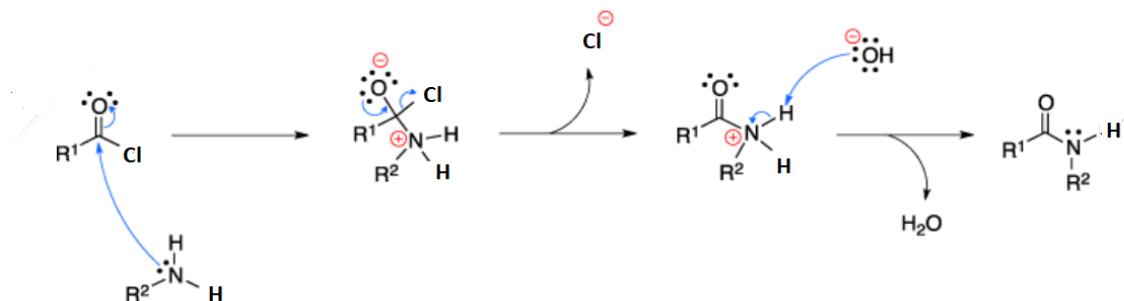
Potek reakcije smo spremljali s TLC. Za detekcijo spojine smo uporabljali UV lučko in orositveni reagent ninhidrin. L-triptofan, L-fenilalanin in benzil kloroformat vsebujejo nenasičene aromatske obročje, zato so vidne pri $\lambda = 254$ nm. Prav tako so vidni tudi produkti, saj vsi vsebujejo benzilno skupino. Vse štiri izhodne aminokisliline vsebujejo primarni amin in se zato močno barvajo z ninhidrinom. Z ninhidrinom se barvajo tudi produkti, vendar šele po segrevanju, saj mora najprej poteči hidroliza karbamata do amina. Najvišja lisa je pripadala benzil kloroformatu, izhodne aminokisliline so ostale na točki nanosa, produkt pa je zaradi disociacije COOH skupine potoval v obliki raztegnjene lise. Reakcija je potekla hitro, že po eni uri je bila vidna le še šibka lisa izhodne spojine.

Pri sintezi spojin **3** in **4** pa reakcija po treh urah skoraj ni potekla. Najprej smo domnevali, da je problem v preslabem mešanju. Nad vodno fazo se je pojavila tanka oljnata plast. Zato smo dodali dioksan in povečali hitrost mešanja. Dioksan je organsko topilo, ki se meša z vodo in ostalimi organskimi topili. Benzil kloroformat se je tako raztopil. Vendar reakcija še vedno ni potekla. Preverili smo pH in ugotovili, da je bil prenizek. Nekaj benzil kloroformata je zreagiralo z aminom in nastala HCl je nevtralizirala bazo. Amin se je protoniral in ni bil več sposoben vstopiti v reakcijo kot nukleofil. V opisanih postopkih naj bi bila za reakcijo dovolj ekvimolarna količina NaOH (baze) in benzil kloroformata, a se je to izkazalo za premajhno. Pri sintezi spojin **1** in **2** smo uporabili 1,7 EQ oziroma 2 EQ baze, pri spojinah **3** in **4** pa le 1,3 EQ. Po dodatku še 1 EQ raztopine NaOH je reakcija stekla.

Pri izolaciji smo reakcijsko zmes spirali z dietiletrom. Benzil kloroformat je topen le v organskih topilih (dietiletru, acetonu, benzenu) in netopen v vodi. Aminokisliline so topne v vodi in netopne v nepolarnih organskih topilih, kot so aceton, kloroform in dietileter. Benzil kloroformata smo se tako znebili s spiranjem z nepolarnim organskim topilom. Vodno fazo smo nakisali z 1 M HCl. S tem smo protonirali aaminsko skupino izhodne aminokisliline, karboksilna skupina pa se je v kislem deionizirala. Pri ekstrakciji z EtOAc je izhodna aminokislina ostala v vodni fazi, produkt pa je šel v organsko fazo. Organsko fazo smo spirali z nasičeno raztopino NaCl, da smo odtegnili vodo. Nato smo jo sušili z Na₂SO₄.

Pri vseh štirih spojinah smo po odparevanju topila dobili olja, v katerih so bile prisotne nečistoče. Pri spojinah **1** in **2** smo se nečistoč znebili s prekrizalizacijo iz heksana. Naša spojina je iz heksana čez noč izkristalizirala, primesi pa so ostale raztopljene. Pri spojinah **3** in **4** prekrizalizacija ni bila uspešna, zato smo morali izvesti kolonsko kromatografijo. Imeli smo težave pri izbiri mobilne faze. Poskusili smo z več mobilnimi fazami, vendar se spojine

nikjer niso lepo ločile. Na koncu smo izbrali dietileter : petroleter = 1 : 1. Spojini sta se le počasi spirali s kolone, zato ju je veliko ostalo na njej. Izkoristek reakcije po koloni je bil le okoli 30-odstoten.



Slika 28: Mehanizem Schotten-Baumannove reakcije (prirejeno po 35)

Reakcija poteka po mehanizmu Schotten-Baumannove acilacije. Gre za reakcijo kondenzacije. Amino skupina je dober nukleofil, ki napade elektrofilni karbonylni ogljikov atom, ki ima vezane elektronegativne atome (kisika in klor) in zato čuti velik primanjkljaj elektronov. Klor je zelo dobra izstopajoča skupina. Pride do cepitve vezi in izstopa klora iz molekule.

Produkt je ester karbamske kisline, ki je stabilen zaradi sterične oviranosti. Benzil karbamatno zaščito smo izbrali tudi zaradi njenih lastnosti. Stabilna je v vodnih raztopinah kislin in proti elektrofilom. Gre za uvedbo velikega, hidrofobnega fragmenta.

5.1.1. Zaščita amino skupine: uvedba *t*-butiloksikarbonilne skupine na aminske skupino *L*-fenilalanin amida (sinteza spojine 33a)

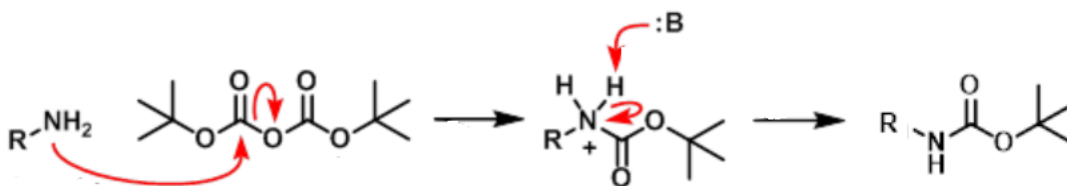
L-fenilalanin amid smo izbrali kot modelno spojino, s katero smo nameravali izvesti ciklizacijo s klorokarbonilsulfenil kloridom. Za zaščito amino skupine smo tokrat izbrali *t*-butil karbamatno zaščitno skupino, ki se veliko uporablja v sintezi peptidov in je obstojna proti kislinam in elektrofilom.

Za uvedbo smo uporabili reagent di-*t*-butil dikarbonat. Di-*t*-butil dikarbonat ni topen v vodi, *L*-fenilalanin amid pa se topi v vodi, zato smo kot topilo uporabili kombinacijo dioksana in vodne raztopine NaOH. Dioksan je organsko topilo, ki se dobro meša z vodo. Tako smo izboljšali stik med reagenti.

Kot stranska produkta med reakcijo nastajata CO₂ in *t*-butanol. Zaradi izhajanja plinastega ogljikovega dioksida smo bučko z reakcijsko zmesjo pustili odprto. Ker med reakcijo ne nastaja kislina, tukaj ni bilo nevarnosti, da bi se reakcija ustavila.

Bazo smo potrebovali za deprotoniranje amino skupine aminokislina, saj bi bila v vodi v nabiti NH_3^+ obliki.

Kislinski anhidridi so po reaktivnosti za kislinskimi kloridi, vendar so še vedno zelo reaktivni. Oba C-atoma karbonylne skupine sta dobra elektrofila, tert-butil karbonat pa je dobra izstopajoča skupina. Tudi to reakcijo smo izvajali na ledni kopeli, da smo s tem zmanjšali možnost nastanka stranskih produktov. Čeprav baza za sam potek reakcije ni nujna, pomaga s tem, da odvzame proton s protoniranega amina. Pri reakciji nastane ester karbaminske kisline. Boc zaščita pa je bolj občutljiva na hidrolizo s kislinami.



Slika 29: Mehanizem Boc zaščite (povzeto po 36)

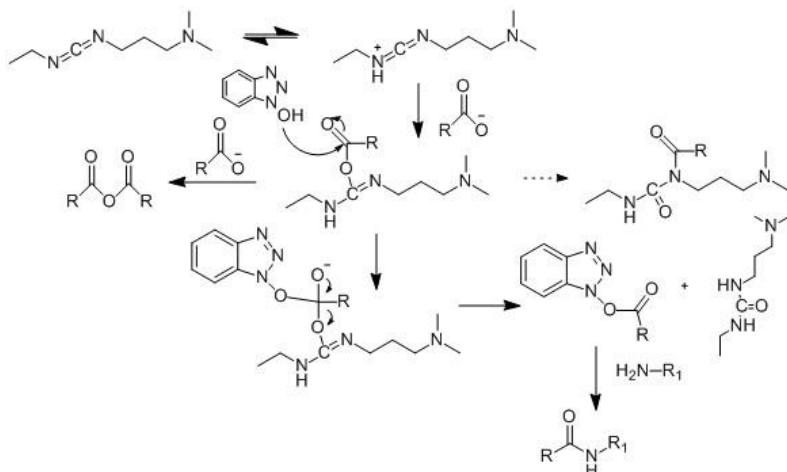
Pri izolaciji smo najprej odparili dioksan, saj se meša z organskimi topili in bi motil ekstrakcijo. Med reakcijo kot stranski produkt nastaja t-butanol, ki je topen v vodi. Zato se ga pri ekstrakciji znebimo v vodno fazo. V organski fazi nam je ostal produkt.

Po izolaciji je bil produkt nečist, zato smo ga prekrizalizirali iz heksana. Nečistoče so ostale raztopljene v heksanu, produkt pa je izkristaliziral.

5.2. SKLOPITVENE REAKCIJE na z benzil karbamatom zaščenih aminokislinah (sinteza spojin 5–16)

V naslednji stopnji smo zaščenim aminokislinam pripeli tri različne amide aminokislin. Nanje smo vezali glicinamid, L-alaninamid in L-fenilalaninamid. Pri tem smo morali najprej aktivirati karboksilno skupino Cbz-aminokislin, da so reagirale z aaminsko skupino aminokislinskih amidov. Karboksilna skupina je sama preslab elektrofil, hidroksilna skupina pa zelo slaba izstopajoča skupina. Med karboksilno skupino in aaminsko skupino aminokislinskih amidov smo tvorili amidno vez. V ta namen se pri sintezi peptidov uporabljajo sklopitveni reagenti.

EDC je sklopitveni reagent iz skupine karbodiimidov in se pogosto uporablja v sintezah peptidov. Uporabili smo ga za sintezo spojin **5** in **6**. Sklopitev poteka preko zelo reaktivne O-acilsečnine, zato pri reakcijah s karbodiimidi pogosto pride do racemizacije. Do racemizacije lahko pride na kislinskem delu ob aktivaciji, preko tvorbe oksazolonskega intermediata. Kot kislinski del smo uporabljali optično čiste aminokisljine (L-triptofan, L-fenilalanin, L-levcin, L-izolevcin), ki drugače obstajajo v dveh stereoizomerih, zato bi v produktu lahko dobili določen delež ene in druge oblike.



Slika 30: Mehanizem reakcije z EDC in HOBt (povzeto po 37)

Med reakcijo nastaja tudi več stranskih produktov. Da bi to preprečili, smo dodali HOBt. Dodali smo tudi bazo (Et₃N), saj je EDC v obliki soli s HCl. Kot topilo smo uporabili DMF, saj se spojini v CH₂Cl₂ nista raztapljali. Reakciji sta imeli slab izkoristek, po

izolaciji spojine **5** je bilo v zmesi prisotnih več stranskih produktov, po čiščenju s kolono smo dobili majhno količino produkta. Zato smo kasneje spojino **5** sintetizirali z uporabo drugega sklopitvenega reagenta. Reakciji sta potekali pri sobni temperaturi.

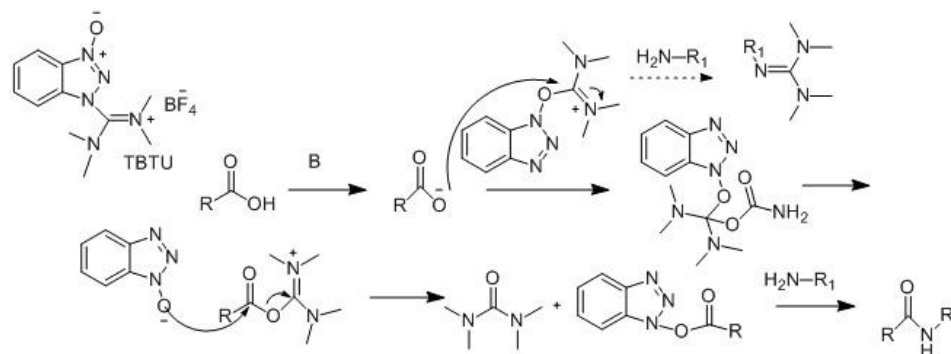
Karboksilna skupina reagira z EDC in tvori O-acilsečnino. Ker je le-ta zelo reaktivna, lahko pride do premestitve znotraj molekule do N-acilsečnine, ki ni več reaktivna. Lahko pride do napada druge molekule kisline in tvorbe anhidrida ali pa do ciklizacije do oksazolona in nato nastanka drugega optičnega izomera. HOBt protonira O-acilsečnino in s tem prepreči premestitev do N-acilsečnine. Spodbudi reakcijo v smeri nastanka aktivnega estra. Baza (terciarni amin) pripomore k nastanku le-tega. Reakcija je eksotermna.

Zaradi slabih izkoristkov in prisotnih primesi smo se v nadaljevanju odločili za zamenjavo sklopitvenega reagenta in vpeljavo brezvodnih pogojev. Voda lahko reagira kot nukleofil z reagenti in zniža izkoristke. Poskušali smo ugotoviti najboljšo kombinacijo baze, topila in sklopitvenega reagenta za nas. Kot bazo smo uporabljali Et₃N in NMM, ki sta oba terciarna amina in nimata nukleofilnega značaja, zato ne motita reakcije. Zamenjali smo tudi topilo. Poskusili smo z acetonitrilom in mešanico DMF in CH₂Cl₂. Z uporabo nepolarnih topil se

zmanjša možnost racemizacije in izboljša izkoristek. Za boljše raztapljanje smo tudi tu segrevali na 30 °C.

TBTU je zelo učinkovit sklopitveni reagent. Spada med sklopitvene reagente iz skupine

uroniumskih soli. Reakcija poteče hitro z majhnim odstotkom racemizacije. Baza pomaga pri nastanku



Slika 31: Mehanizem reakcije s TBTU (povzeto po 38)

karboksi uroniumske soli, iz katere nato nastane aktivni ester. Z dodatkom HOBt je racemizacija minimalna, poleg tega je bilo ugotovljeno, da pospešuje hitrost reakcije in zmanjša nastanek gvanidiliranih stranskih produktov (38). Kot stranski produkt med reakcijo nastaja sečnina. TBTU smo dodajali v presežku (1,5 EQ). Najprej smo pol ure mešali kislinsko komponento, TBTU in bazo, da so jo tako aktivirali. Nato smo dodali amin. Ker smo TBTU dodali v presežku, je lahko zreagirala z aminske skupino in je nastal gvanilidinski derivat.

Brezvodni pogoji izboljšajo izkoristek. Ker brezvodnih topil nismo sveže destilirali za vsako reakcijo, ampak smo pripravljene uporabljali več dni, je v tem lahko razlog za nekoliko slabše izkoristke poznejših reakcij. Slabši izkoristki pri spojinah **11**, **12**, in **13** so lahko posledica tega, da uporabljena izhodna spojina **3** ni bila povsem očiščena s kolonsko kromatografijo in je bila še zmeraj zmes več spojin. Pri sintezah spojin **11–16** s TBTU tudi nismo uporabljali dodatka HOBt. Čeprav nismo zasledili težav z racemizacijo, bi morda z dodatkom lahko dosegli hitrejšo reakcijo in bolj usmerjeno v nastanek našega dipeptida ter s tem manjše količine stranskih produktov.

Izolacije smo ne glede na uporabljen sklopitveni reagent izvajali podobno. Pri uporabi DMF, ki ima nizek parni tlak, se topila nismo uspeli povsem znebiti. Preostanek v bučki smo raztopili v EtOAc in 10-odstotni citrinski kislini. S spiranjem s kislno vodno fazo smo se znebili nezreagirane aminokislinskega amida (ima prosto aminske skupino, ki se protonira in nastane sol), prav tako smo odstranili EDC in bazo. Z raztopino citrinske kisline smo se znebili tudi ostanka DMF in sečninskega stranskega produkta. Z nasičeno raztopino

NaHCO₃ smo se znebili ostanka nezreagirane izhodne spojine, ki ima prosto COOH skupino (ionizira, nastane sol topna v vodi). S spiranjem z destilirano vodo smo se znebili še ostalih morebitnih soli in nato organsko fazo sušili s spiranjem z nasičeno NaCl in sušilnim sredstvom Na₂SO₄.

Zaradi slabe topnosti naših spojin se je večina oborila iz organske faze in tako nismo potrebovali čiščenja s kolonsko kromatografijo. Vendar je to tudi razlog za slabe izkoristke, saj so se produkti nekje oborili že med bolj zgodnjimi stopnjami izolacije. Pri spojini **11** in **12** je razlog za slab izkoristek v počasni kristalizaciji, saj sta se produkta le delno izkristalizirala po nekaj dneh v hladilniku.

5.3. CIKLIZACIJA končnih amidov do 1,3,4-oksotiazol-2-ona (poskusi sintez)

Zadnja stopnja v sintezi načrtovanih zaviralcev je bila sinteza elektrofilne glave. Zanj smo izbrali 1,3,4-oksotiazol-2-on, ki je ireverzibilni kovalentni zaviralec, selektiven za β5i-podenoto imunoproteasoma (27). Sinteza je že opisana v člankih, zato nismo pričakovali večjih težav (10, 20, 21, 39, 40).

Sintezo smo poskušali izvesti iz pripetih aminokislinskih amidov in reagenta klorokarbonilsulfenil klorida. Za prvi poskus sinteze smo uporabili spojino **7**. Ker imajo naše spojine dipeptidni skelet, smo najprej poskusili po postopku, ki so ga uporabili pri sintezi oksotiazolonskega derivata bortezomiba (10). Reakcije smo izvajali v inertni atmosferi, steklovino smo sušili pri povišani temperaturi in vse prepihali z argonom. Uporabili smo brezvodna topila. Kot je opisano v postopku, smo najprej poskusili s THF. Reagent ClCOSCl smo dodali z avtomatsko pipeto pri sobni temperaturi. Problem je bila slaba topnost in izhodna spojina se ni popolnoma raztopila, preden smo dodali reagent. Po pol ure ni bilo videti nobene spremembe, zato smo začeli s segrevanjem na 40 °C. Z zvišanjem temperature smo povečali kinetično energijo molekulam. S tem se med molekulami zgodi več trkov, s čimer smo povečali hitrost reakcije, vendar očitno ne dovolj. Po enem dnevu ni bilo spremembe, zato smo dodali reagent in začeli segrevati na temperaturi vrelišča (66 °C). Na TLC so se pojavile nove lise z zelo visokim R_f, lisa izhodne spojine je bledela. Naše izhodne spojine so zelo polarne in ciklizacija bi jim zvišala R_f, vendar ne toliko. Po podatkih iz literature naj bi bila lisa cikličnega produkta le za odtenek višje od izhodne spojine. Odparili smo topilo in naredili ločbo s kolonsko kromatografijo. Pri tem je bil problem slaba topnost.

Izpadla je rjava oborina, ki se ni topila v ničemer (sol, kislina), zato NMR spektra nismo mogli posneti. Ostale dobljene frakcije s kolone so bile majhne. Nobena ni bila prava.

Ker reakcija v THF ni potekla, smo v naslednji reakciji poskusili z drugim topilom. Zaradi večje količine smo izbrali spojino **15**. Spojino smo poskusili raztopiti v različnih topilih. Poskusili smo jo raztopiti v acetonitrilu, toluenu, diklorometanu, 1,4-dioksanu, 1,2-dikloroetanu. V toluenu se je raztopila ob močnem segrevanju, vendar smo pri analizi s TLC opazili nove lise. Izhodna spojina je očitno začela razpadati. Izbrali smo 1,2-dikloroetan, ki ima nekoliko višje vrelišče od THF (84 °C). Tudi po štirih dneh segrevanja in mešanja na TLC ni bilo vidnih sprememb. Polarna aprotična topila (THF, DMF, 1,2-dikloroetan) so akceptorji vodikove vezi, zato topijo spojine, ki vsebujejo amidno vez.

V etilacetatu so se nekatere spojine raztapljale (spojina **8**), vendar je EtOAc slabo reakcijsko topilo, saj lahko hidrolizira ali poteče transesterifikacija. Pri poskusu sinteze z uporabo EtOAc kot topila se je na TLC pojavilo veliko število lis, ki jih nismo uspeli ločiti.

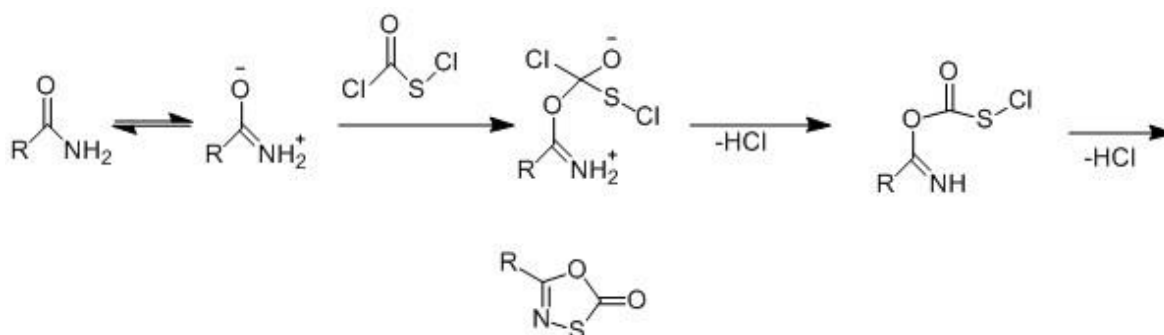
Nato smo poskusili z DMF, ker so se naše spojine v njem dobro raztapljale (sklopitvene reakcije). DMF ima zelo visoko vrelišče in ga težko popolnoma uparimo. Da bi preprečili prenasičenje in zato neselektivno reakcijo reagenta z izhodno spojino, smo ClCOCl najprej raztopili v manjši količini reagenta. Pri dodajanju reagenta v topilo se je pojavila burna reakcija (sprememba barve topila, pojavil se je dim). Lahko da je reagent zreagiriral že z DMF. DMF se uporablja kot katalizator pri pripravi kislinskih kloridov (zreagira z oksalil kloridom in tionil kloridom) (41).

Pri sintezi spojin **17**, **18** in **19** smo vseeno uporabili DMF in reagent dodajali s plinsko neprepustno stekleno brizgo neposredno v reakcijsko zmes. Reagent smo dodali v presežku (2EQ), da bi ga nekaj zreagiralo z našo spojino. S kolonsko kromatografijo smo ločili posamezne frakcije. Frakcije so bile majhne, vendar smo uspeli posneti NMR spekter. Pri analizi ¹H NMR spektra smo videli, da izgine signal za NH₂ skupino (se nahaja nekje okoli aromatskega dela, lahko da ga ti signali prekrijejo). Po HRMS analizi pa smo ugotovili, da spojine niso naši pričakovani produkti.

Kasneje smo poskusili s sintezo v 1,4-dioksanu, s segrevanjem na 100 °C, ob prisotnosti baze (Na₂CO₃) (39). Samo ta postopek se je pri derivatih nipekotinske kisline izkazal za uspešnega. Poskusili smo s sintezo spojin **30**, **31** in **32**. Produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo. Posamezne frakcije so bile majhne in še vedno zmesi več spojin, zato smo čistili še s preparativnim TLC. Izolirali smo lise s srednjim R_f. Čeprav je bil ¹H NMR

obetaven, smo po masni analizi ugotovili, da sinteza tudi tokrat ni uspela. Po istem postopku smo poskušali še z modelno spojino **33a**, ki vsebuje le en dodaten NH fragment iz karbamata. Vendar tudi v tem primeru nismo dobili želenega cikliziranega produkta.

Mehanizem reakcije bi bila dvakratna nukleofilna adicija s sledečo eliminacijo. Zaradi delokalizacije elektronov v amidni vezi dobi kisikov atom nukleofilni značaj in napade karbonilni ogljik klorokarbonilsilfenil klorida. Iz molekule se odcepi klor, ki je dobro izstopajoča skupina, in s seboj pobere vodik. Nastali imin ponovno reagira kot nukleofil in napade elektrofilni atom žvepla. Pri tem izstopita klor in še en vodik ter nastane 1,3,4-oksatazol-2-onski obroč.



Slika 32: Mehanizem ciklizacije do 1,3,4-oksatazol-2-ona (prirejeno po 41)

V našem primeru noben postopek ciklizacije ni bil uspešen. Razlogov je lahko več. Ker je naš reagent zelo reaktiven, lahko, da je zreagirala s plastiko, ko smo ga dodajali s plastičnim nastavkom. Uporabljali smo že odprt reagent in da je zaradi njegove visoke reaktivnosti že prej zreagirala z zrakom ali vodo. Pri dodajanju s plastično pipeto je prišel v stik z zrakom in vodo. Kasneje smo uporabili svež reagent. Odprli smo ga direktno pred uporabo in uporabljali plinsko neprepustno stekleno brizgo.

Zaradi velike reaktivnosti reagenta je problem tudi neselektivnost. Lahko, da je zreagirala tudi na ostalih NH fragmentih v molekuli, ki jih je v naših spojinah več. Amidna vez je najstabilnejša med vezmi, ki nastanejo iz karboksilne skupine (zaradi delne narave dvojne vezi). Pri segrevanju v toluenu je lahko prišlo do razpada amidne vezi (refluks, 111 °C). Pri reakciji nastaja HCl, ki je lahko tudi pomagala pri razpadu. Kasneje smo za njeno nevtralizacijo uporabljali bazo (Na₂CO₃, Et₃N).

Problem je lahko tudi sama stabilnost 1,3,4-oksatazol-2-onov. Občutljivi so na hidrolizo. Lahko, da so nam razpadli že med/pred samo izolacijo (oziroma analizo).

5.4. BIOKEMIJSKO VREDNOTENJE SPOJIN

Spojine **5–16** so biokemijsko ovrednotili na Katedri za farmacevtsko biokemijo na Fakulteti za farmacijo. Ovrednotili so jih na izolirani β 5i-podenoti imunoproteasoma, pri koncentraciji 25 μ M.

Rezidualna aktivnost encima je bila pri vseh dvanajstih primerih 100-odstotna. Rezidualna aktivnost je razmerje med aktivnostjo encima ob dodatku zaviralca in njegovi odsotnosti. Stoodstotna aktivnost pomeni, da je spojina neučinkovita in encim ostaja popolnoma aktiven. Nobena izmed sintetiziranih spojin **5–16**, ki so bile načrtovane kot nekovalentni zaviralci, ni zavrla β 5i-podenote.

6. SKLEP

Namen magistrske naloge je bil sintetizirati dipeptidne zaviralce, selektivne na kimotripsinu podobno podenoto imunoproteasoma. Želeli smo sintetizirati nekovalentne in kovalentne zaviralce, vendar nam to na žalost ni uspelo. Kot kovalentne zaviralce smo si zamislili dipeptidne spojine s pripeto 1,3,4-oksatazolo-2-onsko »bojno glavo« (warhead), ki bi reagirala z nukleofilnim Thr1 v vezavnem mestu in z njim tvorila kovalentno vez. Čeprav smo temu delu posvetili velik del časa, nam ciklizacija ni uspela.

Sinteze spojin smo izvedli v treh stopnjah. Prvi dve stopnji sintez, kjer smo zaščitili aminske skupine izbranih aminokislin (Leu, Ile, Phe, Trp) in nato na zaščitene aminokislino vezali aminokislinske amide (Gly, Ala, Phe), sta bili uspešni. Gre za reakciji, ki se pogosto izvajata v sintezah peptidov in sta dobro optimizirani. Po uvajanju zaščitne skupine sta bili spojini **3** in **4** nečisti, zato smo morali čistiti s kolonsko kromatografijo, ki pa ni bila dovolj uspešna. Manjše težave smo imeli tudi pri pri sklopitvenih reakcijah, kjer smo morali zaradi optimizacije poiskati drug sklopitveni reagent. Po zamenjavi EDC s TBTU smo dobili zadovoljive izkoristke in čiste produkte. Tretja stopnja sinteze, ki jo je predstavljala ciklizacija terminalnega amida do 1,3,4-oksatazolo-2-ona, pa ni uspela. Zaradi prehitrega sklepanja le po NMR analizi, da smo po postopku z uporabo DMF kot reakcijskega topila dobili želeni produkt, smo sintetizirali celotno paleto spojin po tem postopku. Na koncu smo tako porabili večino izhodnih spojin in ugotovili, da nimajo pričakovane strukture.

Za sintezo dipeptidnih nosilcev elektrofilne bojne glave smo se odločili predvsem zato, ker je hitra in bi nam lahko dala veliko informacij o vezavi nizkomolekularnih ligandov v aktivno mesto.

Oksatiazoloni so se izkazali za močne in na β 5i-podenoto specifične zaviralce. S postopkom ciklizacije je zato smiselno še naprej poskušati. Čeprav je bil problem ciklizacije domnevno rešen z uporabo pogojev (topilo 1,4-dioksan, 100 °C, 24 ur, dodatek anorganske baze), se ta postopek v našem primeru ni izkazal za uspešnega. Poskusiti velja še po drugih postopkih, opisanih v literaturi. Lahko bi poskusili še z reakcijo z uporabo toluena (segrevanje na refluxu, 6 ur) in sintezo z uporabo mikrovalovnega reaktorja (dioksan, 15 minut, 100 °C).

Z nadaljnjimi poskusi bi lahko ugotovili, ali je problem v prisotnosti dodatnih NH fragmentov v molekuli in pa občutljivost naših spojin na ostre pogoje sinteze. Sinteza nam ni uspela niti z modelno spojino, čeprav so v literaturi opisane tudi sinteze (manjših) spojin, ki vsebujejo dodatne NH skupine.

Sintetizirane spojine glede na rezultate biokemijskih testiranj niso imele nobene aktivnosti kot nekovalentni zaviralci kimotripsinske podenote. Vendar bi bilo ob uspešni ciklizaciji verjetno drugače.

7. LITERATURA

- (1) Lee D H, Goldberg A L: Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* 1998; 8: 397–403
- (2) Raynes R, Pomatto L C D, Davies K J A: Degradation of oxidized proteins by the proteasome: Distinguishing between the 20S, 26S and immunoproteasome proteolytic pathways. *Mol aspects Med* 2016; 50: 41–55
- (3) Ciechanover A: Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 1: 79–8
- (4) Nalepa G, Rolfe M, Harper J W: Drug discovery in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5(7): 596–613
- (5) Livneh I, Cohen-Kaplan V, Cohen-Rosenzweig C, Avni N, Ciechanover A: The life of the 26S proteasome: from birth, through regulation and function, and onto its death. *Cell Res* 2016; 8: 869–85
- (6) Amm I, Sommer T, Wolf D H: Protein quality control and elimination of protein waste: The role of the ubiquitin-proteasome system. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1843(1): 182–96
- (7) Orłowski R Z: The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis. *Cell Death Differ* 1999; 4: 303–13
- (8) Huber E M, Groll M: Inhibitors for the Immuno- and Constitutive Proteasome: Current and Future Trends in Drug Development. *Angew Chem Int Ed Engl* 2012; 51: 8708–20
- (9) Kimura H, Caturegli P, Takahashi M, Suzuki K: New Insights into the Function of the Immunoproteasome in Immune and Nonimmune Cells. *J Immunol Res* 2015; online computer file 2015: 541984/1–541984/9
- (10) Gryder B E, Guerrant W, Chen C H, Oyeler A K: Oxathiazole-2-one derivative of bortezomib: Synthesis, stability and proteasome inhibition activity. *Med Chem Commun* 2011; 1083–6
- (11) Brehm A, Krüger E: Dysfunction in protein clearance by the proteasome: impact on autoinflammatory disease. *Semin Immunopathol* 2015; 37: 323–333

- (12) Van den Eynde B J, Morel S: Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome. *Curr Opin Immunol* 2001; 13(2): 147–53
- (13) Miller Z, Ao L, Kim K B, Lee W: Inhibitors of the Immunoproteasome: Current Status and Future Directions. *Curr Pharm Des* 2013;19(22): 4140–51
- (14) Kisselev A F, Groettrup M: Subunit specific inhibitors of proteasomes and their potential for immunomodulation. *Curr Opin Chem Biol* 2014; 23: 16–22
- (15) Ettari R, Previti S, Bitto A, Grasso S, Zappalà M: Immunoproteasome-Selective Inhibitors: A Promising Strategy to Treat Hematologic Malignancies, Autoimmune and Inflammatory Disease. *Curr Med Chem* 2016; 23(12): 1217–38
- (16) Basler M, Mundt S, Bitzer A, Schmidt C, Groettrup M: The immunoproteasome: a novel drug target for autoimmune diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2015; 33(4 Suppl 92): S74–9.
- (17) Manasanch E E, Korde N, Zingone A, Tageja N, Fernandez de Larrea C, Bhutani M, Wu P, Roschewski M, Landgren O: The proteasome: mechanisms of biology and markers of activity and response to treatment in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2014; 55(8): 1707–14
- (18) Angeles A, Fung G, Luo H: Immune and non-immune functions of the immunoproteasome. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2012; 17 :1904–16
- (19) Sulistio Y A, Heese K: The Ubiquitin-Proteasome System and Molecular Chaperone Deregulation in Alzheimer’s Disease. *Mol Neurobiol* 2016; 53: 905–931
- (20) Lin G, Li D, de Carvalho L P S, Deng H, Tao H, Vogt G, Wu K, Schneider J, Chidawanyika T, Warren D, Li H, Nathan C: Inhibitors Selective for Mycobacterial versus Human Proteasomes. *Nature* 2009; 461(7264): 621–626.
- (21)) Russo F, Gising J, Åkerbladh L, Roos A K, Naworyta A, Mowbray S L, Sokolowski A, Henderson I, Alling T, Bailey M A, Files M, Parish T, Karlén A, Larhed M: Optimization and Evaluation of 5-Styryl-Oxathiazol-2-one Mycobacterium tuberculosis Proteasome Inhibitors as Potential Antitubercular Agents. *ChemistryOpen* 2015; 4(3): 342–62

- (22) SmPC Bortezomib Actavis 3,5 mg prašek za raztopino za injiciranje. Dostop: 9. 8. 2017
[http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/13229E00DBE14C70C1257F5E00054127/\\$File/s-016506.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/13229E00DBE14C70C1257F5E00054127/$File/s-016506.pdf)
- (23) Sosič I, Gobec M, Brus B, Knez D, Živec M, Konc J, Lešnik S, Ogrizek M, Obreza A, Žigon D, Janežič D, Mlinarič-Raščan I, Gobec S: Nonpeptidic Selective Inhibitors of the Chymotrypsin-Like (β 5i) Subunit of the Immunoproteasome. *Angew Chem Int Ed Engl* 2016; 55: 5745–8
- (24) Spotlight on ixazomib: potential in the treatment of multiple myeloma. Dostop: 10.8.2017 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4714737/#b23-dddt-10-217>
- (25) Ninlaro full prescribing information. Dostop: 9. 8. 2017
<https://www.ninlarohcp.com/pdf/Prescribing-information.pdf>
- (26) Huber E M, Basler M, Schwab R, Heinemeyer W, Kirk C J, Groettrup M, Groll M: Immuno- and Constitutive Proteasome Crystal Structures Reveal Differences in Substrate and Inhibitor Specificity. *Cell* 2012; 148: 727–738
- (27) De Bruin G, Huber E M, Xin B T, van Rooden E J, Al-Ayed K, Kim K, Kisselev A F, Driessen C, van der Stelt M, van der Marel, G A, Groll M, Overkleeft H S: Structure-Based Design of β 1i or β 5i Specific Inhibitors of Human Immunoproteasomes. *J Med Chem* 2014; 57: 6197–6209
- (28) Kaffy J, Bernadat G, Ongeri S: Non-Covalent Proteasome Inhibitors. *Curr Pharm Des* 2013; 19: 4115–30
- (29) Mah R, Thomas J R, Shafer C M: Drug discovery considerations in the development of covalent inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2014; 24(1): 33–9
- (30) Bauer R A: Covalent inhibitors in drug discovery: from accidental discoveries to avoided liabilities and designed therapies. *Drug Discov Today* 2015; 20: 1061–73
- (31) Singh J, Petter R C, Baillie T A, Whitty A: The resurgence of covalent drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2011; 10: 307–17
- (32) Fan H, Angelo N G, Warren J D, Nathan C F, Lin G: Oxathiazolones selectively inhibit the human immunoproteasome over the constitutive proteasome. *ACS Med Chem Lett* 2014; 5 (4), 405–10

- (33) Almond J B, Cohen G M: The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 2002; 16(4): 433–43
- (34) General Properties of Amino Acids. Dostop: 22. 8. 2017 https://www.anaspec.com/html/amino_acids_properties.html
- (35) Name-Reaction.com. Dostop: 22. 8. 2017 <http://www.name-reaction.com/schotten-baumann-reaction>
- (36) CommonOrganicChemistry.com. Dostop: 22. 8. 2017 http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_Index.htm,
- (37) El-Faham A, Albericio: Peptide coupling reagent, more than a letter soup. *Chem Rev* 2011; 111(11): 6557–6602
- (38) Montalbetti C, Falque V: Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahed* 2005; 61: 10827–52
- (39) Yang J, Pi W, Xiong L, Ang W, Yang T, He J, Liu Y, Chang Y, Ye W, Wang Z, Lou Y, Wei Y: 3H-1,2,4-Dithiazol-3-one compounds as novel potential affordable antitubercular agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2013, 23, 1424–7
- (40) McMillan K G, Tackett M N, Dawson A, Fordyce E, Paton R M: Synthesis, structure and reactivity of 5-pyranosyl-1,3,4-oxathiazol-2-ones. *Carbohydr Res* 2006; 341(1): 41–8.
- (41) Clayden J, Greeves N, Warren S, Wothers P: *Organic Chemistry*, 1. izdaja, Oxford University Press, New York, 2001