

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETRA KOJC

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETRA KOJC

**SINTEZA IN VREDNOTENJE POTENCIALNIH ZAVIRALCEV  
MONOAMIN OKSIDAZE TIPA A IN B Z 1-  
PROPARGILAZETIDINSKIM IN 4-STIRIL-1-  
PROPARGILPIPERIDINSKIM OSNOVNIM SKELETOM**

SYNTHESIS AND EVALUATION OF POTENTIAL INHIBITORS OF  
MONOAMINE OXIDASE TYPE A AND B WITH 1-  
PROPARGYLAZETIDINE AND 4-STYRYL-1-PROPARGYLPYPERIDINE  
SCAFFOLD

UNIFORM MASTER'S PROGRAMME PHARMACY

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sove, mag. farm. Določene spektroskopske meritve so opravili tudi v Centru za masno spektrometrijo Inštituta Jožef Štefan v Ljubljani.

### **Zahvala**

Mentorju doc. dr. Mateju Sovi, mag. farm., se iskreno zahvaljujem za vso pomoč, usmerjanje in nasvete pri izvedbi laboratorijskega dela ter za strokovni pregled magistrske naloge.

Prav tako se zahvaljujem vsem ostalim, ki so k nastanku magistrske naloge kakorkoli pripomogli.

Hvala tudi staršem, ki so mi študij finančno omogočili, ter Mihu, prijateljem in sošolcem, ki so študijskim letom doprinesli dodano vrednost.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sove, mag. farm.

Petra Kojc

Ljubljana, 2017

# VSEBINA

POVZETEK .....	vii
ABSTRACT .....	viii
SEZNAM OKRAJŠAV .....	x
1. UVOD.....	1
1.1 MONOAMINSKI ŽIVČNI PRENAŠALCI.....	1
1.2 MONOAMIN OKSIDAZE A in B.....	1
1.2.1 Katalitična aktivnost monoamin oksidaz.....	2
1.2.2 Struktura in substratna specifičnost izoencimov .....	2
1.2.3 Tkivna razporeditev in vloga posameznega izoencima.....	4
1.2.4. Monoamin oksidaze kot tarča zdravilnih učinkovin.....	5
1.3 ZAVIRALCI MAO.....	6
1.3.1 Ireverzibilni neselektivni zaviralci MAO in hipertenzivna kriza .....	6
1.3.2 Selektivni (reverzibilni) zaviralci MAO-A.....	7
1.3.3 Selektivni (ireverzibilni) zaviralci MAO-B.....	8
1.3.4 Pomen <i>N</i> -propargilaminske skupine za nevroprotektivno delovanje .....	10
1.3.5 Zaviralci MAO v terapiji bolezni .....	11
2. NAČRT ZA DELO.....	14
3. MATERIALI IN METODE .....	16
3.1. MATERIALI .....	16
3.1.1 Reagenti in topila.....	16
3.1.2 Ostala laboratorijska oprema .....	16
3.2 METODE .....	16
3.2.1 Kromatografske metode .....	16
3.2.2 Spektroskopske metode .....	17

3.2.3 Določanje tališč .....	17
3.2.4 Risanje in poimenovanje spojin.....	18
3.2.5 Encimski testi .....	18
4. EKSPERIMENTALNO DELO .....	19
4.1 Sinteza 1-( <i>terc</i> -butoksikarbonil)piperidin-4-karboksilne kisline (1).....	19
4.2 Sinteza 1-( <i>terc</i> -butoksikarbonil)azetidin-3-karboksilne kisline (2) .....	20
4.3 Sinteza <i>terc</i> -butil 4-(metoksi(metil)karbamoil)piperidin-1-karboksilata (3) .....	20
4.4 Sinteza <i>terc</i> -butil 3-(metoksi(metil)karbamoil)azetidin-1-karboksilata (4) .....	21
4.5 Sinteza <i>terc</i> -butil 4-formilpiperidin-1-karboksilata (5).....	22
4.6 Sinteza <i>terc</i> -butil 3-formilazetidin-1-karboksilata (6).....	22
4.7 Sinteza (4-(metilsulfonil)benzil)trifenilfosfonijevega bromida (7).....	23
4.8 Sinteza (4- <i>N,N</i> -dietilsulfamoil)benzil)trifenilfosfonijevega bromida (9) in trifenil(4-sulfamoilbenzil)fosfonijevega bromida (10) .....	24
4.9 Sinteza <i>terc</i> -butil ( <i>Z</i> )-4-(4-(metilsulfonil)stiril)piperidin-1-karboksilata (11) in <i>terc</i> -butil ( <i>E</i> )-4-(4-(metilsulfonil)stiril) piperidin-1-karboksilata (12) .....	25
4.10 Sinteza <i>terc</i> -butil ( <i>Z</i> )-3-(4-(fluorostiril)azetidin-1-karboksilata (14) in <i>terc</i> -butil ( <i>E</i> )-3-(4-(fluorostiril)azetidin-1-karboksilata (15) .....	27
4.11 Sinteza <i>terc</i> -butil 4-(4-(metilsulfonil)fenetil)piperidin-1-karboksilata (16).....	28
4.12 Sinteza <i>terc</i> -butil 3-(fluorofenetil)azetidin-1-karboksilata (17) .....	29
4.13 Sinteza ( <i>Z</i> )-4-(4-(metilsulfonil)stiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (19) .....	30
4.14 Sinteza ( <i>E</i> )-4-(4-(metilsulfonil)stiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (21).....	31
4.15 Sinteza 4-(4-(metilsulfonil)fenetil)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (23).....	32
4.16 Sinteza ( <i>Z</i> )-3-(4-fluorostiril)-1,1-di(prop-2-in-1-il)azetidin-1-ijevega bromida (25) .....	33
4.17 Sinteza ( <i>E</i> )-3-(4-fluorostiril)-1,1-di(prop-2-in-1-il)azetidin-1-ijevega bromida (27) .....	34
4.18 Sinteza ( <i>Z</i> )-3-(4-fluorostiril)-1-(prop-2-in-1-il)azetidina (28) .....	35
4.19 Sinteza ( <i>E</i> )-3-(4-fluorostiril)-1-(prop-2-in-1-il)azetidina (29) .....	36

5. REZULTATI IN RAZPRAVA .....	38
5.1 REZULTATI SINTEZNEGA DELA.....	38
5.2 KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV .....	39
5.2.1 Uvedba zaščitne skupine di- <i>tert</i> -butil dikarbonata na amino skupino.....	39
5.2.2 Sinteza Weinrebovega amida s sklopitvenim reagentom TBTU.....	40
5.2.3 Redukcija Weinrebovega amida do aldehida .....	42
5.2.4 Sinteza Wittigovega reagenta in Wittigova reakcija .....	43
5.2.5. Redukcija dvojne vezi s katalitskim hidrogeniranjem.....	46
5.2.6 Odščita <i>tert</i> -butilkarbamata z acidolizo .....	47
5.2.7. <i>N</i> -alkiliranje s $K_2CO_3$ .....	47
5.3. REZULTATI BIOLOŠKEGA VREDNOTENJA.....	51
5.4 KOMENTAR REZULTATOV BIOLOŠKEGA VREDNOTENJA.....	53
6. SKLEP .....	54
7. LITERATURA IN VIRI.....	56

## KAZALO SLIK

Slika 1: Shema reakcije z MAO (prirejeno po 7) .....	2
Slika 2: Molekulski strukturi MAO-A in MAO-B (prirejeno po 6) .....	3
Slika 3: Strukturi aktivnih mest MAO-A in MAO-B (prirejeno po 4).....	4
Slika 4: Struktura tiramina.....	6
Slika 5: Strukture izbranih neselektivnih ireverzibilnih zaviralcev MAO .....	7
Slika 6: Struktura moklobemida .....	7
Slika 7: Shematski prikaz antiapoptotičnega delovanja N-propargilaminov (prirejeno po 4) .....	10
Slika 8: Strukture selegilina, razagilina in N-propargilamina .....	10
Slika 9: Shema načrtovanja piperidinskih analogov .....	15
Slika 10: Shema načrtovanja azetidinskih analogov .....	15
Slika 11: Reakcijska shema za spojino 1 .....	19
Slika 12: Reakcijska shema za spojino 2.....	20
Slika 13: Reakcijska shema za spojino 3.....	20
Slika 14: Reakcijska shema za spojino 4.....	21
Slika 15: Reakcijska shema za spojino 5.....	22
Slika 16: Reakcijska shema za spojino 6.....	22
Slika 17: Reakcijska shema za spojino 7.....	23
Slika 18: Reakcijska shema za spojini 9 in 10.....	24
Slika 19: Reakcijska shema za spojini 11 in 12.....	25
Slika 20: Reakcijska shema za spojini 14 in 15.....	27
Slika 21: Reakcijska shema za spojino 16.....	28
Slika 22: Reakcijska shema za spojino 17.....	29
Slika 23: Reakcijska shema za spojino 19.....	30
Slika 24: Reakcijska shema za spojino 21 .....	31
Slika 25: Reakcijska shema za spojino 23.....	32
Slika 26: Reakcijska shema za spojino 25.....	33
Slika 27: Reakcijska shema za spojino 27.....	34
Slika 28: Reakcijska shema za spojino 28.....	35
Slika 29: Reakcijska shema za spojino 29.....	36

Slika 30: Mehanizem reakcije zaščite amino skupine z di-terc-butil dikarbonatom (prirejeno po 29) .....	39
Slika 31: Mehanizem reakcije s sklopitvenim reagentom TBTU (prirejeno po 33, 34) .....	41
Slika 32: Mehanizem nastanka potencialnega gvanidinskega stranskega produkta (prirejeno po 33).....	41
Slika 33: Mehanizem redukcije Weinrebovega amida do aldehida z LiAlH <sub>4</sub> (prirejeno po 36, 37).....	42
Slika 34: Mehanizem Wittigove reakcije (prirejeno po 39, 40) .....	44
Slika 35: Mehanizem redukcije dvojne vezi s katalitskim hidrogeniranjem (prirejeno po 42).....	46
Slika 36: Mehanizem odstranitve Boc <sub>2</sub> O z acidolizo (prirejeno po 43) .....	47
Slika 37: Mehanizem N-alkiliranja s kalijevim karbonatom (prirejeno po 44).....	48



## KAZALO RAZPREDELNIC

Razpredelnica I: Analizni podatki za spojino 1 .....	19
Razpredelnica II: Analizni podatki za spojino 2 .....	20
Razpredelnica III: Analizni podatki za spojino 3 .....	21
Razpredelnica IV: Analizni podatki za spojino 4.....	22
Razpredelnica V: Analizni podatki za spojino 7 .....	23
Razpredelnica VI: Analizni podatki za spojino 11 .....	26
Razpredelnica VII: Analizni podatki za spojino 12.....	26
Razpredelnica VIII: Analizni podatki za spojino 14 .....	27
Razpredelnica IX: Analizni podatki za spojino 15.....	28
Razpredelnica X: Analizni podatki za spojino 16 .....	28
Razpredelnica XI: Analizni podatki za spojino 17.....	29
Razpredelnica XII: Analizni podatki za spojino 19.....	31
Razpredelnica XIII: Analizni podatki za spojino 21 .....	32
Razpredelnica XIV: Analizni podatki za spojino 25 .....	33
Razpredelnica XV: Analizni podatki za spojino 27 .....	35
Razpredelnica XVI: Analizni podatki za spojino 28.....	36
Razpredelnica XVII: Analizni podatki za spojino 29.....	37
Razpredelnica XVIII: Strukture končnih sintetiziranih spojin.....	38
Razpredelnica XIX: Rezultati biološkega vrednotenja predhodno sintetiziranih spojin (25) .....	51
Razpredelnica XX: Rezultati biološkega vrednotenja novih sintetiziranih spojin .....	52

## POVZETEK

Zaviralci monoamin oksidaz (MAO) se z namenom povišanja ravni živčnih prenašalcev v možganih v terapiji uporabljajo že nekaj desetletij. Ker pri encimskih reakcijah z MAO nastaja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, njihovo zaviranje privede tudi do znižanja ravni oksidativnega stresa v telesu. Izsledki najnovejših raziskav hkrati kažejo, da *N*-propargilaminska skupina, ki je strukturni fragment selegilina in razagilina, ireverzibilnih selektivnih zaviralcev encimske izooblike MAO-B, deluje antiapoptotično. Posledica obojega je nevroprotektivno delovanje takšnih učinkovin, s katerimi bi lahko učinkovito zdravili vrsto nevrodegenerativnih bolezni sodobnega časa.

Da bi pridobili nove potencialne selektivne ireverzibilne zaviralce izooblik MAO-A in MAO-B z nevroprotektivnim delovanjem, smo v okviru magistrske naloge sintetizirali in ovrednotili delovanje 6 končnih spojin. Sintezo smo načrtovali na osnovi predhodno sintetizirane spojine *4-(4-fluorostiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina* z *N*-propargilaminskim fragmentom, ki je na encimskih testih selektivno zavirala delovanje MAO-B. S strukturnimi spremembami smo skušali ojačati zaviralno delovanje. Načrtovali smo dve seriji potencialnih učinkovin: pri spojinah prve serije smo ohranili piperidinski osnovni skelet in s spremembo substituentov na aromatskem obroču ciljali na večjo polarnost spojin, pri drugi pa smo piperidinski skelet zamenjali z azetidinskim, s čimer smo ciljali na boljše prileganje aktivnemu mestu encima. Po 7-stopenjski sintezni poti smo uspešno sintetizirali piperidinske analoge, razen analogov s sulfonamidnimi substituenti, za katere se je izkazalo, da zahtevajo drugačno sintezno pot; ter uspešno razvili postopek za sintezo analogov z azetidinskim osnovnim skeletom. Kot osnovno reakcijo za sintezo dvojne vezi v molekulah smo uporabili Wittigovo reakcijo, s katero smo pridobili nenasičene *cis* in *trans* derivate produktov, sintetizirali pa smo tudi reducirane derivate.

Rezultati biološkega vrednotenja končnih spojin na MAO-A in MAO-B so pokazali, da so spojine z azetidinskim skeletom bistveno manj aktivne od piperidinskih analogov, zato z njihovo sintezo ni smiselno nadaljevati. *(E)-4-(4-(metilsulfonyl)stiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidin* (spojina **21**), ki selektivno zavira delovanje MAO-B že v nanomolarnih koncentracijah in je hkrati manj lipofilna od spojine, iz katere smo izhajali, pa je močan zaviralec MAO-B in predstavlja dobro izhodišče za nadaljnje raziskovalno delo.

**Ključne besede:** zaviralci MAO, *N*-propargilamin, Wittigova reakcija, nevrodegenerativne bolezni

## ABSTRACT

In order to increase the levels of neurotransmitters in the brain, the monoamine oxidase (MAO) inhibitors have been used in therapy for decades. Since  $H_2O_2$  is formed in the enzymatic reactions with MAO, their inhibition also decreases the levels of oxidative stress in the body. Furthermore, the latest findings show that *N*-propargylamine group, which is a structural fragment of irreversible selective MAO-B inhibitors selegiline and rasagiline, has anti-apoptotic properties. Consequently, such compounds have neuroprotective properties and could be used for treatment of numerous modern age neurodegenerative diseases.

Our aim was to obtain new potential selective irreversible inhibitors of MAO-A and MAO-B with neuroprotective properties. Accordingly, we successfully synthesized a series of 6 final compounds and evaluated their activity. The synthesis was performed according to the previously synthesized *N*-propargylamine based selective MAO-B inhibitor *4-(4-fluorostyryl)-1-(prop-2-yn-1-yl)piperidine*. To improve the inhibitory activity selected structural changes were used. Two sets of compounds were designed: in the first set we retained the piperidine scaffold and changed the substituents to decrease the lipophilicity of the compounds. In the second set we substituted the piperidine ring with azetidine to improve binding into the active site of the enzyme. In the 7-step synthetic route, we successfully synthesized piperidine analogues, except the ones with sulfonamide substituents, which require a different synthetic procedure. Moreover, we also developed and performed the synthesis of analogues with the azetidine scaffold. The main method for the double bond formation was the Wittig reaction, which yielded unsaturated *cis* and *trans* derivatives. And last but not least, we also synthesized the reduced derivatives.

The results from biological evaluation of final compounds on MAO-A and MAO-B showed that compounds with the azetidine scaffold are significantly less potent than piperidine analogues, which makes them less interesting for further research. *(E)*-*4-(4-(methylsulfonil)styryl)-1-(prop-2-yn-1-yl)piperidine* (compound **21**), which selectively inhibits the activity of MAO-B in the nanomolar concentrations and is at the same time less lipophilic than the original compound, is a potent inhibitor of MAO-B and represents a good starting point for further research.

**Keywords:** MAO inhibitors, *N*-propargylamine, Wittig reaction, neurodegenerative diseases

## SEZNAM OKRAJŠAV

<b>AD</b>	aldehid dehidrogenaza
<b>ADHD</b>	motnja aktivnosti in pozornosti ( <i>ang.</i> attention deficit hyperactivity disorder)
<b>Bad</b>	regulator apoptotičnih beljakovin ( <i>ang.</i> Bcl-2-associated death promoter)
<b>Bak</b>	regulator apoptotičnih beljakovin ( <i>ang.</i> Bcl-2-homologous antagonist/killer)
<b>Bid</b>	regulator apoptotičnih beljakovin ( <i>ang.</i> BH3 interacting domain death agonist)
<b>Bax</b>	regulator apoptotičnih beljakovin ( <i>ang.</i> Bcl-2-associated X protein)
<b>Bcl-2</b>	regulator antiapoptotičnih beljakovin ( <i>ang.</i> B-cell lymphoma 2)
<b>Bcl-XL</b>	regulator antiapoptotičnih beljakovin ( <i>ang.</i> B-cell lymphoma-extra large)
<b>Boc<sub>2</sub>O</b>	di- <i>terc</i> -butil dikarbonat ( <i>ang.</i> di- <i>tert</i> -butyl dicarbonate)
<b>COMT</b>	katehol O-metiltransferaza ( <i>ang.</i> catechol-O-methyltransferase)
<b>DMF</b>	dimetilformamid
<b>DMSO</b>	dimetilsulfoksid
<b>DNK</b>	deoksiribonukleinska kislina
<b>EDC</b>	1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)karbodiimidijev klorid
<b>FAD</b>	flavin-adenin-dinukleotid ( <i>ang.</i> flavin adenine dinucleotide)
<b>GAPDH</b>	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza ( <i>ang.</i> glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
<b>HOBt</b>	1-hidroksibenzotriazol ( <i>ang.</i> 1-hydroxybenzotriazole)
<b>HPLC</b>	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti ( <i>ang.</i> high performance liquid chromatography)

<b>HRMS</b>	masna spektrometrija visoke ločljivosti ( <i>ang.</i> high resolution mass spectrometry)
<b>Hz</b>	hertz
<b>IC<sub>50</sub></b>	koncentracija zaviralca, ki je potrebna za polovično zmanjšanje aktivnosti encima
<b>Ile</b>	izolevcin
<b>IR</b>	infrardeča absorpcijska spektrofotometrija
<b>J</b>	sklopitvena konstanta
<b>J<sub>C-F</sub></b>	sklopitvena konstanta ogljika s fluorom
<b>Leu</b>	levcin
<b>MAO-A</b>	monoamin oksidaza A
<b>MAO-B</b>	monoamin oksidaza B
<b>MAPK</b>	mitogen aktivirana proteinska kinaza
<b>MF</b>	mobilna faza
<b>mPTP</b>	mitohondrijski multiproteinski kompleks
<b>NMR</b>	jedrska magnetna resonančna spektrometrija ( <i>ang.</i> nuclear magnetic resonance spectroscopy)
<b>Pd/C</b>	paladij na aktivnem ogljiku
<b>pH</b>	negativni desetiški logaritem molarne koncentracije oksonijevih ionov
<b>Phe</b>	fenilalanin
<b>PKC</b>	protein kinaza C
<b>ppm</b>	število delcev na milijon delcev ( <i>ang.</i> parts per million)
<b>RA</b>	rezidualna aktivnost
<b>Rf</b>	retencijski faktor

<b>RIMA</b>	selektivni reverzibilni zaviralci monoamin oksidaze A ( <i>ang.</i> reversible inhibitors of monoamine oxidase A)
<b>ROS</b>	reaktivne kisikove zvrsti
<b>SOD</b>	superoksid dismutaza
<b>TBTU</b>	O-(benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronijev tetrafluoroborat
<b>THF</b>	tetrahidrofuran
<b>TLC</b>	tankoplastna kromatografija ( <i>ang.</i> thin-layer chromatography)
<b>t<sub>R</sub></b>	retencijski čas
<b>Tyr</b>	tirozin
<b>δ</b>	kemijski premik

# 1. UVOD

## 1.1 MONOAMINSKI ŽIVČNI PRENAŠALCI

Monoaminski živčni prenašalci so pomembna skupina živčnih prenašalcev, ki vsebujejo eno amino skupino. Najpomembnejši predstavniki so kateholamini (adrenalin, noradrenalin, dopamin), serotonin in histamin, v to skupino pa spadajo tudi monoamini, ki se v telesu nahajajo v sledovih, kot so fenilamini, tiramin, triptamin in oktopamin. Njihova vloga je prenos signalov med živčnimi celicami, ki uravnava mnogo procesov v telesu, vključno z miselnimi, vedenjskimi in gibalnimi procesi, spanjem, funkcijo srčno-žilnega sistema in drugimi. Spremembe v njihovi izgradnji, delovanju in razgradnji so zato lahko vzrok mnogih bolezni, kot so depresija, Parkinsonova bolezen, Alzheimerjeva bolezen, srčnožilne bolezni in druge (1, 2).

Nastanejo iz različnih prekurzorjev (aminokislin) v presinaptični živčni celici, kjer so shranjeni v membranskih mešičkih. Ko presinaptična celica prejme signal v obliki akcijskega potenciala, se odpre ionski kanal, preko katerega v celico vstopijo kalcijevi ioni, ki povzročijo zlitje mešička z membrano presinaptične celice in eksocitozo živčnega prenašalca v sinaptično špranjo. Prenášalec se nato veže na receptorje na postsinaptični celici in tako prenese signal nanjo. Nato se z receptorja sprosti in inaktivira po dveh poteh: po prvi poti, ki jo imenujemo ponovni privzem, z endocitozo vstopi nazaj v presinaptično celico, se znova shrani v membranskih mešičkih in postopek se ponovi, po drugi poti pa ga razgradijo presnovni encimi. Najpomembnejši encimi, ki presnavljajo monoaminske živčne prenašalce, so monoamin oksidaze (MAO), katehol O-metiltransferaze (COMT) in aldehyd dehidrogenaze (AD) (3).

## 1.2 MONOAMIN OKSIDAZE A in B

Monoamin oksidaze (MAO) so encimi iz družine oksidoreduktaz, ki se nahajajo na zunanjih mitohondrijskih membranah večine telesnih tkiv. V telesu imajo pomembno vlogo, saj s presnavljanjem predvsem primarnih, v nekoliko manjši meri pa tudi sekundarnih in terciarnih monoaminov skrbijo za inaktivacijo monoaminskih živčnih prenašalcev in tako uravnavajo njihovo koncentracijo v možganih, hkrati pa uravnavajo raven telesnih in zunajtelesnih monoaminov tudi v perifernih tkivih (4, 5). Presnavljajo predvsem kateholamine, serotonin in monoamine v sledovih, medtem ko imajo za diamine

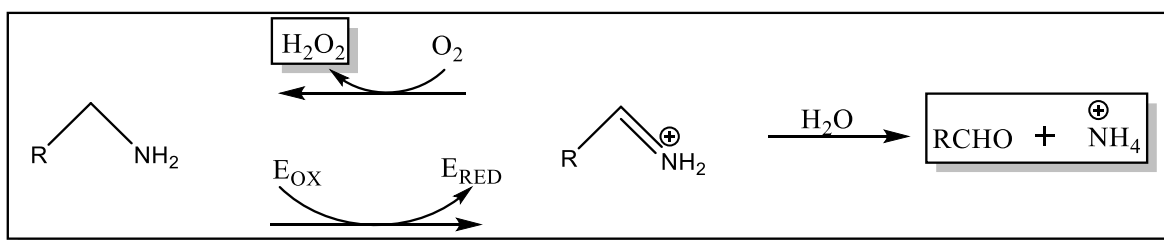


in histamin občutno manjšo afiniteto (3). V telesu se nahajajo v dveh izoencimskih oblikah: MAO-A in MAO-B. Kodirata ju različna gena na kromosomu X, kar se odraža v različni tkivni razporeditvi in substratni specifičnosti izoencimov, kljub temu pa imata podobni strukturi in molekulski masi, saj si delita 70 % aminokislinskega zaporedja (6).

Ključno vlogo pri njunem delovanju ima prostetična skupina - kovalentno vezani kofaktor flavin-adenin-dinukleotid (FAD), ki na flavinskem delu omogoča katalizirane encimske reakcije (7).

### 1.2.1 Katalitična aktivnost monoamin oksidaz

Reakcije potekajo po mehanizmu oksidativnega deaminiranja, pri katerem kot končna produkta nastajata ustrezni aldehyd in amoniak, hkrati pa se kot stranski produkt sprošča  $H_2O_2$  (Slika 1).



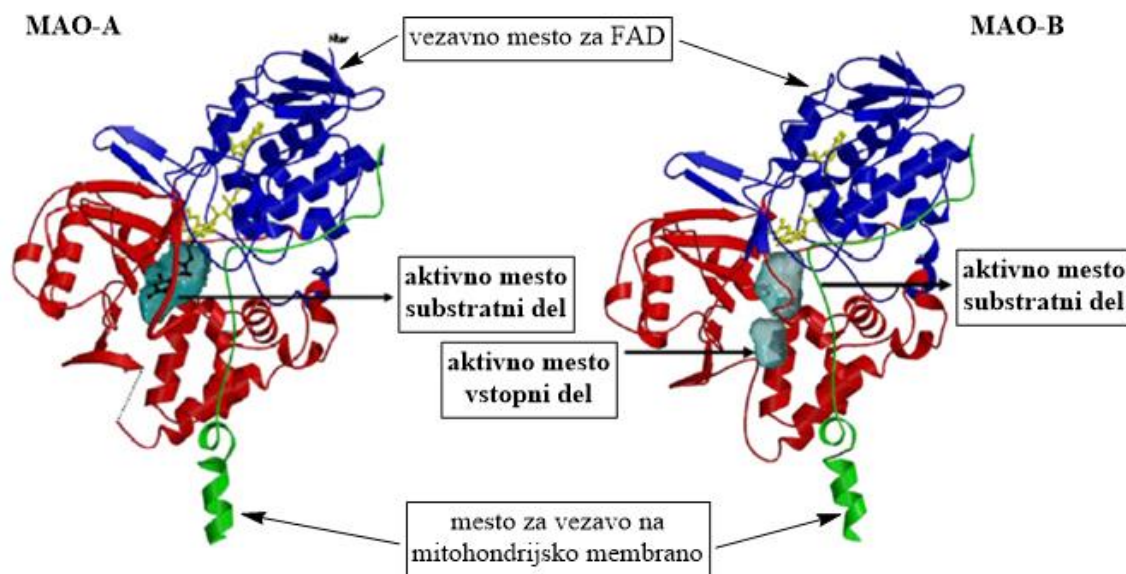
Slika 1: Shema reakcije z MAO (prirejeno po 7)

Reakcija z večino substratov poteka v dveh korakih: v prvem iz amina nastane iminski intermediet, pri čemer se FAD reducira, v drugem pa ga kisik znova oksidira v prvotno obliko, pri čemer nastaja  $H_2O_2$ , iminski intermediet pa v prisotnosti vode neencimsko hidrolizira do amoniaka (Slika 2) (7).

Pri reakciji nastajata potencialno toksična aldehyd, ki ga takoj presnovijo aldehyd-dehidrogenaze (ADH) do karboksilne kisline, in  $H_2O_2$ , ki ga za zaščito pred nastankom radikalov inaktivirajo superoksid-dismutaze (SOD), katalaze in glutation-peroksidaze (8).

### 1.2.2 Struktura in substratna specifičnost izoencimov

Strukturi obeh izoencimov lahko v grobem razdelimo na tri ključne dele, to so mesto za vezavo na mitohondrijsko membrano, vezavno mesto za kofaktor FAD in aktivno mesto - vezavno mesto za substrate oziroma zaviralce (Slika 2) (7).

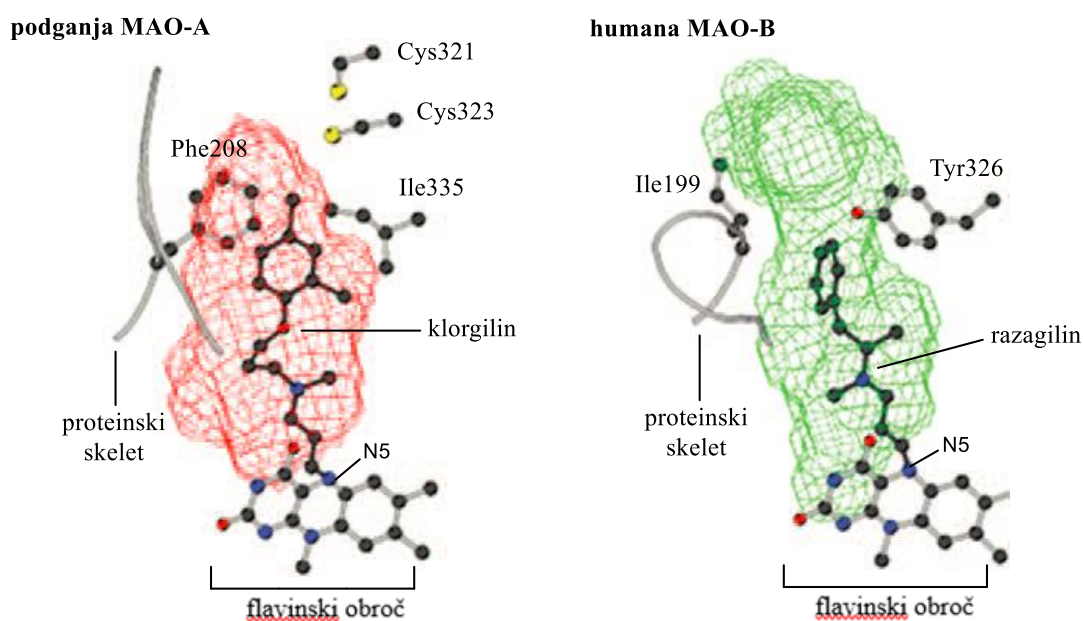


Slika 2: Molekulski strukturi MAO-A in MAO-B (prirejeno po 6)

Pri vezavi na membrano oba izoenzima kristalizirata v obliki dimera (9). Vsak monomer je s transmembransko regijo, sestavljeno iz C-terminalnih delov aminokislin v obliki  $\alpha$ -vijačnice, vsidran v zunanjo membrano mitohondrija, pri čemer je preostali del encima obrnjen proti citoplazmi (4). Za vezavo substrata je ključen kofaktor FAD, ki je na encim vezan s kovalentnimi ter hidrofobnimi in vodikovimi vezmi (7). Substrat se veže na N-5 dušikov atom flavina v FAD v aktivnem mestu in z njim tvori nestabilen kompleks, ki razpade do produkta, v primeru ko se nanj veže ireverzibilni zaviralec, pa med njima nastane kovalentna vez, ki onemogoči delovanje encima (6). Aktivno mesto obeh izoenzimov je hidrofobna votlina, obdana z aminokislinskimi ostanki številnih aromatskih in alifatskih aminokislin na enem in FAD na drugem koncu. Izoenzima se razlikujeta v štirih aminokislinskih ostankih, ki votlino obdajajo, kar je razlog za različno obliko, velikost in substratno specifičnost aktivnih mest. Ostanki Tyr 326, Ile 199 in Leu 171 pri MAO-B namreč predstavljajo prostorske ovire in delujejo kot pregrada, ki aktivno mesto deli na dva dela – na širši substratni del prostornine 42 nm in ožji vstopni del prostornine 29 nm, ki se nahaja bližje površini encima. Ko substrat uspešno doseže vstopni del, pride do zasuca Ile 199 in posledičnega premika pregrade, kar vodi do zlitja votlin v eno in omogoči difuzijo substrata do aktivnega mesta. V primeru MAO-A so ostanki Tyr 326, Ile 199 in Leu 171 zamenjani z Ile 335, Phe 208 in Ile 180, ki ne predstavljajo večjih prostorskih ovir za aktivno mesto, ki ga tako sestavlja le ena hidrofobna votlina prostornine 55 nm. MAO-A posledično presnavlja večje in hidroksilirane molekule, kot sta serotonin

in noradrenalin, substrati MAO-B pa morajo biti majhni ali dovolj ozki, da se lahko prebijejo skozi ozek vstopni del. MAO-B tako presnavlja endogena benzilamin in 2-fenetilamin in majhne eksogene amine, medtem ko sta dopamin in tiramin skupna substrata obeh izoencimov. Pri visokih koncentracijah substratov ali zaviralcev encima substratno specifičnost izgubita (4, 6, 7, 10).

Kristalni strukturi obeh aktivnih mest z vezanima selektivnima zaviralcema sta prikazani na Sliki 3 (kristalna struktura aktivnega mesta humane MAO-A s klogilinom še ni znana).



Slika 3: Strukturi aktivnih mest MAO-A in MAO-B (prirejeno po 4)

### 1.2.3 Tkivna razporeditev in vloga posameznega izoencima

Oba izoencima se nahajata tako v možganih kot v perifernih tkivih. Študije kažejo, da med razvojem zarodka v možganih prevladuje MAO-A, po rojstvu pa začne močno naraščati raven MAO-B, ki narašča tudi med procesom staranja. Najvišja aktivnost MAO v možganih je v hipotalamusu in bazalnih ganglijih, kjer prevladuje MAO-B. MAO-B sicer prevladuje predvsem v serotoninergičnih nevronih, astrocitih in celicah glije, MAO-A pa v kateholaminergičnih nevronih. Njuna vloga je ohranjanje znotrajcelične zaloge lastnih živčnih prenašalcev in prekinitve prenosa signalov, hkrati pa nevrone ščitita pred vdorom eksogenih monoaminov (4). Izoencima se namreč v nekaterih predelih možganov nahajata na nevronih živčnih prenašalcev, ki jih prvenstveno presnavlja drugi izoencim, s čimer eksogenim monoaminom onemogočita dostop do sinaps in preprečita, da bi delovali kot lažni živčni prenašalci (7). Tako lahko, na primer, MAO-B, ki v splošnem ne presnavlja

serotonina, najdemo na serotoninergičnih nevronih, kjer razgradi druge monoamine, ki bi pomotoma zašli do serotoninergičnih nevronov, na drugi strani pa v primeru previsokih koncentracij serotonina izgubi substratno specifičnost in ga presnovi (9). V žilicah krvno-možganske pregrade prevladuje MAO-B, ki možgane ščiti pred vdorom monoaminov iz krvnega obtoka. Zaščitno vlogo ima tudi MAO v perifernih tkivih, kjer bodisi preprečuje vdor monoaminov iz tkiv v kri ali presnavlja monoamine v krvi (4). Nahaja se v večini perifernih tkiv, pri čemer MAO-B prevladuje v trombocitih, v placenti in črevesju pa prevladuje MAO-A (3). Nekoliko manj je raziskana vloga stranskih produktov kataliziranih reakcij, vendar nekatere študije kažejo, da aldehidi, nastali pri presnovi serotonina in noradrenalina, sodelujejo pri uravnavanju spanja in budnosti, medtem ko ima H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pomembno vlogo pri presnovni in signalni funkciji možganov (4).

#### 1.2.4. Monoamin oksidaze kot tarča zdravilnih učinkovin

Vloga MAO je razgradnja monoaminov, iz česar sledi, da zmanjšana aktivnost MAO pomeni višjo raven monoaminskih živčnih prenašalcev in obratno, kar sta pomembna dejavnika pri nastanku številnih nevrodegenerativnih in duševnih boleznih. Aktivnost MAO se povečuje s staranjem, glavni razlog za povečano ali zmanjšano aktivnost encima pri posameznikih pa je polimorfizem v genih za MAO (4, 5).

Povečana aktivnost MAO lahko vodi v nastanek degenerativnih boleznih. Pri kataliziranih reakcijah namreč nastaja stranski produkt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ki je v večjih količinah lahko toksičen, v prisotnosti prehodnih kovin pa z njimi vstopa v Fentonovo reakcijo, pri kateri nastajajo reaktivne kisikove zvrsti (ROS), ki povzročijo nastanek oksidativnega stresa in s sproženjem lipidne peroksidacije poškodujejo okoliška tkiva (9). Zaradi oksidativnega stresa se lahko zmanjša tudi aktivnost ADH, kar vodi v povišane ravni nastalih aldehydov in dodatno pripomore k poškodbam tkiv (11). S staranjem se hkrati z aktivnostjo MAO-B povečuje tudi koncentracija železovih ionov v možganih, kar pomeni večjo verjetnost nastanka nevrodegenerativnih boleznih pri starostnikih (8). Ker je MAO prisotna tudi v perifernih tkivih, pa lahko njena povečana aktivnost zaradi degeneracije celic perifernih tkiv vodi tudi v nastanek pljučnih, ledvičnih in srčnožilnih boleznih (4, 10).

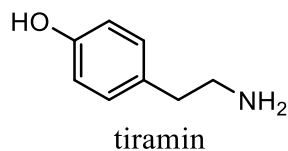
Na drugi strani je prenizka aktivnost MAO-B lahko povezana z osebnostnimi motnjami, kot sta impulzivnost in iskanje pozornosti ter večjo nagnjenostjo k zlorabi psihoaktivnih substanc, prenizke vrednosti MAO-A pa lahko povzročijo nagnjenost k nasilnemu in agresivnemu vedenju, medtem ko lahko povečana aktivnost MAO-A vodi v nastanek

depresije in anksioznosti. MAO je tako obetavna tarča za zdravljenje najrazličnejših duševnih bolezni, kot so depresija, anksioznost, shizofrenija, bipolarna motnja, hiperaktivnost, anoreksija, bulimija, osebnostne motnje in odvisnosti, migren, nevrodegenerativnih bolezni, kot so Parkinsonova, Alzheimerjeva in Huntingtonova bolezen, ter vrste bolezenskih stanj, ki nastanejo kot posledica oksidativnega stresa v telesu (4, 9).

## 1.3 ZAVIRALCI MAO

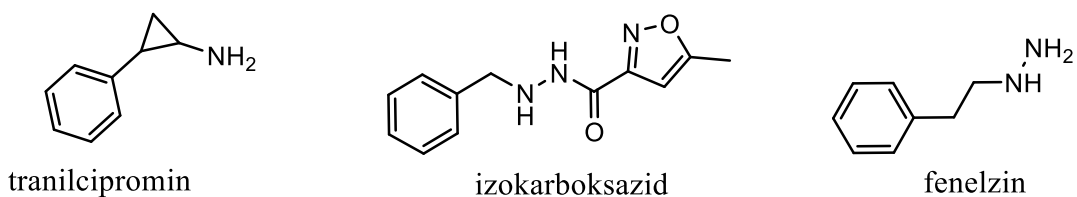
### 1.3.1 Ireverzibilni neselektivni zaviralci MAO in hipertenzivna kriza

Začetki raziskovanja MAO segajo v pozna dvajseta leta prejšnjega stoletja, prve zaviralce MAO pa so po naključju odkrili dobro desetletje pozneje, ko so pri pacientih na terapiji z antituberkulotikom izoniazidom opazili nepričakovani antidepresivni učinek. Iproniazid, derivat izoniazida, je nato postal prvi učinkoviti zaviralec MAO pri zdravljenju depresije in hkrati eden prvih antidepresivov na trgu (8, 12). Zaradi hepatotoksičnosti so ga, hkrati z večino drugih hidrazinskih učinkovin, s trga kmalu umaknili, njegovi nehidrazinski nasledniki pa so povzročali drugi neželeni učinek: hipertenzivno (tiraminsko) krizo (8, 9). Prvi zaviralci MAO so bili namreč ireverzibilni in neselektivni, zato so zavirali tudi MAO v prebavilih in jetrih, ki presnavlja tiramin (Slika 4) in druge simpatikomimetične amine iz hrane. Če encim zaviramo, lahko nerazgrajeni dosežejo sistemski krvni obtok in periferne adrenergične nevrone, kjer povzročijo sproščanje noradrenalina in hudi hipertenzivni odziv, ki se lahko konča s smrtjo. Odziv, ki se je pojavil predvsem pri hkratnem uživanju večjih količin sira, po čemer so ga poimenovali tudi »učinek sira«, je bil glavni razlog za upad načrtovanja zaviralcev MAO.



Slika 4: Struktura tiramina

Kljub temu pa se nekateri neselektivni ireverzibilni zaviralci MAO, kot so fenelzin, tranilcipromin in izokarboksazid (Slika 5), ponekod še danes uporabljajo pri zdravljenju atipičnih oblik depresije ter ob hkratnem upoštevanju prehranskih omejitev z izogibanjem hrani z visoko vsebnostjo tiramina (8).



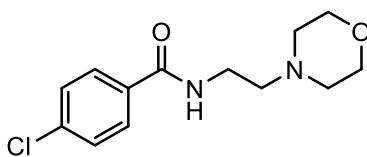
Slika 5: Strukture izbranih neselektivnih ireverzibilnih zaviralcev MAO

### Začetek razvoja selektivnih zaviralcev MAO

Ko so v poznih šestdesetih letih prejšnjega stoletja ugotovili, da MAO obstaja v dveh izooblikah, so z namenom izogniti se neželenim učinkom neselektivnih zaviralcev začeli sintetizirati ireverzibilne selektivne zaviralce MAO-A, kot je klogilin, ki pa je kljub varnejšemu profilu še vedno povzročal tiraminsko krizo. Razvoj antidepresivov se je zato nadaljeval v smeri delovanja na druge tarče, nekateri raziskovalci pa so kljub temu nadaljevali z načrtovanjem zaviralcev MAO, ki ne bi povzročali hipertenzivne krize, kar je privedlo do razvoja ireverzibilnih selektivnih zaviralcev MAO-B ter reverzibilnih kompetitivnih selektivnih zaviralcev MAO-A (8).

### 1.3.2 Selektivni (reverzibilni) zaviralci MAO-A

Selektivni zaviralci MAO-A, ki so trenutno na trgu, so selektivni reverzibilni zaviralci (RIMA), kot je moklobemid, ki je registriran za zdravljenje depresije in socialne fobije (Slika 6).



Slika 6: Struktura moklobemida

Njihova prednost pred ireverzibilnimi zaviralci je, da delujejo po mehanizmu kompetitivnega zaviranja encima, pri čemer lahko monoamini iz hrane v črevesju tekmujejo z zaviralcem za vezavo na encim in ga pri dovolj visokih koncentracijah izpodrinejo, se presnovijo in posledično ne povzročijo hipertenzivne krize (12). Po učinkovitosti pri zdravljenju depresije so RIMA primerljivi s tricikličnimi antidepresivi in zaviralci ponovnega privzem serotonina, hkrati pa so precej manj učinkoviti od ireverzibilnih neselektivnih zaviralcev MAO (13).

### 1.3.3 Selektivni (ireverzibilni) zaviralci MAO-B

Selegilin in razagilin sta edina na trgu prisotna ireverzibilna selektivna zaviralca MAO-B. Registrirana sta za uporabo pri zdravljenju Parkinsonove bolezni.

Selegilin so sprva razvili kot potencialni antidepresiv, ki kot selektivni zaviralec MAO-B ne bi povzročal tiraminske krize, vendar je učinkovito deloval samo pri visokih koncentracijah, pri katerih je zaviral tako MAO-A kot MAO-B, zato so ga začeli uporabljati zgolj v eksperimentalne namene, kjer so z njegovo pomočjo raziskovali vlogo MAO-B v telesu. Na podlagi izsledkov raziskav so pozneje ugotovili, da bi ga kot zaviralca MAO-B, ki prevladuje v bazalnih ganglijih, lahko uporabljali pri zdravljenju Parkinsonove bolezni, pri kateri pride do znižane koncentracije dopamina v tem predelu (8, 14). V te namene ga, samega ali v kombinaciji z L-DOPO, uporabljamo še danes. Kot monoterapija v zgodnjih stadijih bolezni blaži simptome parkinsonizma in odloži potrebo po uvedbi L-DOPE, medtem ko v kombinaciji z L-DOPO poveča njen učinek in omogoči uporabo manjših odmerkov, hkrati pa zmanjša resnost motoričnih fluktuacij, ki jih jemanje L-DOPE lahko povzroči. Rezultati retrospektivnih analiz kažejo, da je število preživelih bolnikov, ki so ob L-DOPI jemali še selegilin, občutno večje od števila tistih, ki so se zdravili zgolj z L-DOPO (15). V splošnem je sprejet kot varna učinkovina, saj v terapevtskih odmerkih ne povzroča resnih neželenih učinkov (15), vendar je njegovalna ključna slabost hkrati simpatikomimetično delovanje (8). Je namreč derivat R-metamfetamina, ki se s citokromom P-450 med drugim presnovi v R-amfetamin. R-enantiomeri amfetaminov so sicer bistveno manj učinkoviti od S-enantiomerov, kljub temu pa lahko zavirajo ponovni privzem noradrenalina in dopamina ter tako potencirajo učinke L-DOPE in hkrati povzročajo srčno-žilne in psihiatrične neželene učinke (3, 6).

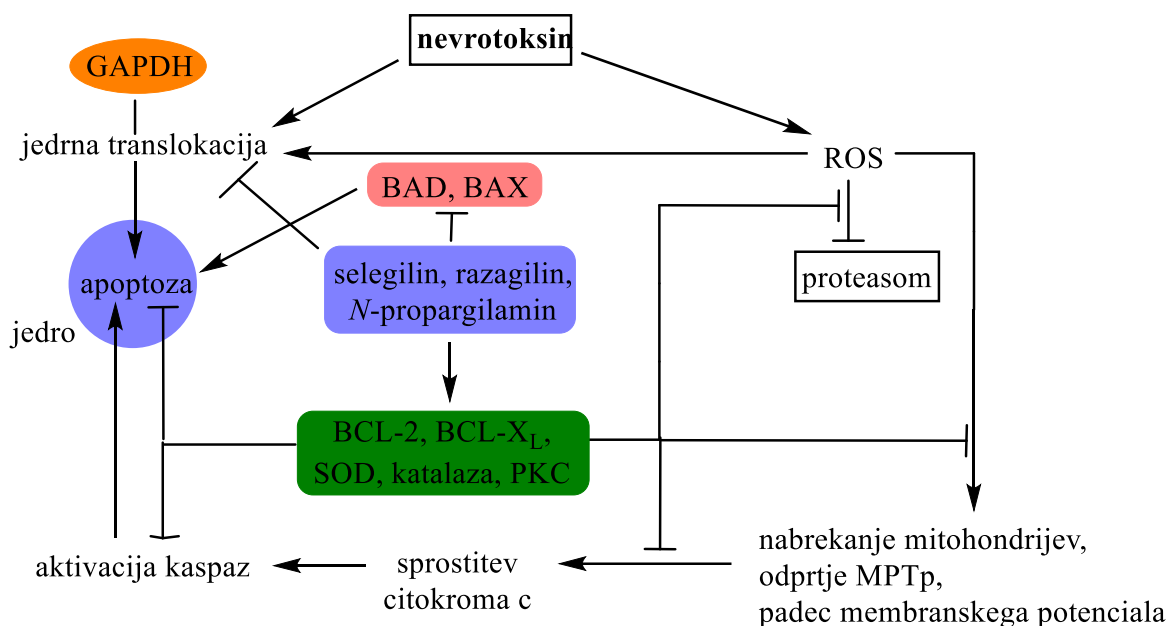
Nasprotno se razagilin, razvit v nadaljnjih raziskavah, zaradi aminoindanske strukture ne presnavlja do amfetaminskih derivatov in je selektiven zgolj za MAO, kar predstavlja veliko prednost pred selegilinom. Sicer deluje po enakem mehanizmu kot selegilin in ga prav tako uporabljamo za zdravljenje Parkinsonove bolezni, pri čemer je 10-krat učinkovitejši od selegilina. Pri visokih odmerkih pa oba zavirata obe izoencimski obliki (6).

Tako selegilin kot razagilin delujeta nevroprotektivno. Razen neposrednega zaviranja nastajanja  $H_2O_2$  zaradi zaviralnega delovanja na MAO in posledično zmanjšanja ravni oksidativnega stresa, delujeta tudi po drugih mehanizmih (Slika 7). Preprečujeta namreč apoptotično celično smrt, sproženo po mitohondrijski poti, ki jo v splošnem sprožijo

notranje poškodbe celice zaradi različnih dejavnikov, vključno z oksidativnim stresom. Pri tem se spremeni prepustnost mitohondrijske membrane, kar povzroči odprtje mitohondrijskega multiproteinskega kompleksa (MPTp), zaradi česar začne mitohondrij nabrekati, hkrati pa upade mitohondrijski membranski potencial. Nato pride do zavrtja ubikvintin-proteasomskega sistema, sproščanja mitohondrijskega citokroma c in posledično aktivacije kaspaz (proteinskih kinaz), ki povzročijo celično smrt. Stabilnost kompleksa MPTp je odvisna od proteinov iz družine Bcl-2: antiapoptotični proteini, kot sta Bcl-2 in Bcl-X<sub>L</sub>, kompleks stabilizirajo, medtem ko ga proapoptotični proteini, kot so Bax, Bad, Bak in Bid, destabilizirajo (16). Selegilin in razagilin proces zavirata tako, da povečata izražanje antiapoptotičnih in zmanjšata izražanje proapoptotičnih proteinov. Hkrati preprečujeta tudi nabrekanje mitohondrijev in padec membranskega potenciala in preprečujeta zaviranje ubikvintin-proteasomskega sistema, s čimer zavreta tudi aktivacijo kaspaz in fragmentacijo DNK (4). Aktivirata tudi protein-kinazo C (PKC), ki s fosforilacijo Bcl-2 vpliva na apoptotični proces, in povečata izražanje nekaterih nevrotrofičnih faktorjev v možganih (17). Povečata tudi aktivnost SOD, katalaze in glutation-peroksidaze (6) in delujeta antiamiloidogeno (18). Neposredno pa učinkujeta z vezavo na gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazo (GAPDH), s čimer preprečita njeno jedrno translokacijo, kar je ključno pri sproženju apoptoze (6).

Selegilin pri visokih koncentracijah izgubi nevroprotektivno delovanje, kar je najbrž posledica amfetaminskih presnovkov, medtem ko aktivni presnovek razagilina R-aminoindan nevroprotektivno delovanje ohranja (18).

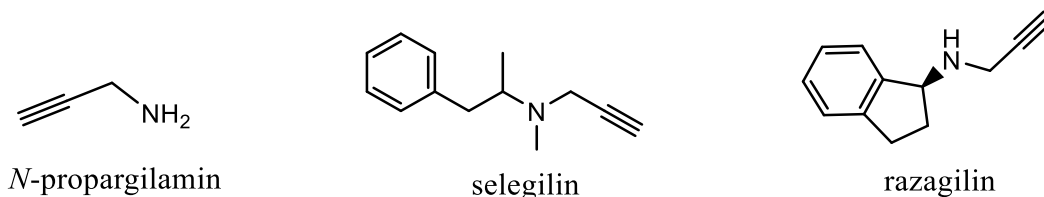




Slika 7: Shematski prikaz antiapoptotičnega delovanja *N*-propargilaminov (prirejeno po 4)

### 1.3.4 Pomen *N*-propargilaminske skupine za nevroprotektivno delovanje

Raziskave odnosa med strukturo in delovanjem kažejo, da po enakih antiapoptotičnih mehanizmih kot selegilin in razagilin deluje tudi *S*-izomer razagilina, ki praktično ne zavira MAO (6). Enako delujeta tudi ladostigil, učinkovina, načrtovana kot hkratni zaviralec MAO in holinesteraz (19), in klogilin, ki selektivno zavira MAO-A (18). Razen tega selegilin deluje nevroprotektivno že pri mnogo nižjih koncentracijah, kot so potrebne za zaviranje MAO-B (6), medtem ko nekatere učinkovine, ki učinkovito zavirajo MAO-B, nevroprotektivnega učinka ne izkazujejo (4). Zaščitni učinek torej ni povezan zgolj z zaviranjem MAO-B, niti MAO v splošnem. Izkazalo se je, da je zanj odgovorna *N*-propargilaminska skupina, skupna vsem navedenim učinkovinom (Slika 8). Dokazano je, da *N*-propargilamin tudi sam po sebi deluje antiapoptotično po zgoraj opisanih mehanizmih, hkrati pa ima kot strukturni fragment selegilina in razagilina ključno vlogo pri njunem nevroprotektivnem delovanju (Slika 7) (17).



Slika 8: Strukture selegilina, razagilina in *N*-propargilamina

### 1.3.5 Zaviralci MAO v terapiji bolezni

Kot omenjeno v prejšnjih poglavjih, so selektivni zaviralci MAO-B trenutno registrirani za uporabo pri zdravljenju Parkinsonove bolezni, selektivni zaviralci MAO-A pa za zdravljenje depresije in socialne fobije. Rezultati mnogih raziskav pa kažejo na potencialno možnost uporabe obojih pri zdravljenju različnih duševnih in degenerativnih bolezni.

#### Zaviralci MAO pri zdravljenju duševnih bolezni

- Pri zdravljenju depresije se zaviralci MAO uporabljajo že več desetletij, pri čemer je za njihovo delovanje ključno zaviranje MAO-A s posledičnim povišanjem koncentracij serotonina, noradrenalina in dopamina v možganih (4). Kljub temu da selektivno zaviranje MAO-B ne povzroča antidepresivnega delovanja, pa se je izkazalo, da ima uporaba visokih odmerkov selegilina antidepresivni učinek, kar lahko razložimo z izgubo substratne specifičnosti encima pri visokih koncentracijah zaviralca. Na podlagi teh ugotovitev so znanstveniki razvili transdermalni dostavni sistem selegilina, s čimer so z neselektivnim zaviranjem obeh izoencimov v možganih uspešno dosegli antidepresivno delovanje, hkrati pa se izognili tako metabolizmu prvega prehoda v jetrih in nastanku amfetaminskih stranskih produktov, kot stranskim učinkom presnove v črevesu (hipertenzivni krizi). Preizkušali so tudi raztopino selegilina za bukalno uporabo, ki je prav tako izkazovala antidepresivni učinek brez hipertenzivne krize in dosegla primerljive plazemske koncentracije pri 1/8 odmerka, kar kaže na to, da bi lahko selektivne zaviralce MAO-B v primerni farmacevtski obliki uporabljali tudi za zdravljenje depresije brez neželenih učinkov na periferna tkiva (6, 13).
- V raziskavi vpliva selegilina na ADHD se je izkazalo, da občutno izboljša motnje pozornosti, preizkušali pa so ga tudi pri zdravljenju odvisnosti od kokaina, kjer so ugotovili, da peroralni odmerek 10 mg dnevno zmanjša uživanje kokaina, v transdermalnem sistemu pa zmanjša z uživanjem kokaina povezana obdobja napetosti in jeze ter hrepenenje po novih odmerkih (13).

#### Zaviralci MAO pri zdravljenju degenerativnih bolezni

Zaviralci MAO z zmanjšanjem nastajanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in posledičnim zmanjšanjem oksidativnega stresa v telesu pripomorejo k zdravljenju degenerativnih bolezni živčevja in perifernih tkiv. Najobetavnejši so selektivni zaviralci MAO-B, saj ta v možganih predstavlja 75 % aktivnosti MAO (20), k delovanju pa prispeva tudi hkratno antiapoptotično delovanje *N*-

propargilaminskega fragmenta teh učinkovin (17). Razagilin tako dokazano za polovico zmanjša lipidno peroksidacijo, njegovo kronično jemanje pa poveča obrambne sposobnosti telesa proti oksidativnemu stresu (5).

- Selegilin in razagilin sta že uveljavljena pri zdravljenju Parkinsonove bolezni, ki nastane predvsem zaradi selektivnega propadanja dopaminskih nigro-striatnih nevronov in posledičnega pomanjkanja dopamina v striatumu, kjer prevladuje MAO-B (4, 21). V možganih bolnikov je povečana količina železovih ionov, zmanjšana količina feritina (21) ter znižani ravni glutationa (8) in ADH (4), kar pripomore k povečanju oksidativnega stresa, ki je v dopaminskih nevronih zaradi metabolizma dopamina prisoten že v fizioloških razmerah, zaradi česar dopaminski nevroni odmirajo hitreje od drugih nevronov (21). Pri razviti bolezni se oksidativni stres še dodatno poveča, ker se zaradi propadanja nevronov v drugih predelih poveča presnova dopamina v substanci nigri. Zaviranje MAO-B tako učinkuje dvojno: na eni strani zmanjšuje oksidativni stres, hkrati pa s povišanjem koncentracije dopamina blaži simptome parkinsonizma (21).
- Raziskave kažejo, da imajo zaviralci MAO zaščitni učinek na nevrone tudi pri Alzheimerjevi bolezni, pri kateri je aktivnost MAO-B v možganih povečana, dodatno pa se povečuje s staranjem, kar pomembno vpliva na nastanek amiloidnih plakov in neurofibrilarnih pentelj, značilnih za to bolezen. Zaviralci MAO sprožijo signalne poti za določene proteinske kinaze, zmanjšujejo nastanek plakov in izboljšujejo miselne sposobnosti (22).
- Razagilin se je v raziskavah izkazal za učinkovitega pri zdravljenju amiotropične lateralne skleroze, poročajo pa tudi o koristnem učinku selegilina v kombinaciji s selektivnim zaviralcem ponovnega privzema serotonina fluoksetinom pri Huntingtonovi bolezni (4).
- Zaviralci MAO naj bi ugodno vplivali tudi pri zdravljenju bolezni perifernih tkiv. V primeru ko je srce izpostavljeno kroničnemu nevrohormonalnemu ali hemodinamskemu stresu, se namreč poviša koncentracija kateholaminov in njihova presnova z MAO, kar vodi v povišano koncentracijo  $H_2O_2$ .  $H_2O_2$  pri nizkih koncentracijah povzroča hipertrofijo in proliferacijo kardiomiocitov, pri višjih pa poškoduje mitohondrije, kar lahko vodi do srčnega infarkta in posledično cerebralne ishemije. Študije kažejo, da selegilin z zmanjšanjem nastajanja ROS zmanjšuje poškodbe tkiva po infarktu in možganske poškodbe po cerebralni ishemiji (11). Kaže

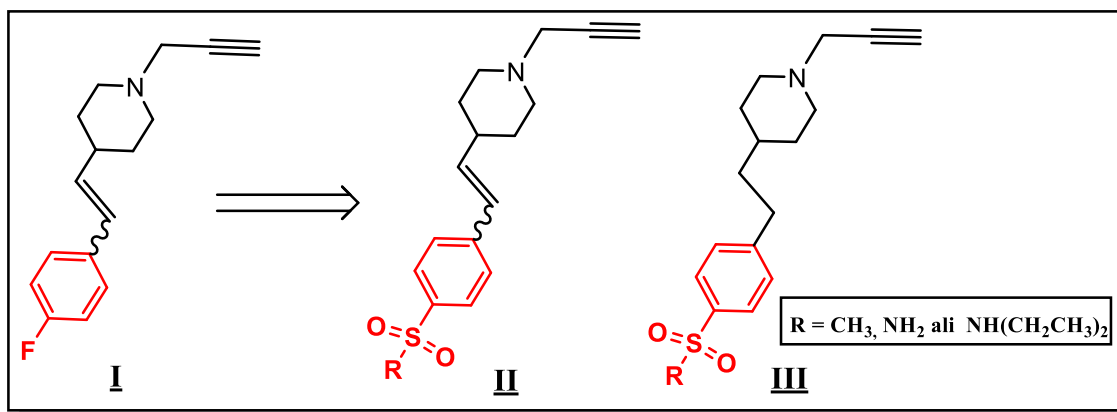
tudi, da bi lahko imeli zaviralci MAO-B pomembno vlogo pri preprečevanju endotelijske disfunkcije arterij pri bolnikih s koronarno srčno boleznijo (23), hkrati pa selegilin zavira vnetje in oksidativni stres v epitelnih celicah dihalnih poti, povzročen zaradi vdihovanja cigaretnega dima, in tako lahko učinkuje pri zdravljenju bolezni pljuč (24).

## 2. NAČRT ZA DELO

Z izsledki številnih raziskav, ki potrjujejo nevroprotektivno delovanje ireverzibilnih selektivnih zaviralcev MAO-B, je zanimanje za njihovo načrtovanje v zadnjih letih začelo znova naraščati. Kaže namreč, da bi se lahko dobro obnesli pri zdravljenju številnih, predvsem s staranjem povezanih bolezenskih stanj. Ker sta selegilin in razagilin edina registrirana predstavnik za uporabo pri Parkinsonovi bolezni, bo glavni namen našega raziskovalnega dela sintetizirati nove ireverzibilne zaviralce MAO-B. Ker geometrijski izomer *trans* (spojina **I** na Sliki 9 v *trans* konfiguraciji) in nasičeni derivat spojine, na osnovi katere bomo sintezo načrtovali, selektivno zavirata MAO-B, medtem ko *cis* izomer (spojina **I** na Sliki 9 v *cis* konfiguraciji) izkazuje zaviralno aktivnost tudi na MAO-A (25), bomo s sintezo obeh strukturnih izomerov in nasičenega derivata skušali hkrati pridobiti tudi potencialne nove selektivne zaviralce MAO-A s hkratnim nevroprotektivnim delovanjem.

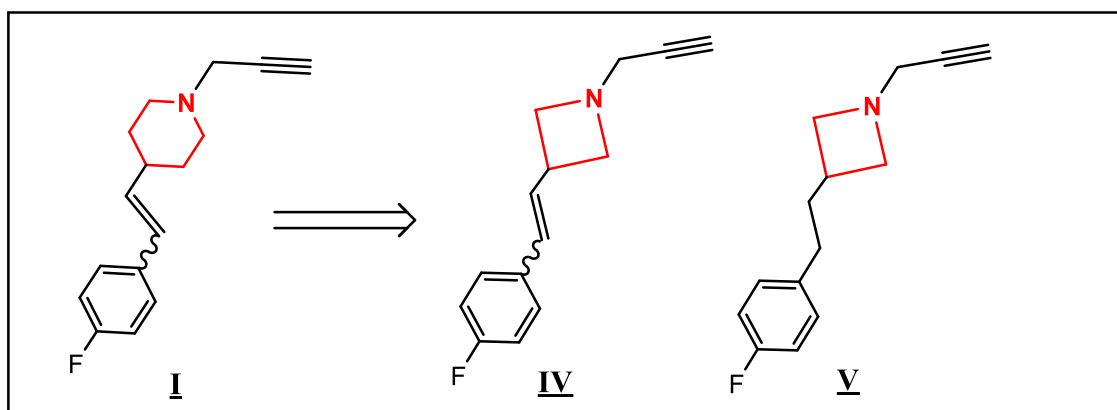
Izhajali bomo iz spojine *4-(4-fluorostiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina*, predhodno sintetizirane na Fakulteti za farmacijo (25). Pri sintezi novih spojin bomo ohranili *N*-propargilaminsko skupino, ki je odgovorna za kovalentno vezavo v aktivno mesto encima, hkrati pa ključna za nevroprotektivno delovanje spojin. S fenilnimi substituenti bomo ohranili  $\pi$ - $\pi$  interakcije s tirozinskimi ostanki v aktivnem mestu. Da bi izboljšali delovanje spojine na tarčo, bodo naši cilji:

1. Sintetizirati *cis*, *trans* in nasičene analoge spojine **I**, pri katerih bomo ohranili piperidinski osnovni skelet, 4-fluorofenilni substituent pa zamenjali s tremi različnimi sulfonilfenilnimi substituenti (spojine **II** in **III**). Tako bomo povečali polarnost spojin in izboljšali njihovo vodotopnost, hkrati pa omogočili potencialno tvorbo vodikovih vezi v aktivnem mestu encima. Sulfonilne funkcionalne skupine so sicer že dobro uveljavljeni strukturni fragmenti mnogih skupin zdravilnih učinkovin in se v telesu dokazano dobro obnesejo (26).



Slika 9: Shema načrtovanja piperidinskih analogov

- Razviti sintezni postopek in sintetizirati *cis*, *trans* in nasičene analoge z azetidinskim osnovnim skeletom (spojine **IV** in **V**), pri čemer bomo ohranili 4-fluorofenilni substituent. Tako bomo skušali pridobiti manjše molekule, ki še lažje dosežejo aktivno mesto tarče, hkrati pa ohranijo ključne strukturne fragmente.



Slika 10: Shema načrtovanja azetidinskih analogov

- Uspešno sintetiziranim spojinam ovrednotiti zaviralno delovanje na humanih encimih MAO-A in MAO-B.

## 3. MATERIALI IN METODE

### 3.1. MATERIALI

#### 3.1.1 Reagenti in topila

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili komercialno dostopna topila in reagente proizvajalcev Acros Organics, Merck, Sigma-Aldrich, Carlo Erba, Gram-mol in Kemika brez predhodne predpriprave.

#### 3.1.2 Ostala laboratorijska oprema

Uporabljali smo standardno laboratorijsko opremo: analitsko tehtnico Mettler Toledo, rotavapor Büchi, magnetno mešalo IKA-Werke, sušilnik BINDER Series FD, UV-svetilko CAMAG UV-Cabinet II in vakuumsko črpalko.

### 3.2 METODE

#### 3.2.1 Kromatografske metode

Tankoplastna kromatografija (TLC): S TLC smo spremljali potek reakcij, iskali primerne mobilne faze za ločevanje s kolonsko kromatografijo in spremljali ločbo na kromatografski koloni med izolacijo in čiščenjem. Uporabljali smo kromatografske plošče Fertigplatten Silikagel 60 F<sub>254</sub> proizvajalca Merck, pri katerih je stacionarno fazo predstavljal silikagel z debelino nanosa 0,20 mm na aluminijastem nosilcu velikosti 20 × 20 cm. Kot mobilno fazo smo uporabljali različne kombinacije topil, sestava vsake je navedena pri posameznem sinteznem postopku v poglavju Eksperimentalno delo. Spojine na kromatografskih ploščah smo detektirali z UV-svetlobo, pri čemer smo uporabili UV svetilko z valovno dolžino  $\lambda = 254$  nm in orositvena reagenta ninhidrin ter 3,4-dinitrofenilhidrazin.

Kolonska kromatografija: S kolonsko kromatografijo smo ločevali strukturne izomere produktov Wittigove reakcije in čistili vse končne produkte. Uporabljali smo steklene kolone različnih velikosti. Kot stacionarno fazo smo uporabili Silikagel 60 proizvajalca Merck z velikostjo delcev 0,040-0,063 mm, kot mobilno fazo pa različne kombinacije topil, navedene v poglavju Eksperimentalno delo pri posameznem sinteznem postopku. Uporabili smo tudi pesek proizvajalca Sigma-Aldrich.

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC): S tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti smo določali čistost končnih spojin. Uporabili smo kolono Agilent Eclipse Plus C18 ( $4,6 \times 150$  mm,  $5 \mu\text{m}$ ) s hitrostjo pretoka MF 1,0 ml/min in detekcijo pri valovni dolžini 220 nm. Elucijski sistem sta sestavljali topila A (0,1 % TFA (v/v) v  $\text{H}_2\text{O}$ ) in B (MeCN). Sestava mobilne faze je bila prvih 12 minut 10 % B  $\rightarrow$  90 % B v A, med 12. in 14. minuto se je sestava spremenila na 90 % B v A ter med 14. in 15. minuto na 90 % B  $\rightarrow$  10 % B v A. Analiza je potekala 15 minut pri temperaturi  $25^\circ\text{C}$ .

### 3.2.2 Spektroskopske metode

Jedrska magnetna resonanca (NMR): Snemali smo  $^1\text{H}$ -NMR spektre vseh sintetiziranih spojin in  $^{13}\text{C}$ -NMR spektre končnih spojin. Vse spektre smo posneli na Fakulteti za farmacijo s spektrometrom Bruker Avance III. Uporabljali smo devterirana topila  $\text{CDCl}_3$  in  $\text{DMSO}-d_6$ , kot interni standard smo uporabili TMS ( $\delta$  0,00 ppm), snemali pa pri frekvenci 400 MHz ( $^1\text{H}$ -NMR spektri) in 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ -NMR spektri). Spektre smo procesirali s programom MestRe-C 4.8.6.0 proizvajalca Mesterlab Research S.L. Rezultate smo podali kot kemijski premik ( $\delta$ ) v ppm. Za oblike vrhov smo uporabili standardne oznake: s (singlet), rs (razširjeni singlet), d (dublet), dd (dublet dubleta), t (triplet), q (kvartet) in m (multiplet). Sklopitvene konstante ( $J$ ) smo podali v hertzih (Hz).

Masna spektroskopija: Masne spektre spojin so posneli na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani s tehniko ESI in HRMS na masnem spektrometru VG-Analytical Autospec Q proizvajalca Micromass.

Infrardeča spektroskopija (IR): IR spektre spojin vseh končnih spojin smo posneli na Fakulteti za farmacijo z IR spektrofotometrom Perkin Elmer 1600 FT-IR in jih računalniško obdelali s programom Omnic E.S.P.5.2.

### 3.2.3 Določanje tališč

Tališča smo določili vsem sintetiziranim spojinam v trdnem agregatnem stanju. Uporabili smo Koflerjev mikroskop z ogrevalno mizico proizvajalca Leica in termometrom 52 II Thermometer proizvajalca Fluke.



### 3.2.4 Risanje in poimenovanje spojin

Za risanje in poimenovanje spojin smo uporabili računalniški program ChemDraw Professional 16.0 podjetja CambridgeSoft.

### 3.2.5 Encimski testi

Vsem končnim sintetiziranim spojinam smo ovrednotili zaviralno delovanje na encimih MAO-A in MAO-B. Uporabili smo rekombinantne humane MAO, izražene v insektnih celicah, okuženih z rekombinantnim bakulovirusom (Sigma Aldrich). Najprej smo pripravili raztopine spojin različnih koncentracij v 100 % DMSO in z njimi 15 min pri 37°C inkubirali količino encima MAO-A in MAO-B, potrebno za oksidacijo 165 pmol *p*-tiramina/min. Nato smo dodali 200 µM reagenta Amplex® Red, 2 U/ml hrenove peroksidaze in 1 mM *p*-tiramina. Encima in reagenti so bili raztopljeni v fosfatnem pufru (0,05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH smo s fosforno kislino uravnali na 7,4) z dodatkom reagenta Triton-X114 (0.05 % (v/v)). Tiramin je skupni substrat za MAO-A in MAO-B, ki ga oksidativno deaminirata. Pri reakciji nastaja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ki v prisotnosti hrenove peroksidaze reagira z reagentom Amplex® Red v razmerju 1:1 in ga oksidira v rdeče obarvani fluorescentni produkt resorufin. Fluorescenca je tako sorazmerna množini nastalega H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in posledično aktivnosti encima. Merili smo jo pri valovni dolžini 590 nm v linearnem območju 15 min. Rezidualno aktivnost (RA), ki predstavlja razmerje aktivnosti encima v prisotnosti zaviralca in njegovi odsotnosti, smo določili vsem spojinam in jo izračunali kot razmerje med hitrostjo naraščanja fluorescence v prisotnosti spojine pri koncentraciji 100 µM in njeni odsotnosti. Uporabili smo enačbo:

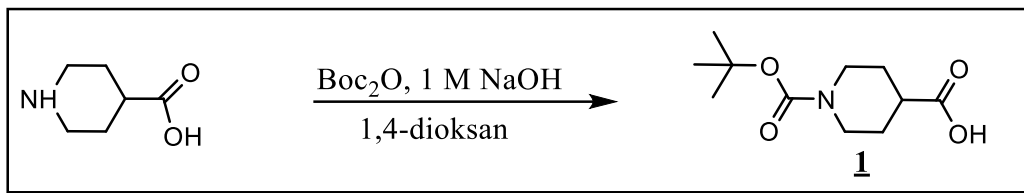
$$RA (\%) = (v_i - b)/(v_0 - b) \times 100 \% ;$$

$v_i$ : hitrost naraščanja fluorescence v prisotnosti spojine;  $v_0$ : hitrost naraščanja fluorescence v odsotnosti spojine;;  $b$ : hitrost naraščanja fluorescence v odsotnosti encima (slepa vrednost).

Spojine, ki so encim pri 100 µM zavrle za 50 % ali več ( $RA < 50 \%$ ), smo testirali pri različnih koncentracijah in z uporabo Hillove enačbe izračunali še IC<sub>50</sub> - koncentracijo spojine, pri kateri je  $RA = 50 \%$ .

## 4. EKSPERIMENTALNO DELO

### 4.1 Sinteza 1-(*tert*-butoksikarbonil)piperidin-4-karboksilne kisline (**1**)



Slika 11: Reakcijska shema za spojino 1

#### Sintezni postopek 1:

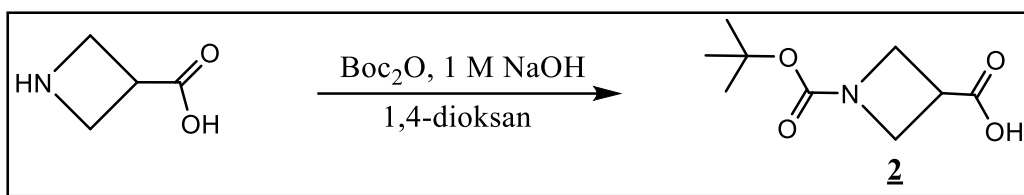
V zmesi 1,4-dioksana (35 ml) in 1M NaOH (55 ml) smo raztopili piperidin-4-karboksilno kislino (7,0 g; 54,2 mmol). Reakcijsko zmes smo na ledeni kopeli ohladili do 0°C, nato pa med mešanjem po kapljicah dodajali raztopino di-*tert*-butil dikarbonata ( $\text{Boc}_2\text{O}$ ) (14,2 g; 65,0 mmol) v 1,4-dioksanu (40 ml) približno 10 min. Nastalo suspenzijo smo pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Nato smo pod znižanim tlakom odparili topilo do približno polovice prvotne prostornine, vodni preostanek pa prenesli v lij ločnik, kjer smo ga ekstrahirali z etilacetatom (2 x 50 ml). Po ekstrakciji smo združeni vodni fazi na ledeni kopeli z 2 M HCl nakisali do pH 2-3, izoborjeni produkt pa odfiltrirali s presesavanjem, sprali s hladno prečiščeno vodo (50 ml) in 30 min sušili v sušilniku pri 50°C.

Izkoristek reakcije: 95 %

Razpredelnica I: Analizni podatki za spojino 1

<b>izgled:</b> bela amorfna snov	<b>tališče</b> [°C]: 158-160 lit (27): 148–150 °C	<b>R<sub>f</sub></b> = 0,68 (MF: etilacetat/heksan = 2/1)
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ = 1,45 (s, 9H, 3x CH <sub>3</sub> ); 1,63-1,70 (m, 2H, 2xCH-piperidin); 1,87-1,94 (m, 2H, 2xCH-piperidin); 2,48 (tt, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 10,8 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 4,0 Hz, CH-piperidin); 2,82-2,90 (m, 2H, 2xCH-piperidin); 4,03 (td, 2H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 13,6 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 3,6 Hz, 2x CH-piperidin); 9,10 (rs, 1H, COOH) ppm		

## 4.2 Sinteza 1-(*tert*-butoksikarbonil)azetidin-3-karboksilne kisline (**2**)



Slika 12: Reakcijska shema za spojino 2

Spojino **2** smo sintetizirali po sinteznem postopku 1.

Količine uporabljenih reagentov:

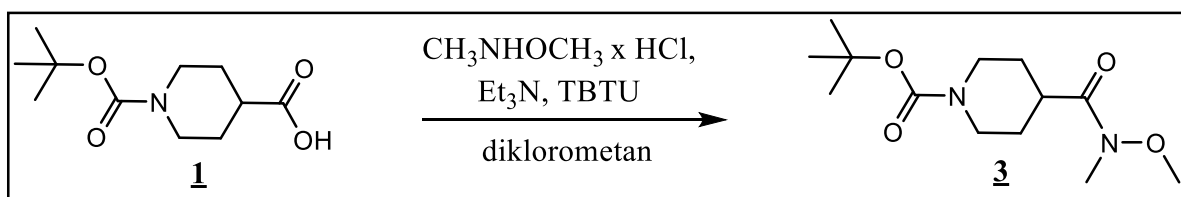
- azetidin-3-karboksilna kislina: 3,03 g; 30,0 mmol
- di-*tert*-butil dikarbonat: 7,86 g; 36,0 mmol; v 1,4-dioksanu: 26 ml
- 1,4-dioksan: 20 ml
- 1 M NaOH: 30 ml

Izkoristek reakcije: 78 %

Razpredelnica II: Analizni podatki za spojino 2

<b>izgled:</b> bela amorfna snov	<b>tališčel[°C]:</b> 84-87	<b>R<sub>f</sub></b> = 0,21 (MF: etilacetat/heksan = 2/1)
<b>ESI-MS:</b> izmerjena za C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>4</sub> (M-H): 199,94		
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ = 1,44 (s, 9H, 3x CH <sub>3</sub> ); 3,39 (quint, 1H, J = 7,5 Hz, CH); 4,13 (d, 4H, J = 7,5 Hz, 2x CH <sub>2</sub> ) ppm		

## 4.3 Sinteza *tert*-butil 4-(metoksi(metil)karbamoil)piperidin-1-karboksilata (**3**)



Slika 13: Reakcijska shema za spojino 3

Sintezni postopek 2:

1-(*tert*-butoksikarbonil)piperidin-4-karboksilno kislino (10 g; 43,61 mmol) smo raztopili v diklorometanu (150 ml) in nastalo raztopino na ledeni kopeli ohladili do 0°. Ohlajeni raztopini smo najprej dodali trietilamin (15,11 ml; 109,03 mmol), nato O-(benzotriazol-1-

il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronijev tetrafluoroborat-TBTU (14,7 g; 45,78 mmol), po 30 min mešanja pri 0 °C pa še *N,O*-dimetilhidroksilaminijev klorid (5,10 g; 52,32 mmol). Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Nastalo raztopino smo prenesli v lij ločnik, kjer smo jo spirali z nasičeno vodno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 x 100 ml), 1M HCl (1 x 100 ml) in nasičeno vodno raztopino NaCl (1 x 100 ml). Združene organske faze smo posušili z brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in topilo odparili pod znižanim tlakom.

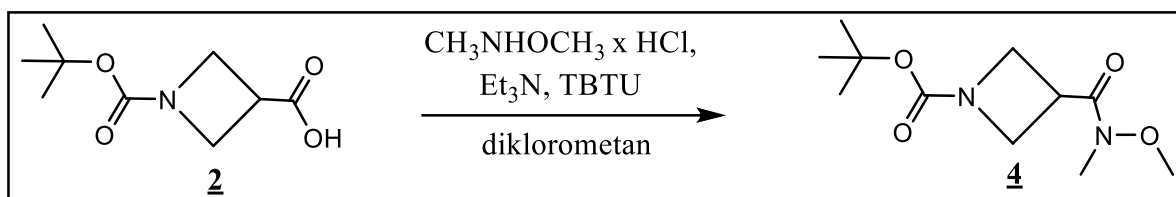
Izkoristek reakcije: 82,4 %

Razpredelnica III: Analizni podatki za spojino 3

<b>izgled:</b> bela amorfna snov	<b>tališče[°C]:</b> 68-72	<b>R<sub>f</sub></b> = 0,65 (MF: etilacetat/heksan = 1/2)
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ = 1,45 (s, 9H, 3x CH <sub>3</sub> ); 1,51-1,63 (m, 4H, 4x CH-piperidin); 2,73-2,83 (m, 3H, 3x CH-piperidin); 3,18 (s, 3H, NCH <sub>3</sub> ); 3,70 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ); 4,15 (td, 2H, J <sub>1</sub> = 13,6 Hz, J <sub>2</sub> = 3,2 Hz, 2x CH-piperidin ) ppm		

#### 4.4 Sinteza *terc*-butil 3-(metoksi(metil)karbamoil)azetidin-1-karboksilata

(4)



Slika 14: Reakcijska shema za spojino 4

Spojino **4** smo sintetizirali po sinteznem postopku 2.

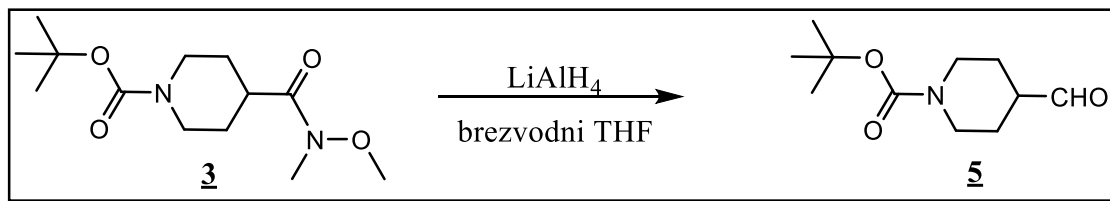
Količine uporabljenih reagentov:

- spojina **2**: 4,68 g; 23,26 mmol
- Et<sub>3</sub>N: 8,06 ml; 58,16 mmol
- TBTU: 7,84 g; 24,42 mmol
- *N,O*-dimetilhidroksilamin hidroklorid: 2,72 g; 27,91 mmol
- CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: 80 ml

Izkoristek reakcije: 98 %

<b>izgled:</b> brezbarvno olje	<b>tališčel</b> [°C]: / (olje)	<b>R<sub>f</sub></b> = 0,39 (MF: etilacetat/heksan = 2/1)
<b>ESI-MS:</b> izmerjena za C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Na (M+Na) <sup>+</sup> : 266,94		
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ = 1,43 (s, 9H, 3x CH <sub>3</sub> ); 2,80 (s, 1H, azetidin-H); 3,21 (s, 3H, NCH <sub>3</sub> ); 3,66 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ); 4,02-4,14 (m, 4H, 4x azetidin-H) ppm		

#### 4.5 Sinteza *tert*-butil 4-formilpiperidin-1-karboksilata (**5**)



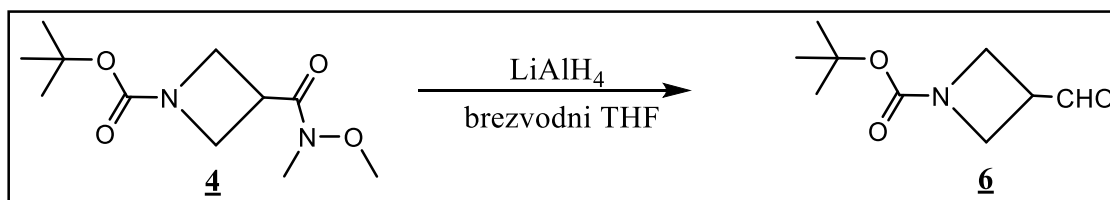
Slika 15: Reakcijska shema za spojino 5

##### Sintezni postopek 3:

Spojino **3** (12 g; 44,07 mmol) smo na ledeni kopeli raztopili v brezvodnem THF (100 ml) in raztopino v inertni argonovi atmosferi mešali 10 min. Nato smo postopoma dodali LiAlH<sub>4</sub> (2,51 g; 66,11 mmol) in reakcijsko zmes pustili mešati še 2 uri. Po 2 urah smo reakcijo ustavili s postopnim dodajanjem nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub> (60 ml) po kapljicah in nastalo suspenzijo prenesli v lij ločnik, kjer smo jo spirali najprej z etilacetatom (3 x 100 ml), združene organske faze pa nato še s prečiščeno vodo (1 x 100 ml) in z nasičeno raztopino NaCl (1 x 100 ml) ter jih na koncu posušili z brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom, rumen oljnat produkt pa takoj uporabili v naslednji reakcijski stopnji.

Izkoristek reakcije: 90,3 %

#### 4.6 Sinteza *tert*-butil 3-formilazetidin-1-karboksilata (**6**)



Slika 16: Reakcijska shema za spojino 6

Spojino **6** smo sintetizirali po sinteznem postopku 3.

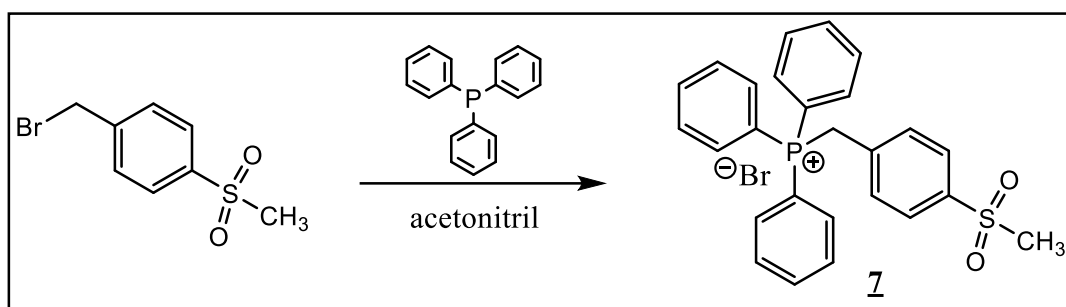
Količine uporabljenih reagentov:

- spojina **4**: 2,5 g; 10,23 mmol
- LiAlH<sub>4</sub> (0,583 g; 15,35 mmol)
- brezvodni THF: 25 ml

Izkoristek reakcije: 85 %

Spojino **6** smo takoj uporabili pri sintezi spojin **14** in **15**.

#### 4.7 Sinteza (4-(metilsulfonil)benzil)trifenilfosfonijevega bromida (**7**)



Slika 17: Reakcijska shema za spojino 7

Sintezni postopek 4:

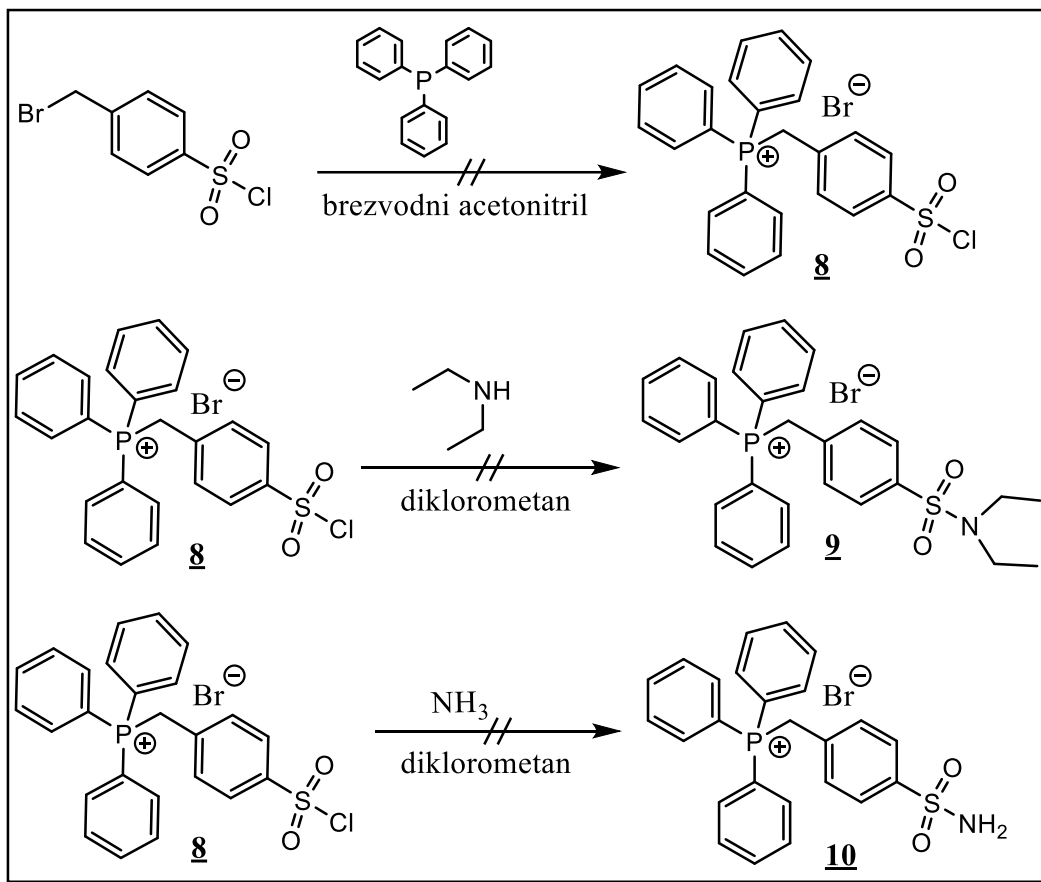
Raztopini 4-metilsulfonilbenzil bromida (1,12 g; 4,5 mmol) v acetonitrilu (15 ml) smo pri sobni temperaturi dodali trifenilfosfin (1,18 g; 4,5 mmol). Reakcijsko zmes smo pustili mešati 24 ur pri 85 °C. Nato smo pod znižanim tlakom odparili topilo, suhemu preostanku dodali etilacetat (30 ml), produkt filtrirali s presesavanjem in ga posušili na zraku pri sobni temperaturi čez noč.

Izkoristek reakcije: 97 %

Razpredelnica V: Analizni podatki za spojino 7

<b>izgled:</b> beli kristali	<b>tališče</b> [°C]: 266-269	<b>R<sub>f</sub></b> = 0
<b>ESI-HRMS:</b> izmerjena za C <sub>26</sub> H <sub>25</sub> SO <sub>2</sub> PBr (M+H) <sup>+</sup> : 431,88		
<b>1H-NMR (400 MHz, DMSO):</b> δ = 3,20 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ); 5,36 (d, 2H, J= 16,3 Hz, CH <sub>2</sub> ); 7,1-7,24 (m, 2H, ArH); 7,67-7,80 (m, 14H, ArH); 7,90-7,95 (m, 3H, ArH) ppm		

#### 4.8 Sinteza (4-*N,N*-dietilsulfamoil)benzil)trifenilfosfonijevega bromida (**9**) in trifenil(4-sulfamoilbenzil)fosfonijevega bromida (**10**)



Slika 18: Reakcijska shema za spojini 9 in 10

##### Sintezni postopek 5:

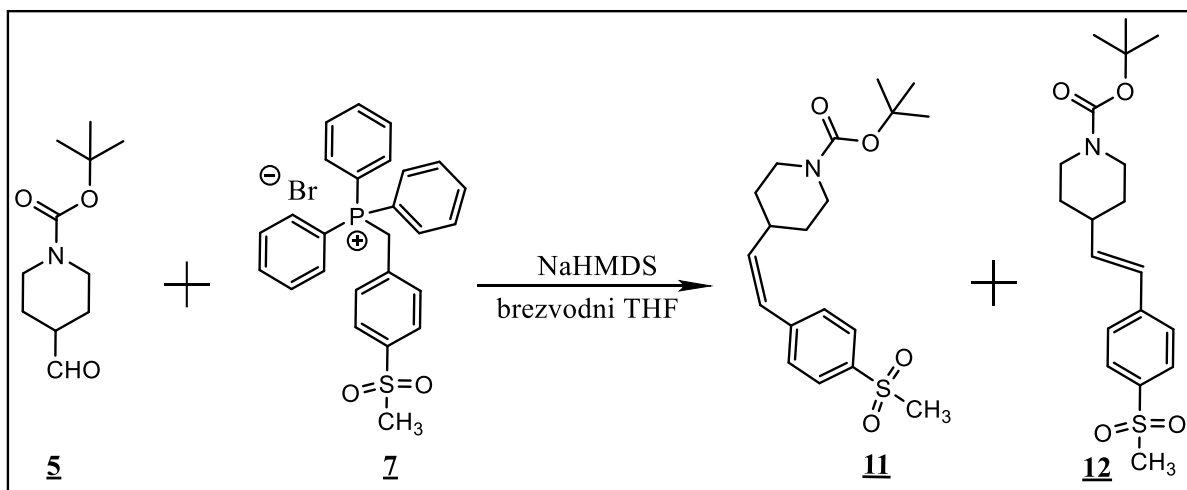
Raztopini 4-bromometilbenzensulfonil klorida (0,93 g; 3,47 mmol) v brezvodnem acetonitrilu (15 ml) smo dodali trifenilfosfin (0,96 g; 3,47 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali najprej 10 min pri sobni temperaturi, nato 1 h pri 85°C pod refluxom, nato pa čez noč počasi ohlajali do sobne temperature. Nastalo raztopino smo spirali z acetonitrilom (10 ml) in topilo odparili pod znižanim tlakom. Rumena oljnat preostanek (spojina **8**) smo razdelili na dva enaka dela.

V 50 ml bučko smo prenesli polovično količino vmesnega produkta in mu dodali raztopino dietilamina v diklorometanu (538  $\mu$ l; 5,21 mmol) in diklorometan (10 ml). Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Nastalo raztopino smo nato spirali z etilacetatom (50 ml), oborino filtrirali s presesavanjem, pod znižanim tlakom odparili približno 2/3 topila in produkt izolirali s kristalizacijo iz petroletra.

Preostalo polovico vmesnega produkta smo prenesli v drugo 50 ml bučko in dodali raztopino NH<sub>3</sub> v metanolu (1 ml) ter diklorometan (10 ml). Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi, produkt pa izolirali po enakem postopku kot produkt v prvi bučki.

Izkoristek reakcije: Glede na kromatogram in NMR smo ugotovili, da reakcije niso potekle.

#### 4.9 Sinteza *tert*-butil (*Z*)-4-(4-(metilsulfonil)stiril)piperidin-1-karboksilata (**11**) in *tert*-butil (*E*)-4-(4-(metilsulfonil)stiril) piperidin-1-karboksilata (**12**)



Slika 19: Reakcijska shema za spojini 11 in 12

##### Sintezni postopek 6:

Vse korake sinteze smo izvajali v inertni argonovi atmosferi. Spojino **7** (1,94 g; 4,5 mmol) smo najprej raztopili v brezvodnem THF (30 ml). Nato smo pri sobni temperaturi dodali 2M raztopino NaHMDS v THF (2,45 ml; 4,9 mmol), raztopino pustili mešati 30 min in nato previdno po kapljicah dodajali spojino **5** (0,94 g; 4,1 mmol), raztopljeno v brezvodnem THF (10 ml). Reakcijsko zmes smo pustili mešati na sobni temperaturi čez noč. Po 17 h smo reakcijo ustavili s počasnim dodajanjem nasičene vodne raztopine NaHCO<sub>3</sub> (10 ml). Topilo smo odparili pod znižanim tlakom, oljnat produkt pa znova suspendirali v etilacetatu (50 ml) in nasičeni vodni raztopini NaHCO<sub>3</sub> (50 ml). Fazi smo ločili v liju ločniku in vodno fazo spirali še z etilacetatom (2 x 50 ml). Združene organske faze smo spirali z nasičeno vodno raztopino NaCl (1 x 100 ml), jih posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in



topilo odparili pod znižanim tlakom. Produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF: etilacetat/heksan = 1/2).

Izkoristek reakcije: 30,4 % (razmerje *cis/trans*: 2/3)

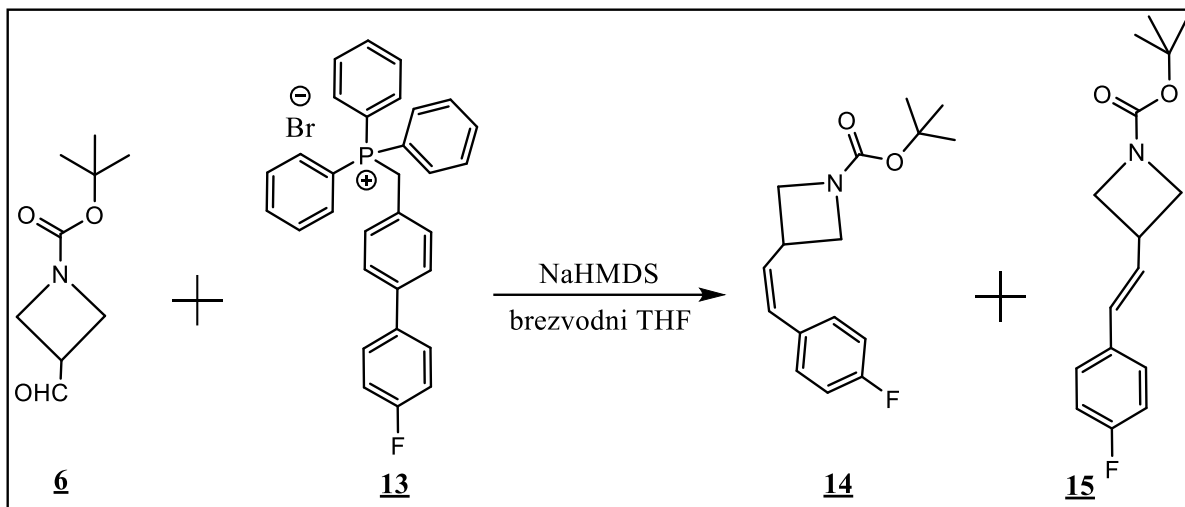
Razpredelnica VI: Analizni podatki za spojino 11

<b>izgled:</b> brezbarvno olje	<b>tališče</b> [°C]: / (olje)	<b>R<sub>f</sub></b> = 0,27 (MF: etilacetat/heksan = 1/2 )
<b>ESI-MS:</b> izmerjena za C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>4</sub> SNa (M+Na) <sup>+</sup> : 387,91		
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ = 1,34-1,45 (m, 2H, CH-piperidin); 1,47 (s, 9H, 3x CH <sub>3</sub> ); 1,62-1,69 (m, 2H, CH-piperidin); 2,58-2,68 (m, 1H, CH-piperidin); 2,72 (t, 2H, J= 12,0 Hz, 2x CH-piperidin); 3,08 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ); 4,11 (rs, 2H, 2xCH-piperidin); 5,62 (dd, 1H, 1H, J <sub>1</sub> = 10,4 Hz, J <sub>2</sub> = 11,6 Hz), Ar-CH=CH); 6,44 (d, 1H, J= 11,6 Hz, Ar-CH=CH); 7,40-7,43 (m, 2H, ArH); 7,90-7,93 (m, 2H, ArH) ppm		
<b><sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ = 28,39; 31,77; 35,22; 43,04; 44,48; 79,47; 126,66; 127,42; 129,20; 138,47; 139,57; 143,12; 154,73 ppm		

Razpredelnica VII: Analizni podatki za spojino 12

<b>izgled:</b> beli kristali	<b>tališče</b> [°C]: 93-97	<b>R<sub>f</sub></b> = 0,22 (MF: etilacetat/heksan = 1/2 )
<b>ESI-MS:</b> izmerjena za C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>4</sub> SNa (M+Na) <sup>+</sup> : 387,91		
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ = 1,38 (dt, 1H, J <sub>1</sub> = 4,1 Hz, J <sub>2</sub> = 12,4 Hz, CH-piperidin), 1,41 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 4,0 Hz, J <sub>2</sub> = 12,4 Hz, CH-piperidin), 1,47 (s, 9H, 3xCH <sub>3</sub> ); 1,75-1,83 (m, 2H, CH-piperidin); 2,30-2,39 (m, 1H, CH-piperidin); 2,79 (t, 2H, J= 10,7 Hz, 2x CH-piperidin); 3,05 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ); 4,15 (rs, 2H, 2xCH-piperidin); 6,33 (dd, 1H, 1H, J <sub>1</sub> = 6,7 Hz, J <sub>2</sub> = 16,0 Hz), Ar-CH=CH); 6,45 (d, 1H, J= 16,0 Hz), Ar-CH=CH ); 7,50-7,53 (m, 2H, ArH); 7,85-7,88 (m, 2H, ArH) ppm		
<b><sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ = 28,31; 31,36; 39,36; 43,33; 44,44; 79,33; 126,59; 126,85; 127,58; 138,40; 138,61; 142,89; 154,66 ppm		

**4.10 Sinteza *tert*-butil (*Z*)-3-(4-(fluorostiril)azetidin-1-karboksilata (**14**) in *tert*-butil (*E*)-3-(4-(fluorostiril)azetidin-1-karboksilata (**15**)**



Slika 20: Reakcijska shema za spojini 14 in 15

Spojini **14** in **15** smo sintetizirali po sinteznem postopku 6.

Količine uporabljenih reagentov:

- spojina **13**: 2,15 g; 5,0 mmol
- NaHMDS: 2,75 ml; 5,50 mmol
- spojina **6**: 0,85 g; 4,58 mmol
- MF (kolonska kromatografija): najprej eter/petroleter = 1/10, nato eter/petroleter = 1/5

Izkoristek reakcije: 43 % (razmerje *cis/trans*: 4/3)

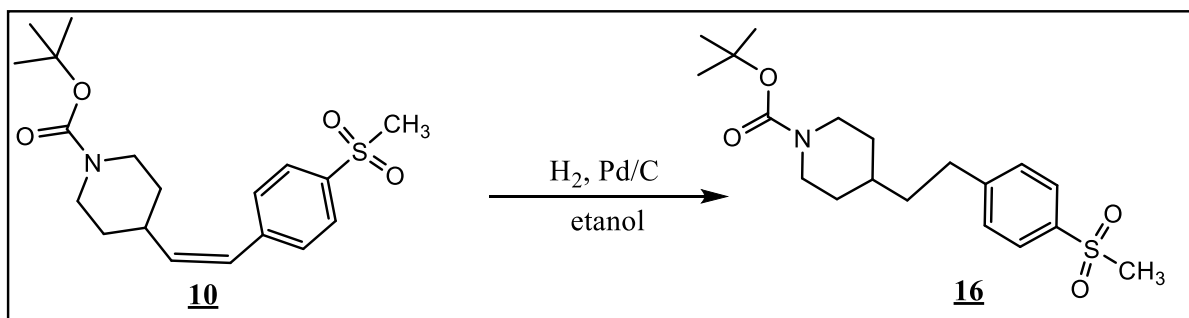
Razpredelnica VIII: Analizni podatki za spojino 14

<b>izgled:</b> beli kristali	<b>tališče</b> [°C]: 36-41	<b>R<sub>f</sub></b> = 0,26 (MF: eter/petroleter =1/5 )
<b>ESI-MS:</b> izmerjena za C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> FNO <sub>2</sub> Na (M+Na) <sup>+</sup> : 300,47		
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ = 1,44 (s, 9H, (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ); 3,55-3,65 (m, 1H, azetidin-H); 3,75 (dd, 2H, J <sub>1</sub> = 5,9 Hz, J <sub>2</sub> = 8,4 Hz, 2x azetidin-H); 4,15 (t, 2H, J= 8,5 Hz, 2x azetidin-H); 5,90 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 9,0 Hz, J <sub>2</sub> = 11,4 Hz, Ar-CH=CH); 6,46 (d, 1H, J= 11,4 Hz, Ar-CH=CH); 6,99-7,05 (m, 2H, ArH); 7,12- 7,70 (m, 2H, ArH) ppm		
<b><sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ = 27,53; 28,36; 79,46; 115,24 (d, J <sub>C,F</sub> = 21,5 Hz); 129,688; 129,98 (d, J <sub>C,F</sub> = 8,00 Hz); 132,65 (d, J <sub>C,F</sub> = 3,4 Hz) 156,17; 161,81 (d, J <sub>C,F</sub> = 247,1 Hz) ppm		

<b>izgled:</b> beli kristali	<b>tališče</b> [°C]: 58-61	<b>R<sub>f</sub></b> = 0,22 (MF: eter/petroleter = 1/5)
<b>ESI-MS:</b> izmerjena za C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> FNO <sub>2</sub> Na (M+Na) <sup>+</sup> : 300,77		
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ = 1,45 (s, 9H, (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ); 3,30-3,39 (m, 1H, azetidin-H); 3,81 (dd, 2H, J <sub>1</sub> = 5,9 Hz, J <sub>2</sub> = 8,6 Hz, 2x azetidin-H); 4,16 (t, 2H, J= 8,5 Hz, 2x azetidin-H); 6,28 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 8,1 Hz, J <sub>2</sub> = 15,8 Hz, Ar-CH=CH); 6,39 (d, 1H, J= 15,8 Hz, Ar-CH=CH); 6,97-7,03 (m, 2H, ArH); 7,30-7,35 (m, 2H, ArH) ppm		
<b><sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ = 28,37; 31,73; 54,80; 79,44; 115,48 (d, J <sub>C,F</sub> = 21,5 Hz); 127,64 (d, J <sub>C,F</sub> = 8,0 Hz); 129,89; 130,01 (d, J <sub>C,F</sub> = 2,4 Hz); 132,51 (d, J <sub>C,F</sub> = 3,1 Hz); 156,31; 162,23 (d, J <sub>C,F</sub> = 247,0 Hz) ppm		

#### 4.11 Sinteza *terc*-butil 4-(4-(metilsulfonyl)fenetil)piperidin-1-karboksilata

##### (16)



Slika 21: Reakcijska shema za spojino 16

##### Sintezni postopek 7:

Spojino **10** (152 mg; 0,416 mmol) smo raztopili v etanolu (15 ml) in 10 min prepilovali z argonom. Nato smo dodali Pd/C (72 mg) in pri sobni temperaturi v vodikovi atmosferi pustili mešati čez noč. Katalizator smo odstranili s filtracijo z odsesavanjem in topilo odparili pod znižanim tlakom.

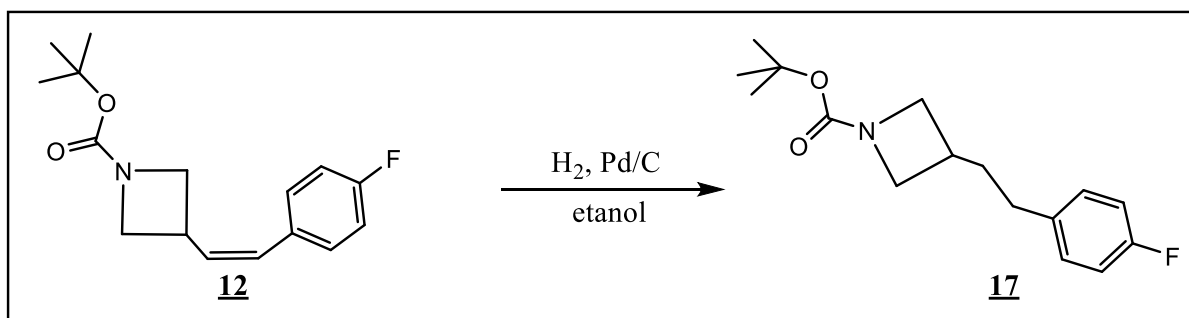
Izkoristek reakcije: 90,0 %

<b>izgled:</b> beli kristali	<b>tališče</b> [°C]: 60-64	<b>R<sub>f</sub></b> = 0,29 (MF: etilacetat/heksan = 1/2)
<b>ESI-MS:</b> izmerjena za C <sub>19</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>4</sub> SNa (M+Na) <sup>+</sup> : 389,91		
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ = 1,13 (dt, J <sub>1</sub> = 12,3 Hz, J <sub>2</sub> = 4,0 Hz, 1H, CH-piperidin); 1,16 (dt,		

$J_1 = 12,3$  Hz,  $J_2 = 4,0$  Hz, 1H, CH-piperidin); 1,22-1,30 (m, 1H, CH-piperidin); 1,36-1,62 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,46 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,68-1,75 (m, 2H, 2xCH-piperidin); 2,66 (t,  $J = 10,8$  Hz, 2H, 2xCH-piperidin); 2,71-2,75 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,05 (m, 3H, CH<sub>3</sub>); 4,10-4,15 (m, 2H, 2xCH-piperidin); 7,37 (d, 2H,  $J = 8,1$  Hz, ArH) ; 7,85 (d, 2H,  $J = 8,2$  Hz, ArH) ppm

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 28,76; 32,08; 32,99; 35,58; 37,95; 44,13, 44,56; 79,25; 127,33; 129,07; 130,79; 148,95; 154,60$  ppm

#### 4.12 Sinteza *tert*-butil 3-(fluorofenetil)azetidin-1-karboksilata (**17**)



Slika 22: Reakcijska shema za spojino 17

Spojino **17** smo sintetizirali po sinteznem postopku 7.

Količine uporabljenih reagentov:

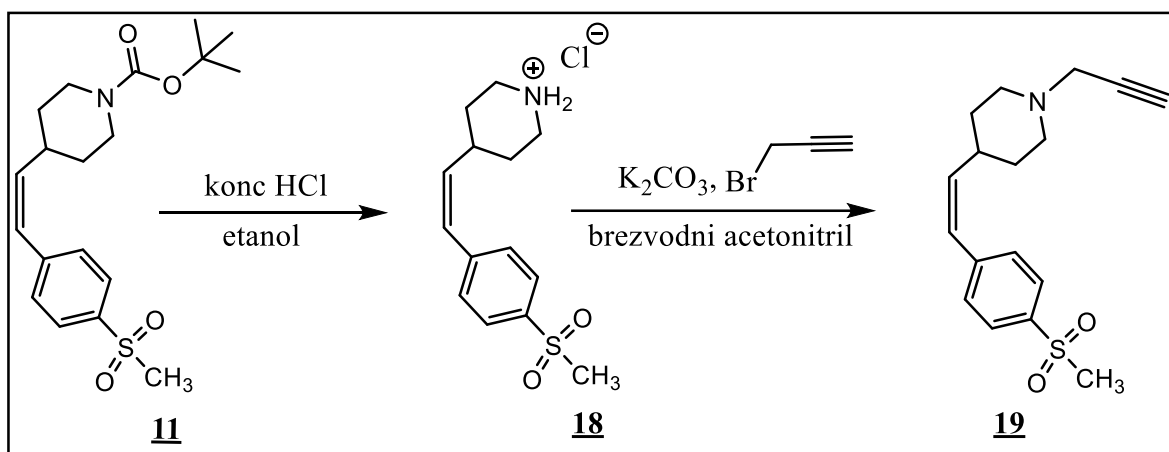
- spojina **12**: 131 mg; 0,472 mmol
- Pd/C: 73 mg

Izkoristek reakcije: 87,0 %

Razpredelnica XI: Analizni podatki za spojino 17

<b>izgled:</b> rumeno olje	<b>tališče</b> [°C]: / (olje)	<b>R<sub>f</sub></b> = 0,20 (MF: eter/petroleter = 1/5)
<b>ESI-MS:</b> izmerjena za C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> FNO <sub>2</sub> Na (M+Na) <sup>+</sup> : 301,87		
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta = 1,43$ (s, 9H, (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ); 1,85-1,90 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ); 2,43-2,52 (m, 1H, azetidin-H); 2,51-2,55 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ); 3,53 (dd, 2H, $J_1 = 5,6$ Hz, $J_2 = 8,6$ Hz, 2x azetidin-H); 3,97 (t, 2H, $J = 8,5$ Hz, 2x azetidin-H); 6,94-6,99 (m, 2H, ArH); 7,07- 7,12 (m, 2H, ArH) ppm		
<sup>13</sup> C-NMR (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta = 28,26; 28,37; 32,51; 36,20; 54,22, 79,22; 115,15$ (d, $J_{C,F} = 21,2$ Hz); 129,60 (d, $J_{C,F} = 7,9$ Hz); 136,93 (d, $J_{C,F} = 3,1$ Hz); 156,34; 161,29 (d, $J_{C,F} = 243,6$ Hz) ppm		

#### 4.13 Sinteza (Z)-4-(4-(metilsulfonil)stiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (**19**)



Slika 23: Reakcijska shema za spojino 19

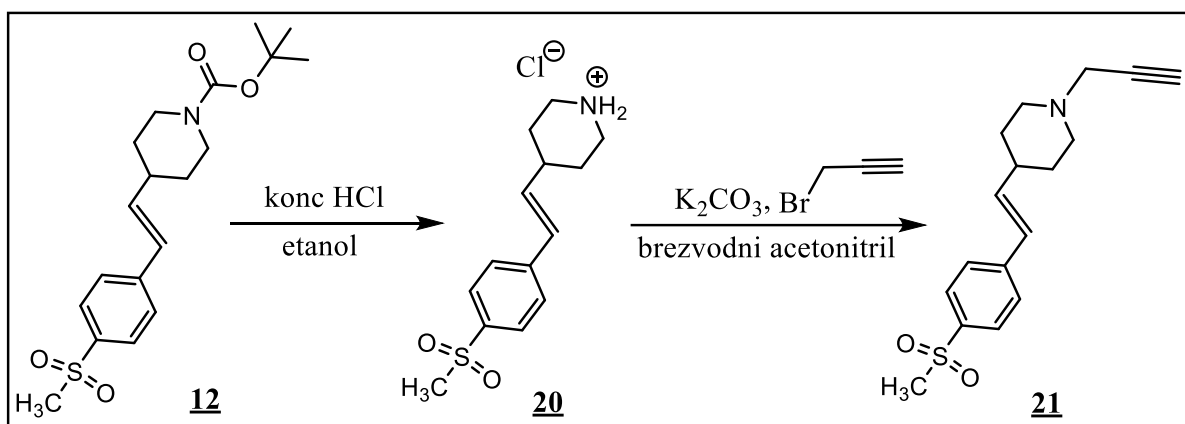
##### Sintezni postopek 8:

Raztopini spojine **11** (126 mg; 0,346 mmol) v etanolu (20 ml) smo pri sobni temperaturi dodali koncentrirano HCl (0,29 ml; 3,46 mmol). Reakcijsko zmes smo pustili mešati 2 h pri 80°C, topilo nato odparili pod znižanim tlakom, preostanek v bučki sprali z dietiletom (50 ml), topilo znova odparili in sušili v sušilniku pri 50 °C čez noč. Vmesni produkt (spojino **18**) smo na ledeni kopeli v inertni argonovi atmosferi raztopili v brezvodnem acetonitrilu (30 ml). Nato smo najprej dodali K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (143 mg; 1,04 mmol; 3 ekv.), potem pa 80 % raztopino propargil bromida v toluenu (44,7 µl; 0,42 mmol) po kapljicah. Ledeno kopel smo odstavili in nastalo suspenzijo v argonovi atmosferi pri sobni temperaturi pustili mešati čez noč. Po 24 h smo topilo odparili pod znižanim tlakom, produkt znova suspendirali v zmesi diklorometana (50 ml) in nasičene vodne raztopine NaHCO<sub>3</sub> (50 ml) ter suspenzijo prenesli v lij ločnik, kjer smo fazi ločili. Organsko fazo smo spirali še z nasičeno vodno raztopino NaCl (1 x 50 ml), posušili z brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in topilo odparili pod znižanim tlakom. Produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF: etilacetat/heksan = 2/1).

Izkoristek reakcije: 76 %

<b>izgled:</b> beli kristali	<b>tališče[°C]:</b> 71-74	<b>R<sub>f</sub></b> = 0,25 (MF: etilacetat/heksan = 2/1 )
<b>ESI-HRMS:</b> izračunana za C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>2</sub> S(M+H) <sup>+</sup> : 304,1371 izmerjena: 304,1370		
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ = 1,53-1,63 (m, 2H, 2xCH-piperidin); 1,69-1,76 (m, 2H, 2xCH-piperidin); 2,23 (dt, 2H, J <sub>1</sub> = 2,5 Hz, J <sub>2</sub> = 11,7 Hz, 2xCH-piperidin); 2,26 (t, 1H, J= 2,4 Hz, C≡CH); 2,44-2,53 (m, 1H, 1xCH-piperidin); 2,90 (td, 2H, J <sub>1</sub> = 2,7 Hz, J <sub>2</sub> = 8,9 Hz, 2xCH-piperidin); 3,08 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ); 3,31 (d, 2H, J= 2,5 Hz, CH <sub>2</sub> -C≡C ); 5,67 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 10,3 Hz, J <sub>2</sub> = 11,7 Hz, Ar-CH=CH ); 6,43 (d, 1H, J= 11,7 Hz, Ar-CH=CH); 7,40-7,43 (m, 2H, ArH); 7,90-7,93 (m, 2H, ArH) ppm		
<b><sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ = 32,03; 34,59; 44,46; 47,61; 51,64; 73,08; 78,81; 126,42; 127,33; 129,17; 138,29; 140,29; 143,22 ppm		
<b>IR [cm<sup>-1</sup>]:</b> 3273, 2937, 2799, 2757, 1640, 1593, 1463, 1415, 1296, 1141, 1078, 955, 848, 774, 723, 679, 615, 593, 525		
<b>HPLC:</b> t <sub>R</sub> = 5,167 min		

#### 4.14 Sinteza (*E*)-4-(4-(metilsulfonil)stiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (**21**)



Slika 24: Reakcijska shema za spojino 21

Spojino **21** smo sintetizirali po sinteznem postopku 8.

Količine uporabljenih reagentov:

- spojina **12**: 205 mg; 0,56 mmol
- konc. HCl: 0,47 ml; 5,6 mmol
- K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: 232 mg; 1,68 mmol
- Propargil bromid (80% razt. v toluenu): 72,4 µl; 0,67 mmol

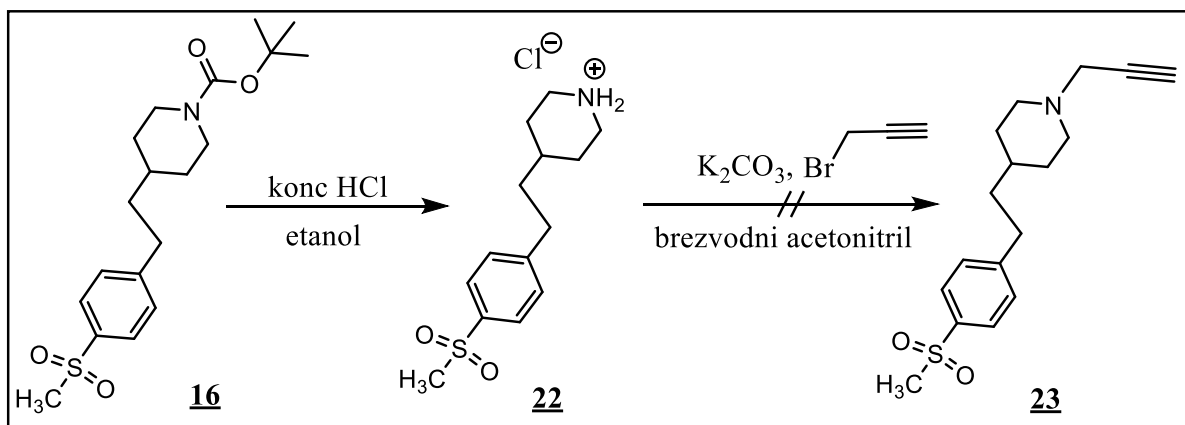
- MF (kolonska kromatografija): etilacetat/heksan = 2/1

Izkoristek reakcije: 85 %

Razpredelnica XIII: Analizni podatki za spojino 21

<b>izgled:</b> beli kristali	<b>tališče[°C]:</b> 101-105	<b>R<sub>f</sub></b> = 0,23 (MF: etilacetat/heksan = 2/1 )
<b>ESI-HRMS:</b> izračunana za C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>2</sub> S(M+H) <sup>+</sup> : 304,1371 izmerjena: 304,1372		
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ = 1,57 (dt, 1H, J <sub>1</sub> = 3,2 Hz, J <sub>2</sub> = 12,3 Hz, CH-piperidin); 1,60 (dt, 1H, J <sub>1</sub> = 3,2 Hz, J <sub>2</sub> = 12,2 Hz, CH-piperidin); 1,80-1,86 (m, 2H, 2xCH-piperidin); 2,14-2,23 (m, 1H, 1xCH-piperidin); 2,25-2,33 (m, 3H, C≡CH + 2xCH-piperidin); 2,93-2,98 (m, 2H, 2xCH-piperidin); 3,04 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ); 3,34 (d, 2H, J = 2,2 Hz, CH <sub>2</sub> -C≡CH ); 6,35 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 6,6 Hz, J <sub>2</sub> = 16,0 Hz, Ar-CH=CH ); 6,44 (d, 1H, J = 16,1 Hz, Ar-CH=CH); 7,51 (d, 2H, J = 8,3 Hz, ArH); 7,86 (d, 2H, J=8,3 Hz, ArH) ppm		
<b><sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ = 31,72; 38,97; 44,60; 47,21; 52,11; 73,05; 78,94; 126,67; 126,75; 127,68; 138,37; 139,36; 143,17 ppm		
<b>IR [cm<sup>-1</sup>]:</b> 3282, 2927, 2797, 2750, 1647, 1595, 1466, 1404, 1303, 1146, 1091, 960, 858, 767, 705, 684, 649, 595, 544, 526		
<b>HPLC:</b> t <sub>R</sub> = 5,060 min		

#### 4.15 Sinteza 4-(4-(metilsulfonyl)fenetil)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (**23**)



Slika 25: Reakcijska shema za spojino 23

Spojino **23** smo sintetizirali po sinteznem postopku 8.

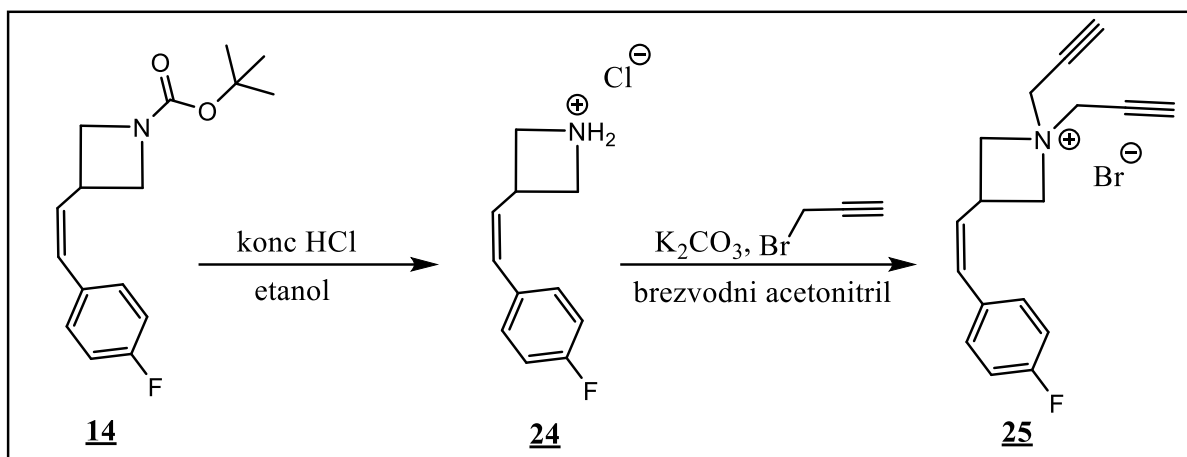
Količine uporabljenih reagentov:

- spojina **16**: 153 mg; 0,42 mmol

- konc. HCl: 0,35 ml; 4,16 mmol
- K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: 172 mg; 1,25 mmol
- propargil bromid (80% razt. v toluenu): 53,8 µl; 0,50 mmol
- MF (kolonska kromatografija): etilacetat/heksan = 2/1

Izkoristek reakcije: Reakcija ni potekla.

#### 4.16 Sinteza (Z)-3-(4-fluorostiril)-1,1-di(prop-2-in-1-il)azetidin-1-ijevega bromida (**25**)



Slika 26: Reakcijska shema za spojino 25

Spojino **25** smo sintetizirali po sinteznem postopku 8.

Količine uporabljenih reagentov:

- spojina **14**: 249 mg; 0,90 mmol
- konc. HCl: 0,75 ml; 8,98 mmol.
- K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: 372 mg; 2,69 mmol
- propargil bromid (80 % razt. v toluenu): 115,9 µl; 1,08 mmol
- MF (kolonska kromatografija): najprej eter/petroleter = 1/10, nato eter/petroleter = 1/5

Izkoristek reakcije: 40 %

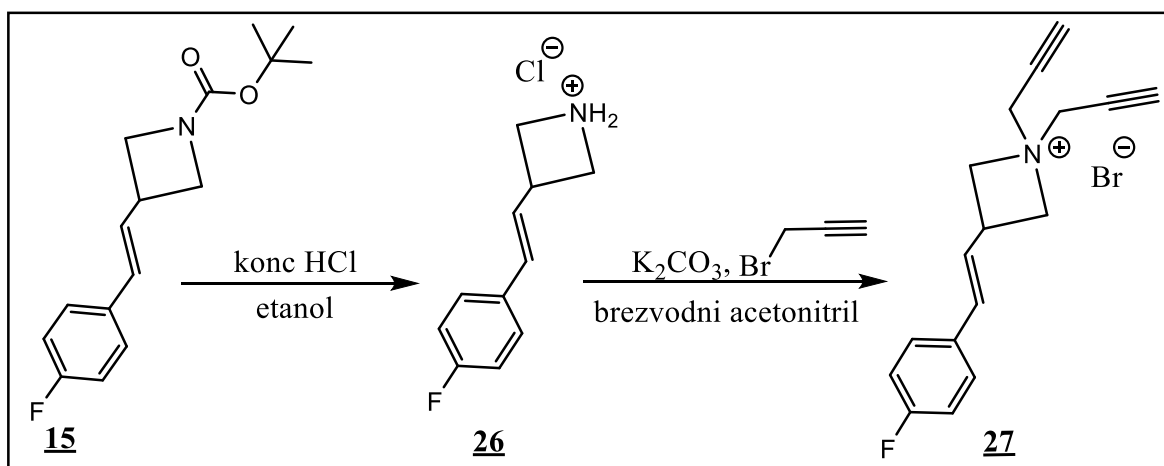
Razpredelnica XIV: Analizni podatki za spojino 25

<b>izgled:</b> rumeno olje	<b>tališče</b> [°C]: / (olje)	<b>R<sub>f</sub></b> = 0,48 (MF: eter/petroleter = 1/5)
<b>ESI-HRMS:</b> izračunana za C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> FN (M+H) <sup>+</sup> : 254,1345		



izmerjena: 254,1350
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ = 2,22 (t, 2H, <i>J</i> = 2,4 Hz, 2xC≡CH); 2,61-2,72 (m, 2H, 2x azetidin-H); 3,06-3,15 (m, 1H, azetidin-H); 3,38 (t, 4H, <i>J</i> = 2,1 Hz, 2x CH <sub>2</sub> -C≡CH); 3,50 (d, 2H, <i>J</i> = 5,3 Hz, 2x azetidin-H) 5,53 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 9,9 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 11,5 Hz, Ar-CH=CH); 6,60 (d, 1H, <i>J</i> = 11,6 Hz, Ar-CH=CH); 7,00-7,06 (m, 2H, ArH); 7,26- 7,30 (m, 2H, ArH) ppm
<b><sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ = 36,69; 37,27; 42,65; 55,48; 73,14; 78,57; 115,23 (d, <i>J</i> <sub>C,F</sub> = 21,3 Hz); 130,03 (d, <i>J</i> <sub>C,F</sub> = 8,00 Hz); 130,89; 131,63; 132,86 (d, <i>J</i> <sub>C,F</sub> = 3,5 Hz); 161,81 (d, <i>J</i> <sub>C,F</sub> = 246,6 Hz) ppm
<b>IR [cm<sup>-1</sup>]:</b> 3298, 3282, 2961, 1601, 1508, 1455, 1334, 1221, 1156, 1120, 984, 839, 743, 631, 555
<b>HPLC:</b> t <sub>R</sub> = 10,540 min

#### 4.17 Sinteza (*E*)-3-(4-fluorostiril)-1,1-di(prop-2-in-1-il)azetidin-1-ijevega bromida (**27**)



Slika 27: Reakcijska shema za spojino 27

Spojino **27** smo sintetizirali po sinteznem postopku 8.

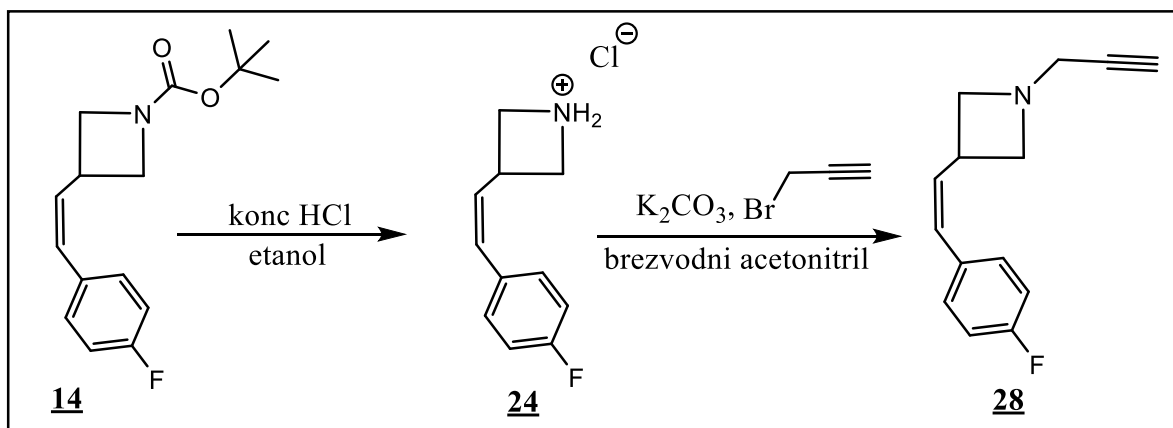
Količine uporabljenih reagentov:

- spojina **15**: 153 mg; 0,55 mmol
- konc. HCl: 0,46 ml; 5,52 mmol
- K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: 229 mg; 1,66 mmol
- propargilbromid (80% razt. v toluenu): 71,4 μl; 0,66 mmol
- MF (kolonska kromatografija): najprej eter/petroleter = 1/10, nato eter/petroleter = 1/5

Izkoristek reakcije: 79 %

<b>izgled:</b> brezbarvno olje	<b>tališčel[°C]:</b> / (olje)	<b>R<sub>f</sub></b> = 0,39 (MF: eter/petroleter = 1/5 )
<b>ESI-HRMS:</b> izračunana za C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> FN (M+H) <sup>+</sup> : 254,1345 izmerjena: 254,1338		
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ = 2,25 (t, 2H, J= 2,4 Hz, 2xC≡CH); 2,66-2,78 (m, 3H, 3x azetidin-H); 3,47 (d, 4H, J= 2,4 Hz, 2xCH <sub>2</sub> -C≡C ); 3,58-3,60 (m, 2H, 2x azetidin-H) 6,02 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 7,2 Hz, J <sub>2</sub> = 16,0 Hz, Ar-CH=CH ); 6,48 (d, 1H, J= 16,0 Hz, Ar-CH=CH); 6,97-7,03 (m, 2H, ArH); 7,31- 7,36 (m, 2H, ArH) ppm		
<b><sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ = 36,83; 42,32; 42,79; 55,59; 73,16; 78,68; 115,38 (d, J <sub>C,F</sub> = 21,8 Hz); 127,77 (d, J <sub>C,F</sub> = 8,00 Hz); 128,97; 131,10; 133,99 (d, J <sub>C,F</sub> = 3,1 Hz); 162,21 (d, J <sub>C,F</sub> = 246,7 Hz) ppm		
<b>IR [cm<sup>-1</sup>]:</b> 3294, 2927, 2819, 1601, 1508, 1455, 1328, 1224, 1157, 965, 807, 773, 631, 524		
<b>HPLC:</b> t <sub>R</sub> = 9,853 min		

#### 4.18 Sinteza (Z)-3-(4-fluorostiril)-1-(prop-2-in-1-il)azetidina (**28**)



Slika 28: Reakcijska shema za spojino 28

Spojino **30** smo sintetizirali po sinteznem postopku 9:

Raztopini spojine **14** (180 mg; 0,65 mmol) v etanolu (20 ml) smo pri sobni temperaturi dodali koncentrirano HCl (0,54 ml; 6,47 mmol). Reakcijsko zmes smo pustili mešati 2 h pri 80°C pod reflukso, topilo nato odparili pod znižanim tlakom, preostanek v bučki pa sprali z dietiletom (50 ml), topilo znova odparili in sušili v sušilniku pri 50°C čez noč.

Vmesni produkt (spojino **24**) smo na ledeni kopeli v inertni argonovi atmosferi raztopili v brezvodnem acetonitrilu (30 ml). Nato smo najprej dodali K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (224 mg; 1,62 mmol), potem pa 80 % raztopino propargil bromida v toluenu (62,9 µl; 0,58 mmol) po kapljicah in

reakcijsko zmes pustili mešati. Po 110 min smo ledeno kopel zamenjali s hladno vodo, ki smo jo po 165 min odstranili in reakcijo pustili potekati na sobni temperaturi. Po 3,5 h smo reakcijo ustavili.

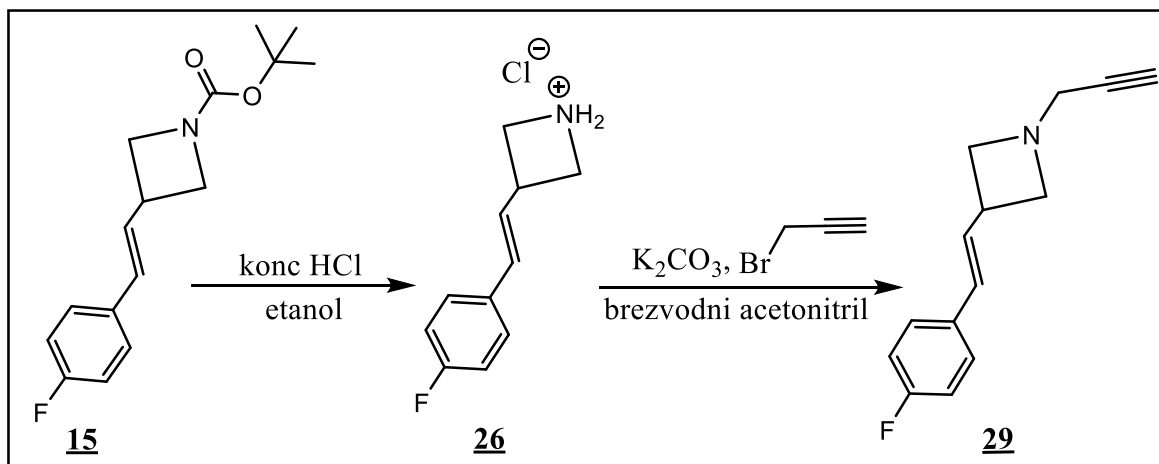
Izolacijo produkta smo izvedli kot pri sinteznem postopku 8, nato pa ga čistili s kolonsko kromatografijo (MF: diklorometan/metanol = 20/1).

Izkoristek reakcije: 4%

Razpredelnica XVI: Analizni podatki za spojino 28

<b>izgled:</b> brezbarvno olje	<b>tališče</b> [°C]: / (olje)	<b>R<sub>f</sub></b> = 0,22 (MF: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /metanol = 20/1)
<b>ESI-HRMS:</b> izračunana za C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> FN (M+H) <sup>+</sup> : 216,1189 izmerjena: 216,1193		
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ = 2,28 (t, 1H, J= 2,4 Hz, C≡CH); 3,13-3,17 (m, 2H, 2x azetidin-H); 3,27 (d, 2H, J= 2,4 Hz, CH <sub>2</sub> -C≡CH); 3,51-3,62 (m, 3H, 3x azetidin-H); 5,88 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 8,5 Hz, J <sub>2</sub> = 11,5 Hz, Ar-CH=CH); 6,38 (d, 1H, J= 11,5 Hz, Ar-CH=CH); 6,98-7,03 (m, 2H, ArH); 7,10- 7,16 (m, 2H, ArH) ppm		
<b><sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ = 29,64; 45,22; 58,75; 73,05; 78,72; 115,10 (d, J <sub>C,F</sub> = 21,5 Hz); 128,75; 130,02 (d, J <sub>C,F</sub> = 7,9 Hz); 133,00 (d, J <sub>C,F</sub> = 3,2 Hz); 133,30 (d, J <sub>C,F</sub> = 1,1 Hz); 161,69 (d, J <sub>C,F</sub> = 246,4 Hz) ppm		
<b>HPLC:</b> t <sub>R</sub> = 6,177 min		

#### 4.19 Sinteza (E)-3-(4-fluorostiril)-1-(prop-2-in-1-il)azetidina (**29**)



Slika 29: Reakcijska shema za spojino 29

Spojino **31** smo sintetizirali po sinteznem postopku 9.

Količine uporabljenih reagentov:

- spojina **15**: 193 mg; 0,70 mmol
- konc. HCl: 0,58 ml; 6,95 mmol
- K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: 240 mg; 1,74 mmol
- propargil bromid ( 80% razt. v toluenu): 67,5 µl; 0,63 mmol
- MF (kolonska kromatografija): eter/petroleter = 1/2

Izkoristek reakcije: 9 %

*Razpredelnica XVII: Analizni podatki za spojino 29*

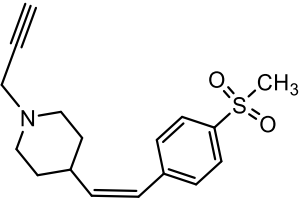
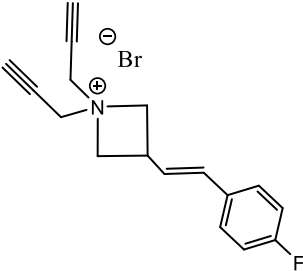
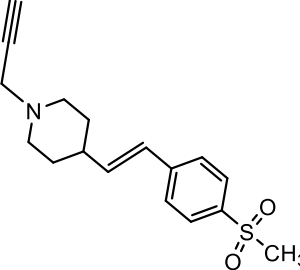
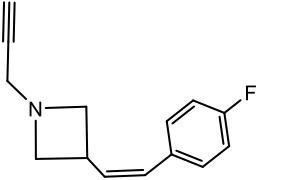
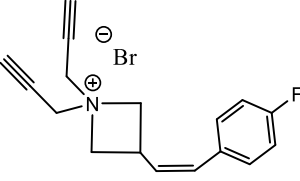
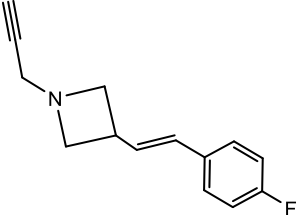
<b>izgled:</b> rumeno olje	<b>tališče</b> [°C]: / (olje)	<b>R<sub>f</sub></b> = 0,15 (MF: eter/petroleter = 1/2 )
<b>ESI-HRMS:</b> izračunana za C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> FN (M+H) <sup>+</sup> : 216,1189 izmerjena: 216,1191		
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ = 2,29 (t, 1H, J= 2,4 Hz, C≡CH); 3,19-3,27 (m, 3H, 3x azetidin-H); 3,29 (d, 2H, J= 2,4 Hz, CH <sub>2</sub> -C≡C); 3,58-3,61 (m, 2H, 2x azetidin-H) 6,29 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 7,0 Hz, J <sub>2</sub> = 15,9 Hz, Ar-CH=CH ); 6,36 (d, 1H, J= 15,9 Hz, Ar-CH=CH); 6,97-7,01 (m, 2H, ArH); 7,30-7,34 (m, 2H, ArH) ppm		
<b><sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ = 33,93; 45,29; 58,13; 73,09; 78,77; 115,41 (d, J <sub>C,F</sub> = 21,4 Hz); 127,55 (d, J <sub>C,F</sub> = 7,9 Hz); 129,14; 130,77; 133,28 (d, J <sub>C,F</sub> = 3,1 Hz); 162,10 (d, J <sub>C,F</sub> = 246,2 Hz) ppm		
<b>IR [cm<sup>-1</sup>]:</b> 3299, 2947, 2832, 1602, 1508, 1477, 1225, 1157, 965, 851, 808, 769, 634, 526		
<b>HPLC:</b> t <sub>R</sub> = 6,317 min		

## 5. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1 REZULTATI SINTEZNEGA DELA

V okviru sinteznega dela smo sintetizirali 6 končnih spojin, prikazanih v razpredelnici XVIII.

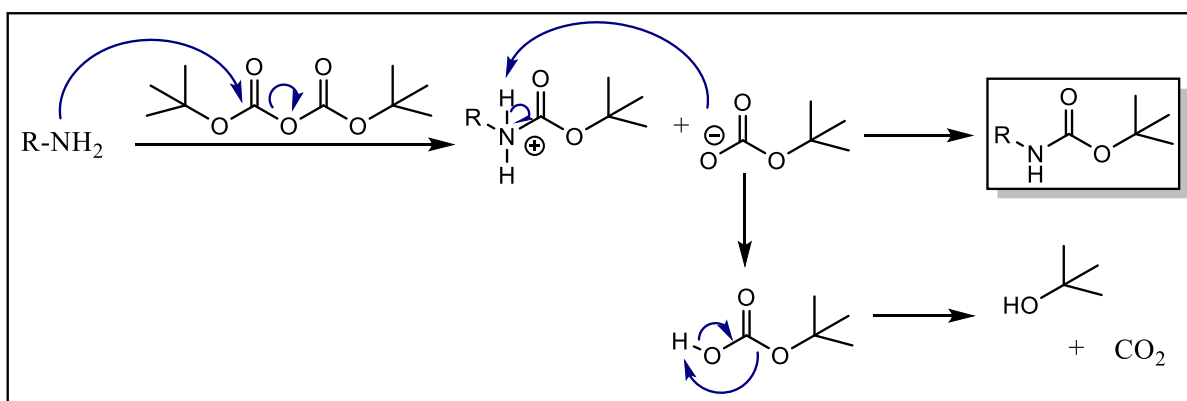
Razpredelnica XVIII: Strukture končnih sintetiziranih spojin

Oznaka spojine	Struktura spojine	Oznaka spojine	Struktura spojine
<u>19</u>		<u>27</u>	
<u>21</u>		<u>28</u>	
<u>25</u>		<u>29</u>	

## 5.2 KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV

### 5.2.1 Uvedba zaščitne skupine di-*tert*-butil dikarbonata na amino skupino

Izhodna spojina našega eksperimentalnega dela vsebuje nukleofilno amino skupino, ki bi v nadaljnjih reakcijskih stopnjah lahko reagirala z elektrofilni. Ker smo želeli, da reakcije vse do zadnjega koraka izhajajo iz pretvorbe karboksilne skupine izhodne spojine, smo, da bi dosegli selektivnost, v prvem koraku amino skupino zaščitili in jo tako pretvorili v manj reaktivno obliko. Tako smo se izognili tudi vrsti potencialnih stranskih produktov in pomembno prispevali k izkoristku reakcije. Iz nabora znanih zaščitnih skupin smo izbrali *tert*-butil karbamatno zaščitno skupino, saj je pri reakcijskih pogojih v stopnjah, ki sledijo (bazični pogoji, močni reducenti, katalitsko hidrogeniranje), obstojna, uvedba je enostavna in dovolj selektivna, odstranimo pa jo lahko pri blagih pogojih, pri katerih je naš produkt stabilen (28). Reakcija, ki je pri tem potekla, je *N*-aciliranje. Potekla je po mehanizmu nukleofilne substitucije preko tetraedričnega intermedata.



Slika 30: Mehanizem reakcije zaščite amino skupine z di-*tert*-butil dikarbonatom (prirejeno po 29)

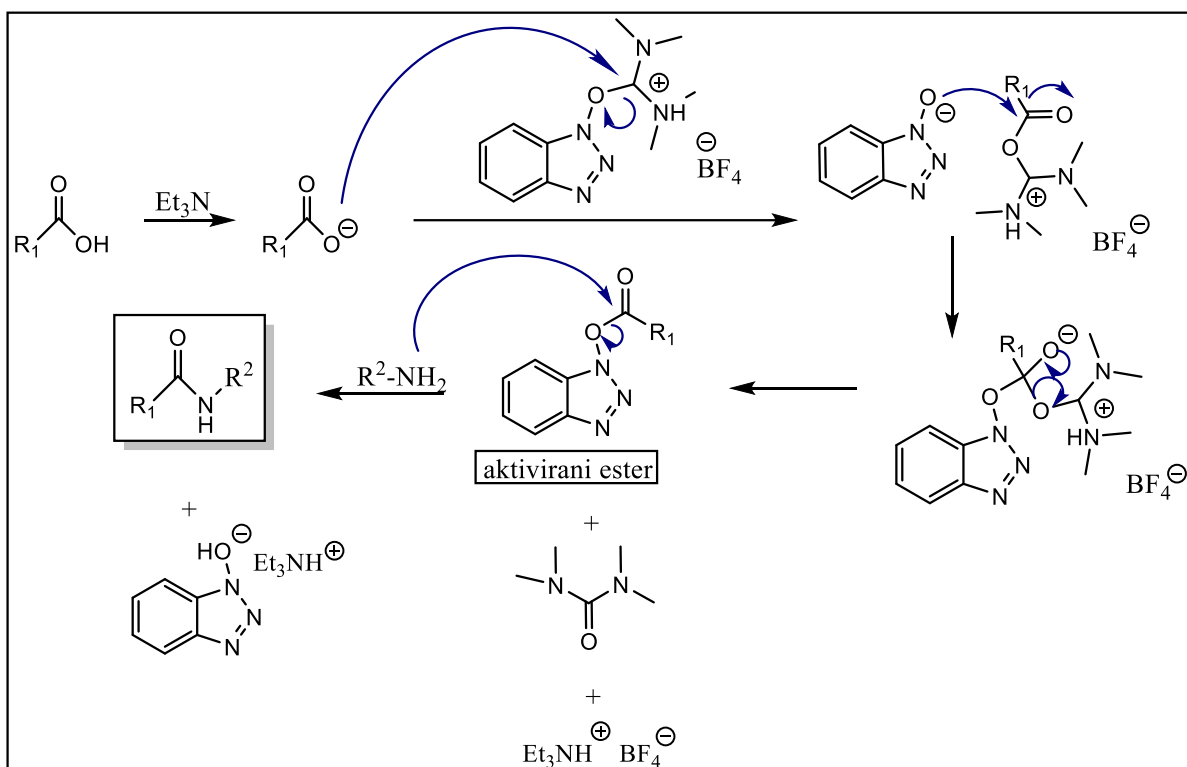
Elektronski par na dušiku amino skupine je kot nukleofil napadel elektrofilni ogljikov atom Boc<sub>2</sub>O, pri čemer je nastal nestabilni tetraedrični intermedat, s katerega se je odcepila dobro izstopajoča *tert*-butilkarbonatna skupina, ki je z nastalega vmesnega produkta odcepila proton in nastal je zaščiteni produkt. Kot stranska produkta sta pri tem nastala *tert*-butanol in CO<sub>2</sub>. Slednji je izhajal reakcijske zmesi, *tert*-butanola in nezreagirane Boc<sub>2</sub>O pa smo se znebili z ekstrakcijo v etilacetat, pri čemer je naš produkt, ki je zaradi prisotnosti NaOH nastal v obliki soli, skupaj s potencialno nezreagirano izhodno spojino ostal v vodni fazi. Z nakisanjem s HCl do pH 2 (pri čemer smo morali paziti, da pH ne pade nižje, saj bi pri tem lahko potekla odščita) smo natrijevo sol produkta pretvorili v neionizirano obliko in jo ekstrahirali v organsko fazo.

Kot topilo pri reakciji smo uporabili zmes vode, v kateri sta topna izhodna spojina in intermediat (topnost izhodne spojine smo dodatno povečali s pretvorbo v obliko soli z dodatkom NaOH), in dioksana, ki dobro raztaplja  $\text{Boc}_2\text{O}$ , s čimer smo izboljšali stik med reagenti in omogočili lažji potek reakcije. S počasnim dokapavanjem  $\text{Boc}_2\text{O}$  na ledeni kopeli pa smo zmanjšali možnost nastanka stranskih produktov. Izkoristek reakcije spojine **1** je bil zelo visok (95 %), kljub temu da se je nekaj produkta med ekstrakcijo izgubilo v vodni fazi. Pri reakciji spojine **2** izgub v vodni fazi ni bilo, vendar je bil izkoristek kljub temu precej nižji (78 %).

### 5.2.2 Sinteza Weinrebovega amida s sklopitvenim reagentom TBTU

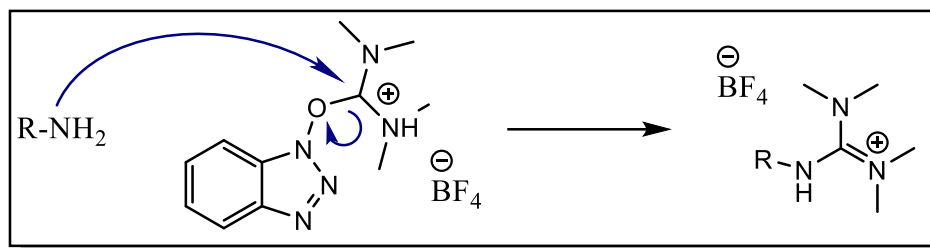
V drugi reakcijski stopnji smo iz karboksilne kisline sintetizirali Weinrebov amid, z namenom da ga v naslednjem koraku z redukcijo pretvorimo v aldehyd. Če bi izvajali redukcijo karboksilne kisline direktno, bi reakcija namreč potekla do alkohola, če reduciramo Weinrebov amid, pa jo lahko ustavimo na stopnji aldehyda (30).

Weinrebovi amidi, *N*-metoksi-*N*-metilamidi, so sicer široko uporabljeni v organski kemiji. Pripravimo jih z reakcijo med *N,O*-dimetilhidroksilaminom in ustrezno kislino (31). Ker reakcija med amino in karboksilno skupino pri običajnih pogojih ne bi potekla (-OH je slabo izstopajoča skupina in ogljik karboksilne kisline je slab elektrofil), smo v reakcijsko zmes dodali sklopitveni reagent in tako s pretvorbo karboksilne skupine v reaktivnejši aktivirani ester omogočili potek reakcije (32). Izbrali smo sklopitveni reagent TBTU.



Slika 31: Mehanizem reakcije s sklopitvenim reagentom TBTU (prirejeno po 33, 34)

Z dodatkom baze trietilamina smo dosegli odcep protona s karboksilne skupine. Nastali karboksilni anion je nato reagiral z elektrofilnim delom TBTU. Nastala sta intermediata hidroksibenzotriazolnati anion (HOBt) in derivat aktiviranega estra, ki sta zreagirala do končnega aktiviranega estra. Po aktivaciji s TBTU je poteklo *N*-aciliranje *N,O*-dimetilhidroksilamina. Kot stranska produkta pri reakciji sta nastajala tetrametilsečnina in HOBt, ki smo se ju znebili z ekstrakcijo v vodno fazo. S 30 min predaktivacijo na ledeni kopeli pa smo zmanjšali možnost nastanka gvanidinskega derivata, ki bi lahko nastal, če bi TBTU zreagirala z amino skupino (Slika 32).



Slika 32: Mehanizem nastanka potencialnega gvanidinskega stranskega produkta (prirejeno po 33)

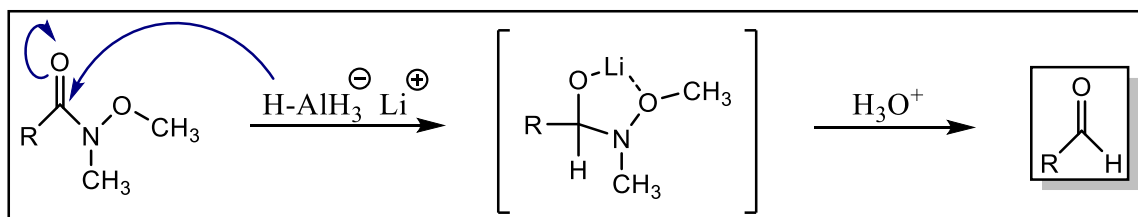
Za uporabo sklopitvenega reagenta smo se odločili, ker smo lahko, v nasprotju z drugimi metodami priprave priprave amidov, reakcijo v tem primeru izvedli v enem koraku.



Sklopitveni reagent namreč selektivno aktivira karboksilno skupino, tako da smo ga lahko dodali direktno v reakcijsko zmes (32). TBTU smo izbrali, ker ima kratek reakcijski čas, v zmes ni treba dodajati pomožnih nukleofilov, hkrati pa nastaja malo stranskih produktov, ki jih lahko enostavno odstranimo (35, 36). Izkoristek reakcije spojine **3** je bil v našem primeru občutno višji (82,4 %) od izkoristka pri enaki reakciji z uporabo sklopitvenega karbodiimidnega reagenta EDC v kombinaciji s HOBt, kjer je znašal le 38,4 % (25). Izkoristek je bil višji, kljub temu da smo pred izolacijo produkta na TLC-kromatogramu lahko opazili šibko liso izhodne spojine, kar pomeni da reakcija ni potekla popolnoma do konca. Prav tako je bil naš produkt po ekstrahiranjah z NaHCO<sub>3</sub> in HCl čist, zato kolonske kromatografije, nasprotno od zgoraj omenjenega primera, ni bilo treba izvajati. Pri reakciji spojine z azetidinskim osnovnim skeletom (**4**) pa je bil izkoristek reakcije 98 %. Reakcija je v tem primeru potekla do konca, saj v zmesi ni bilo nezreagirane izhodne spojine, vendar produkt ni bil popolnoma čist, saj je bila na TLC-kromatogramu vidna šibka lisa nečistote. Sklepamo, da produkt ob tehtanju ni bil popolnoma posušen in je bil izračunani izkoristek zato večji od dejanskega.

### 5.2.3 Redukcija Weinrebovega amida do aldehyda

Redukcijo smo izvedli z uporabo močno nukleofilnega reducenta LiAlH<sub>4</sub>. Pri tem je potekla nukleofilna substitucija preko tetraedričnega intermedata. Reducent je nukleofilno napadel ogljik amidne skupine, pri čemer je nastal tetraedrični intermedat – stabilen kelatni kompleks z litijem. Z dodatkom vode oziroma raztopine NaHCO<sub>3</sub> smo nato povzročili hidrolizo kompleksa in nastal je aldehyd.



Slika 33: Mehanizem redukcije Weinrebovega amida do aldehyda z LiAlH<sub>4</sub> (prirejeno po 36, 37)

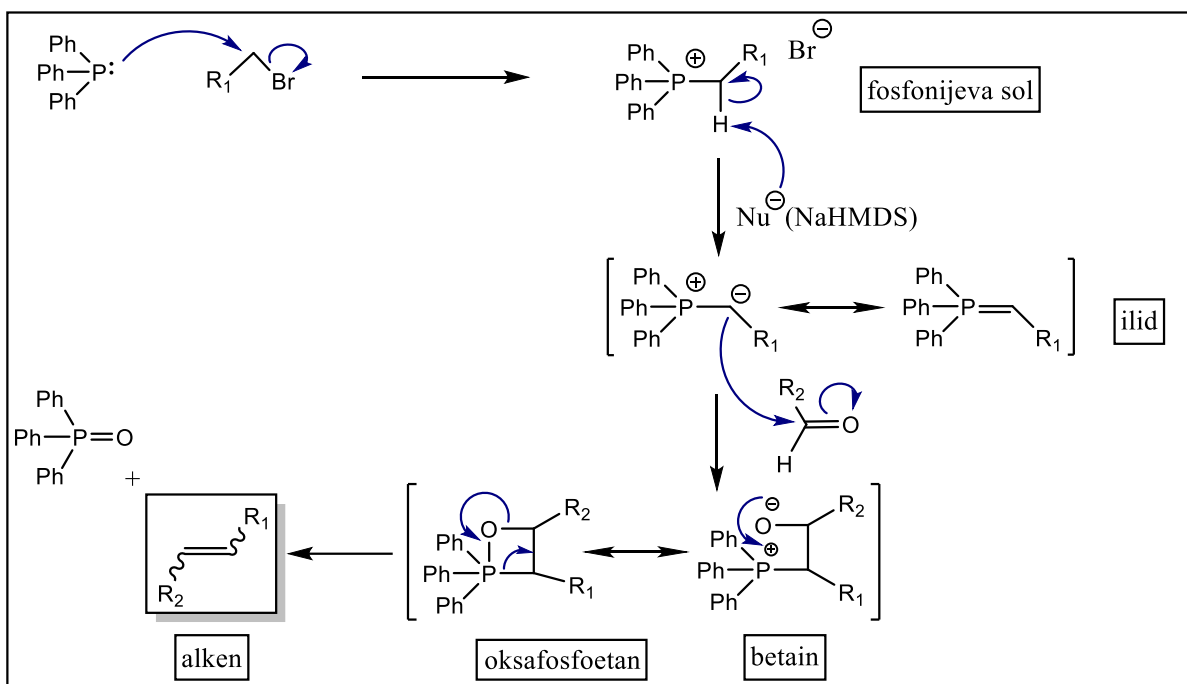
S predhodno pretvorbo karboksilne kisline v Weinrebov amid smo dosegli uspešno redukcijo do aldehyda. Če bi uporabili druge derivate karboksilne kisline, bi nastal nestabilni tetraedrični intermedat, ki bi takoj hidroliziral do aldehyda. Ker je aldehyd boljši elektrofili od preostalega derivata karboksilne kisline, bi namesto njega reagiral z LiAlH<sub>4</sub> do alkohola. V primeru Weinrebovega amida pa je intermedat stabiliziran s petčlenskimi

kompleksom z dušikom in metoksi skupino, zato do dodatka vode ne razpade in reakcijo posledično lahko ustavimo na stopnji aldehida (38). Če bi zaradi prisotnosti vode prišlo do hidrolize že prej, bi nastali aldehyd reagiral z  $\text{LiAlH}_4$  do alkohola, zato smo reakcijo izvajali v brezvodnih pogojih v inertni argonovi atmosferi, hkrati pa smo tako preprečili tudi burno reakcijo  $\text{LiAlH}_4$  z vodo. Redukcijo do alkohola smo preprečevali tudi z vzdrževanjem nizke temperature ( $0\text{ }^\circ\text{C}$ ) med potekom reakcije in z zaustavitvijo reakcije po 2 urah, ko se je porabila izhodna spojina. Pri obeh reakcijah smo dosegli dober izkoristek – 90,3 % pri spojini **5** in 85 % pri spojini **6**, kjer je ostalo nekoliko nezreagirane izhodne spojine.

#### 5.2.4 Sinteza Wittigovega reagenta in Wittigova reakcija

Redukciji do aldehida je sledila priprava alkena. Pripravili smo ga z Wittigovo reakcijo, pri kateri aldehyd ali keton reagira s fosfonijevimi (v 99% primerov so to trifenilfosfonijevi) ilidi do ustreznega alkena in trifenilfosfonijevega oksida (39).

Fosfonijevi ilidi so kemijske zvrsti, kjer je pozitivno nabiti fosforjev atom neposredno vezan na negativno nabiti ogljikov atom, ki je ključen za njihovo uporabo pri Wittigovi reakciji, saj lahko nukleofilno reagira s karbonilnim ogljikovim atomom aldehida in tvori alken. Ilid smo pripravili *in situ* z močno bazo iz fosfonijeve soli, ki smo jo predhodno pripravili iz ustreznega alkil bromida in trifenilfosfina.



Slika 34: Mehanizem Wittigove reakcije (prirejeno po 39, 40)

Pri pripravi fosfonijeve soli je potekla nukleofilna substitucija (S<sub>N</sub>2), kjer je fosfor napadel na brom vezani ogljik alkil bromida, pri čemer se je odcepil brom kot dobro izstopajoča skupina.

Sinteza fosfonijeve soli **7** je uspela brez težav z visokim izkoristkom – 97 %. Težave so nastopile pri sintezi spojin **9** in **10**, kjer produkta nista nastala. V prvi stopnji smo iz 4-(bromometil)benzensulfonil klorida in trifenilfosfina sintetizirali fosfonijevo sol z močno elektrofilno klorosulfonilno skupino (spojina **8**). Da bi preprečili reakcijo z vodo, smo pri sintezi uporabili brezvodni acetonitril, reakcijo pa izvajali v inertni argonovi atmosferi. Prilagodili smo tudi temperaturo in reakcijo na začetku izvajali pri sobni temperaturi, nato pri temperaturi refluxa segrevali zgolj eno uro ter počasi ohlajali do sobne temperature čez noč, v nasprotju s splošnim postopkom pri spojini **7**, kjer je reakcija ves čas potekala pri temperaturi refluxa. Tako smo se skušali izogniti preveč burni reakciji dobrega elektrofila pri visoki temperaturi in zmanjšati nastanek stranskih produktov, medtem ko zgolj sobna temperatura brez segrevanja verjetno ne bi zadostovala za potek reakcije. Oljnat vmesni produkt smo takoj uporabili v naslednjih reakcijskih stopnjah, kjer smo po mehanizmu nukleofilne substitucije z amoniakom (pri spojini **10**) in dietilaminom (pri spojini **9**) želeli pripraviti ustrezna sulfonamida. Preostanka v bučkah po uparevanju topila in kristalizaciji je bilo zelo malo, željena produkta pa nista nastala. Na TLC-kromatogramu

je bila pri obeh reakcijah vidna močna lisa na startu, iz česar sklepamo, da je nastala sol, vendar je iz rezultatov masne in NMR spektroskopije razvidno, da soli nista naša načrtovana produkta. Sintezni postopek 5 tako kljub prilagoditvam ni bil primeren za sintezo trifenilfosfonijevih soli s sulfonamidnim fragmentom. Reakcijo pretvorbe v ilid smo zato nadaljevali zgolj s spojino **7** in predhodno sintetizirano spojino **13**, nato pa smo s spojinama **5** in **6** tvorili alkene.

V inertni argonovi atmosferi in brezvodnih pogojih smo z močno bazo (NaHMDS) s soli odcepili proton, s čimer je ogljikov atom postal negativno nabit in nastal je ilid, kar smo opazili že z rdečim obarvanjem reakcijske zmesi. Nato smo v reakcijsko zmes dodajali aldehid (spojini **5**, **6**) po kapljicah, da smo zagotovili enakomeren potek reakcije. Pri tem je nukleofilni ogljik ilida napadel elektrofilni karbonilni ogljik aldehida, pri čemer je nastal nestabilni dipolarni betain, ki se je preko štiričlenskega obroča oksafosfoetana, ki je nastal, ko se je tvorila vez med kisikom in fosforjem, pretvoril v alken in trifenilfosfonijev oksid (Slika 34).

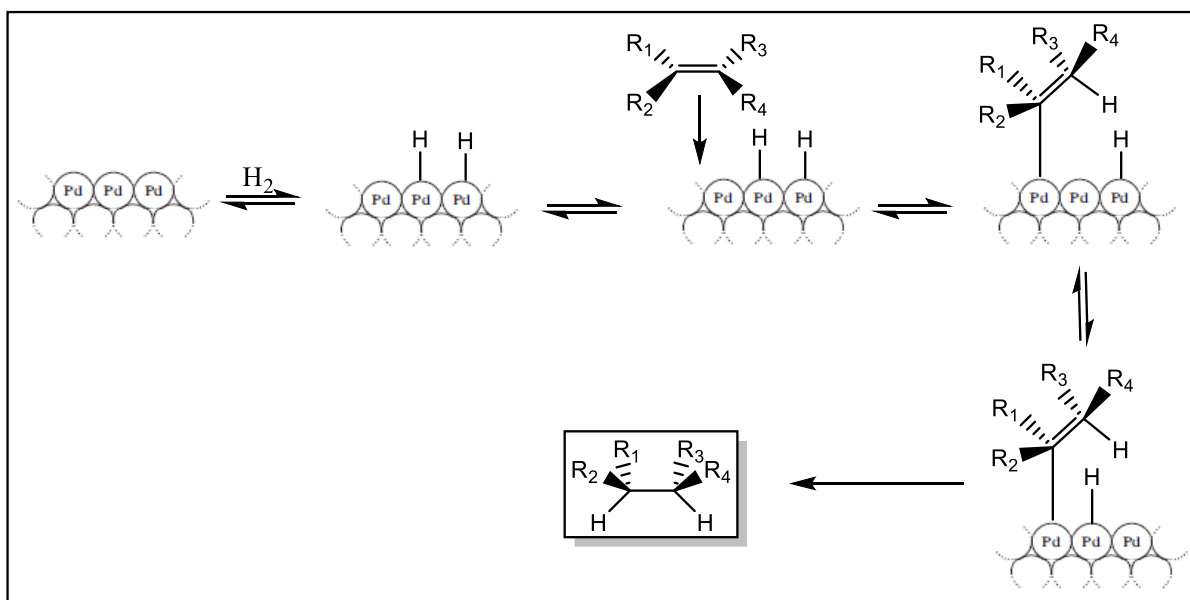
Wittigove reakcije smo se poslužili, ker je njena glavna prednost pred eliminacijskimi metodami priprave dvojne vezi (dehidrogeniranje alkoholov, dehalogeniranje), da dvojna vez vedno nastane na mestu, kjer se je v aldehidu nahajala karbonilna skupina in ne pride do nastanka drugih strukturnih izomerov (40). Nastaneta pa lahko dva geometrijska izomera okrog dvojne vezi, saj reakcija z delno stabiliziranimi ilidi ne poteče stereoselektivno (39). V našem primeru sta tako pri obeh reakcijah nastala geometrijska izomera *cis* (Z) in *trans* (E), ki se razlikujeta po fizikalno-kemijskih lastnostih, vključno z retencijskim faktorjem ( $R_f$ ), kar smo izkoristili pri ločevanju produktov. Čistili smo jih s kolonsko kromatografijo, s čimer smo se hkrati znebili tudi vseh nastalih stranskih produktov in nezreagiranih izhodnih spojin. V obeh primerih je bil  $R_f$  izomera *cis* nekoliko višji od  $R_f$  izomera *trans*, ločitev pa je potekala brez težav. Izkoristek pri spojinah z metilsulfonilnim fragmentom in s piperidinskim skeletom (**11**, **12**) (30,4 %) je za približno 8 % nižji od izkoristka pri reakciji 4-fluorofenilnih analogov s piperidinskim skeletom, kjer so kot bazo uporabili *n*-BuLi in reakcijo izvajali pri temperaturi  $-78^\circ\text{C}$  (25). Hkrati pa je izkoristek pri 4-fluorofenilnih analogih z azetidinskim skeletom (**14**, **15**) nekoliko višji (43 %) od izkoristka pri 4-fluorofenilnih analogih s piperidinskim skeletom. Razlike v izkoristkih lahko pripišemo predvsem nastanku vrste stranskih produktov pri metilsulfonilnih analogih, ki jih je bilo občutno več kot pri fluorofenilnih, in večji

reaktivnosti štiričlenskega obroča v primerjavi s šestčlenskimi. Pri vseh reakcijah pa lahko izgube pripišemo tudi ločevalni metodi, saj se na kromatografski koloni produkt izgublja. Dodatno smo ugotovili tudi, da je pri reakciji analogov s piperidinskim skeletom razmerje med nastalima izomeroma *cis* in *trans* pomaknjeno v korist izomeru *trans*, medtem ko pri azetidinskih analogih primarno nastaja izomer *cis*.

### 5.2.5. Redukcija dvojne vezi s katalitskim hidrogeniranjem

Z Wittigovo reakcijo smo pridobili nenasičene produkte. Da bi pridobili tudi nasičene derivate, smo izvedli katalitsko hidrogeniranje.

Reakcijo smo izvajali v vodikovi atmosferi, pri čemer smo se kisika iz raztopine znebili s predhodnim preprihovanjem z argonom. Del plinastega vodika se je v topilu raztopil in adsorbiral na trdni katalizator (paladij), fino razdrobljen in porazdeljen po nosilcu, aktiviranem ogljiku. Hkrati se je s tvorbo šibkih vezi med paladijem in ogljikom ob dvojni vezi na katalizator reverzibilno vezal alken. Sosednjim ogljikovim atomom na drugem koncu dvojne vezi alkena je nato kovalentno vez tvoril vodik, vezan na katalizator v bližini vezanega alkena. S površinsko difuzijo se je molekuli približal še drugi atom na katalizator vezanega vodika in tvoril kovalentno vez z drugim atomom ogljika, kar je povzročilo prekinitev vezi s paladijem in molekula nastalega alkana se je sprostila (42).

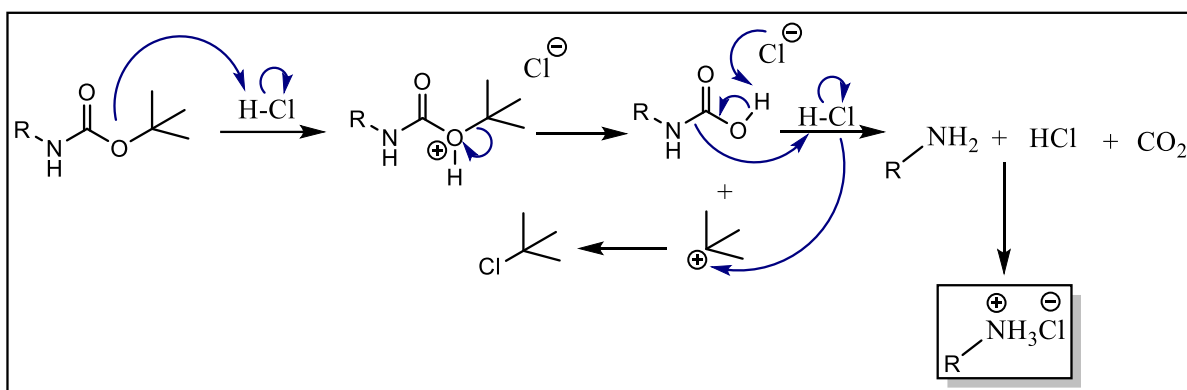


Slika 35: Mehanizem redukcije dvojne vezi s katalitskim hidrogeniranjem (prirejeno po 42)

Pri izvajanju reakcije je bilo pomembno, da smo reakcijsko zmes med potekom reakcije nenehno mešali, saj smo tako omogočili boljši stik s katalizatorjem in posledično povečali izkoristek ter omogočili potek reakcije pri sobni temperaturi in normalnem tlaku. Nastali reducirani produkt smo zlahka izolirali, saj je ostal raztopljen v topilu, katalizator pa smo iz zmesi odfiltrirali. Izkoristka reakcij sta bila dobra (90 % pri piperidinskem analogu in 87 % pri azetidinskem analogu).

### 5.2.6 Odščita *tert*-butilkarbamata z acidolizo

Ker je naslednji načrtovani sintezni korak potekal na do tedaj zaščiteni amino skupini, smo jo morali pred nadaljnjim izvajanjem reakcije odščititi. *Tert*-butil karbamat pri nizkih vrednostih pH ni obstojen, zato smo odščito izvedli z acidolizo s koncentrirano HCl v etanolu (43).



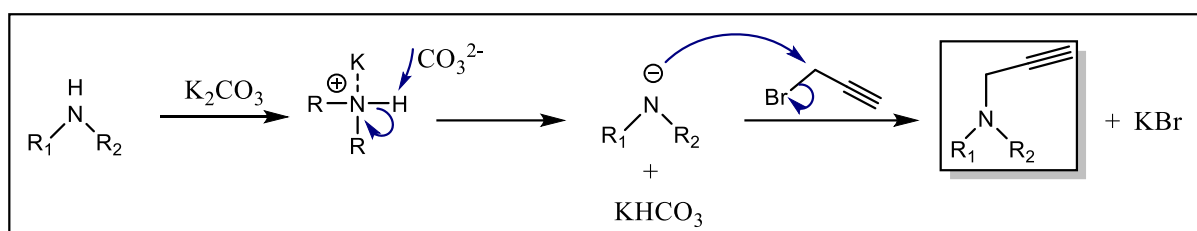
Slika 36: Mehanizem odstranitve Boc<sub>2</sub>O z acidolizo (prirejeno po 43)

Prisotnost močne kisline je povzročila protoniranje karbamata, pri čemer je izstopil *tert*-butilni kation, ki je nato reagiral s kloridnim ionom. Iz nastale karbaminske kisline se je nato odcepila še karboksilna skupina in nastal je odščiteni amin, zaradi prisotnosti HCl v obliki kloridne soli. Reakcije so v vseh primerih potekle do konca, kar smo preverili s TLC-kromatogramom, po katerem odščiteni produkti niso potovali. Nastale produkte smo takoj uporabili v naslednji reakcijski stopnji.

### 5.2.7. *N*-alkiliranje s K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

V zadnji reakcijski stopnji smo na odščiteni amin pripeli še za delovanje ključno propargilno skupino. Reakcija je potekla po mehanizmu nukleofilne substitucije, pri čemer

je kalijev ion kot Lewisova kislina reagiral z bazičnim aminom in z njim tvoril kompleks. Dušikov atom je tako postal pozitivno nabit, nanj vezani vodik pa dovolj kisel, da se je lahko odcepil, kar je vodilo do nastanka končnega produkta in HBr, ki ga je  $K_2CO_3$  hkrati nevtraliziral (Slika 37) (44). Selektivnost reakcije in čim večji izkoristek smo skušali zagotoviti z brezvodnimi pogoji v inertni argonovi atmosferi in izvajanjem prvega dela reakcije na ledeni kopeli. Vodotopnih stranskih produktov smo se znebili z ekstrakcijo, nato pa smo produkt čistili in izolirali s kolonsko kromatografijo.



Slika 37: Mehanizem N-alkiliranja s kalijevim karbonatom (prirejeno po 44)

Pri nenasičenih spojinah s piperidinskim skeletom (**19,21**) je reakcija v 24 urah potekla brez težav. Izkoristka sta bila dobra. Neželeni stranski produkti niso nastali, saj je bila na TLC-kromatogramu po ekstrakciji v obeh primerih vidna zgolj ena lisa, izgube pa so nastale predvsem med čiščenjem na kromatografski koloni. Izkoristek reakcije derivata *cis* (75 %) je bil primerljiv z izkoristkom pri N-alkiliranju analogov s 4-fluorofenilnim fragmentom, kjer so kot bazo uporabili Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> v brezvodnem DMF (25), medtem ko je bil pri reakciji derivata *trans* izkoristek v našem primeru kar 3-krat višji (85 %). V nasprotju z nenasičenima derivatoma pa pri reduciranem derivatu (**23**) reakcija ni potekla. Po 24 urah je bila na TLC-kromatogramu vidna zelo šibka lisa potencialnega produkta, zato smo reakcijo pustili potekati pri enakih pogojih in potek s TLC sproti spremljali. Po dodatnih 3 dneh smo reagente znova dodali, reakcijsko zmes 1 h segrevali na 70°C in jo nato pustili mešati še 48 ur. Nato smo znova dodali dvakratno količino reagentov in pustili mešati 20 ur pri 60°C. Na TLC-kromatogramu so bile vidne tri izjemno šibke lise, ki smo jih s kolonsko kromatografijo sicer uspešno ločili, vendar je analiza NMR pokazala, da načrtovanega produkta ni bilo med njimi. Da produkt ni nastal, nas je nekoliko presenetilo, saj je reakcija v primeru analoga s 4-fluorofenilnim fragmentom potekla brez težav z visokim (85,2 %) izkoristkom (25). Kaže, da je reaktivnost nasičenega derivata načrtovanega analoga občutno manjša.

Reakcijo z analogi z azetidinskim skeletom smo sprva izvajali po enakem postopku. Pri nenasičenih derivatih (**25**, **27**) je po 24 urah nastalo zelo malo produkta, zato smo v obe reakcijski zmesi znova dodali propargilbromid in produkt *cis* izolirali po dodatnih 3 urah, derivat *trans* pa po dodatnih 20 urah. Reakciji kljub temu nista potekli do konca, saj je v obeh primerih v reakcijski zmesi ostalo še nekaj nezreagirane izhodne spojine, hkrati pa sta bili na TLC-kromatogramih v obeh primerih vidni po dve lisi produktov. Oboje je prispevalo k manjšemu izkoristku. Produkta smo uspešno izolirali in očistili, po analizi rezultatov NMR in masne spektroskopije pa smo ugotovili, da načrtovana produkta nista nastala. Namesto monoalkiliranih sta namreč nastala dialkilirana derivata. Sklepamo, da je predvsem zaradi razlik v velikosti med azetidinskim in piperidinskim obročem ter manjše sterične oviranosti v primeru azetidinskega obroča prišlo do kvaternizacije terciarnega amina s propargil bromidom.

S ciljem pridobiti načrtovane monoalkilirane derivate smo reakcijo izvedli znova in pri tem spremenili množinsko razmerje reagentov in reakcijske pogoje. Najprej smo pod enakimi pogoji ponovili vse reakcijske stopnje do vmesnih produktov **24** in **26**, z njima pa nato nadaljevali po spremenjenem postopku, pri čemer smo potek reakcije ves čas spremljali s TLC. Reakcijsko zmes smo pripravili na ledeni kopeli, ki je tokrat po dodatku propargil bromida nismo odstranili, temveč smo jo po 110 min zamenjali s hladno vodo, ki smo jo odstranili po 165 min. Tako smo skušali doseči nadzorovano višanje temperature reakcijske zmesi in omogočiti počasnejši potek reakcije, hkrati pa z dvigom temperature zagotovili, da reakcija poteče. Spremenili smo tudi množinska razmerja reagentov. Namesto propargil bromida smo v prebitku dodali izhodno spojino, hkrati pa smo zmanjšali tudi količino baze in tako skušali preprečiti dodatno alkiliranje monoalkiliranega derivata s prebitnim propargil bromidom. Monoalkilirani derivat je pri teh pogojih uspešno nastajal, kar smo opazovali s TLC, kjer smo  $R_f$  nastajajočega produkta primerjali z  $R_f$  dialkiliranega derivata ( $R_f$  monoalkiliranega derivata je zaradi manjše lipofilnosti nižji). Po 2,5 urah smo pri produktu *trans* začeli zaznavati prisotnost dialkiliranega derivata. Reakciji smo ustavili po 3,5 urah, ko je bila ta lisa še šibka, lisi monoalkiliranega derivata in izhodne spojine na startu pa približno enako močni. Tako smo želeli doseči, da reagira vsaj polovična količina izhodne spojine in s tem prispevati k večjemu izkoristku, hkrati pa karseda omejiti delež dialkiliranega produkta. Pri produktu *cis* lise dialkiliranega derivata takrat še ni bilo mogoče opaziti. Na razvitem TLC-kromatogramu koncentriranih



produktov pa smo pozneje v obeh primerih opazili prisotnost dialkiliranega derivata, iz česar sklepamo, da ne glede na reakcijske pogoje pri reakciji nastajata oba derivata, vendar se sorazmerno s pretečenim časom spreminja razmerje med njima v korist dialkiliranemu. S spremenjenimi reakcijskimi pogoji smo njegov nastanek le upočasnili.

Na TLC-kromatogramih smo pri obeh produktih sprva lahko opazili zgolj eno liso z  $R_f$  monoalkiliranega produkta, iz česar smo zmotno sklepali, da v zmesi (razen nekoliko dialkiliranega derivata z občutno višjim  $R_f$ ) ni drugih stranskih produktov. Ko smo produkta čistili s kolonsko kromatografijo, pa smo pri nanosu frakcij s kromatografske kolone na TLC-ploščo opazili, da sta hkrati z derivatoma nastajali nečistoti s skoraj zanemarljivo različnima  $R_f$  od  $R_f$  produktov.  $R_f$  nastale nečistote pri derivatu *cis* (**30**) je bil nekoliko nižji od  $R_f$  produkta, v primeru derivata *trans* (**31**) pa nekoliko višji. Pri derivatu *trans* nam njuna ločitev na koloni ni povzročala težav, derivata *cis* pa nismo mogli zadovoljivo očistiti, ker se je nečistota s kolone izločala hkrati s produktom. Ker je bila količina nečistote manjša od količine produkta, smo zbirali zgolj zadnje kolonske frakcije, kjer je bila količina nečistote najmanjša oziroma nečistota ni bila več prisotna, in jih nato znova ločevali. Postopek smo ponovili z vrsto različnih mobilnih faz, vendar nam v nobenem primeru ni uspelo izolirati popolnoma čistega produkta, saj sta se nečistota in produkt v vseh preizkušanih mobilnih fazah s kolone izločala skupaj. Najučinkoviteje smo produkt očistili z mobilno fazo: diklorometan/metanol = 20/1. Ker smo ves čas zbirali zgolj zadnje frakcije, kjer je bila hkrati s količino nečistote najmanjša tudi količina produkta in smo produkt tako ves čas izgubljali, je bil izkoristek reakcije posledično izjemno nizek (4 %). Zadostno količino zadovoljivo čistega produkta bi lahko izolirali, zgolj če bi reakcijo nastavili z zelo veliko količino izhodne spojine.

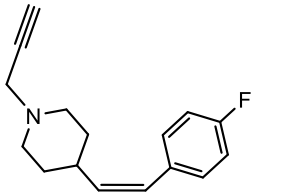
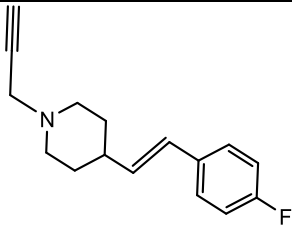
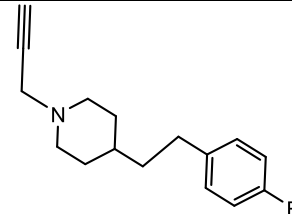
Nasičenega derivata monoalkiliranega produkta se nam ni zdelo smiselno pripravljati, saj je, glede na počasen potek in slab izkoristek reakcije pri nenasičenih derivatih, zelo verjetno, da produkt v zadostni količini ne bi nastal.

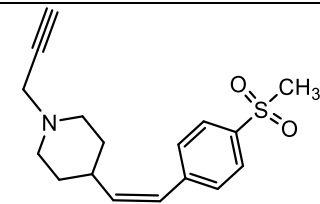
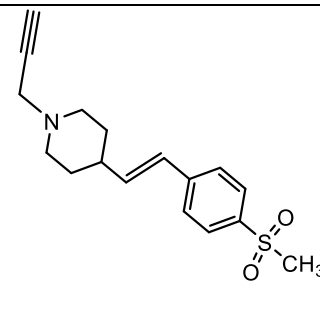
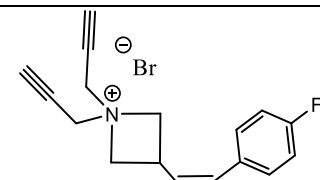
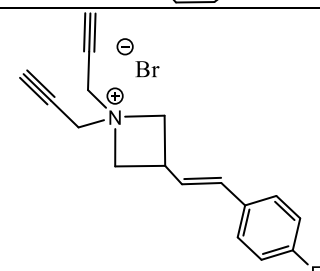
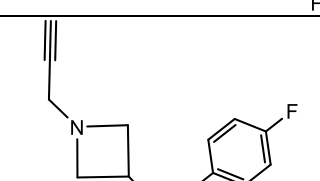
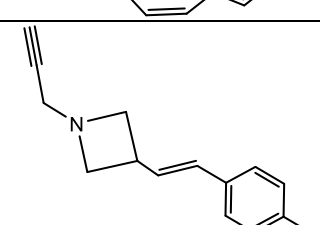
### 5.3. REZULTATI BIOLOŠKEGA VREDNOTENJA

Pri vrednotenju delovanja spojin smo za vse spojine najprej določili rezidualno aktivnost encima (RA) ob prisotnosti spojine pri koncentraciji 100  $\mu\text{M}$ . (RA je razmerje med aktivnostjo encima ob prisotnosti zaviralca in njegovi odsotnosti.) Tistim spojinam, ki so delovanje encima zavrle vsaj za polovico ( $\text{RA} < 50\%$ ), smo določili tudi  $\text{IC}_{50}$ , to je vrednost koncentracije spojine, potrebna za zavrtje delovanja encima za 50 %. Rezultati so prikazani v Razpredelnici XX. V Razpredelnici XIX so prikazani rezultati biološkega vrednotenja derivatov spojine, iz katere smo pri načrtovanju sinteze izhajali (25). Označili smo jih s številkami od **01** do **03**.

Vrednosti  $\text{IC}_{50}$ , ki smo jih določili le spojinam, pri katerih je bil  $\text{RA} < 50\%$  pri 100  $\mu\text{M}$ , so v razpredelnicah prikazane z okrepjenim tiskom, vrednosti RA (pri spojinah, ki jim vrednosti  $\text{IC}_{50}$  nismo določili) pa z neokrepjenim.

Razpredelnica XIX: Rezultati biološkega vrednotenja predhodno sintetiziranih spojin (25)

Oznaka spojine	Struktura spojine	hMAO-A $\text{IC}_{50}$ [nM] ali RA [%] pri 100 $\mu\text{M}$	hMAO-B $\text{IC}_{50}$ [nM] ali RA [%] pri 100 $\mu\text{M}$
<b>01</b>		<b><math>\text{IC}_{50} = 0,726 \pm 0,027 \text{ nM}</math></b>	<b><math>\text{IC}_{50} = 6,222 \pm 0,727 \text{ nM}</math></b>
<b>02</b>		RA = 60,2 $\pm$ 1,6 %	<b><math>\text{IC}_{50} = 0,342 \pm 0,022 \text{ nM}</math></b>
<b>03</b>		RA = 76,9 $\pm$ 2,2 %	<b><math>\text{IC}_{50} = 0,370 \pm 0,037 \text{ nM}</math></b>

Oznaka spojine	Struktura spojine	hMAO-A IC <sub>50</sub> [nM] ali RA [%] pri 100 μM	hMAO-B IC <sub>50</sub> [nM] ali RA [%] pri 100 μM
<u>19</u>		RA = 70.6 ±5.8%	RA = 2.3 ±0.9% <b>IC<sub>50</sub> = 8444.7 ±627.1 nM</b>
<u>21</u>		RA = 68.7 ±0.2%	RA = 3,9 ±1.9% <b>IC<sub>50</sub> = 32.7 ±2.5 nM</b>
<u>25</u>		RA = 88.0 ±0.97%	RA = 60.2 ±1.9%
<u>27</u>		RA = 86.2 ±4.6%	RA = 83.9 ±3.5%
<u>28</u>		RA = 14.7 ±0.9% <b>IC<sub>50</sub> = 3183.2 ±91.9 nM</b>	RA = 70.3 ±0.5%
<u>29</u>		RA = 70.2 ±0.5%	RA = 14.7 ±0.9% <b>IC<sub>50</sub> = 9706.5 ±569.7 nM</b>

## 5.4 KOMENTAR REZULTATOV BIOLOŠKEGA VREDNOTENJA

Zaviralno delovanje smo ovrednotili vsem sintetiziranim spojinam, vključno z nenačrtovanima dialkiliranimi derivatoma. Opazimo lahko, da sta oba dialkilirana derivata neaktivna pri obeh izoencimih, kar je skladno z našimi pričakovanji, saj so molekule z dvema *N*-propargilaminskima skupinama najverjetneje prevelike, da bi dosegle aktivno mesto.

V nasprotju z dialkiliranimi pa sta bila monoalkilirana azetidinska derivata **28** in **29** dokaj aktivna. Opazimo lahko, da smo z zamenjavo piperidinskega obroča z azetidinskim pridobili učinkovita zaviralca, selektivna za eno izoencimsko obliko. Derivat *cis* namreč, nasprotno od derivata *cis* s piperidinskim skeletom (**01**), ki je aktiven pri obeh izoencimih, selektivno zavira MAO-A, medtem ko derivat *trans* selektivno zavira MAO-B. Hkrati pa lahko opazimo, da smo z zamenjavo obroča veliko izgubili pri jakosti delovanja. Azetidinska derivata delovanje encimov sicer učinkovito zavirata, vendar delujeta šele v mikromolarnem koncentracijskem območju, kar je mnogo slabše od piperidinskih analogov, ki so aktivni že v nanomolarnem območju. Kaže, da kljub manjšemu osnovnemu skeletu molekule, ki lahko še lažje doseže aktivno mesto encima skozi ozek vstopni del, delovanje spojine ni izboljšano, prav tako pa se pri delovanju na tarčo ne odraža niti večja reaktivnost azetidinskega obroča. Predvidevamo lahko, da bi tudi reducirani derivat, če bi ga uspeli sintetizirati v zadostni količini, deloval bistveno slabše od piperidinskega analoga, ki je aktiven že v nanomolarnih koncentracijah.

Nasprotno kot pri zamenjavi obroča pa smo pri zamenjavi 4-fluorofenilnega substituenta z metilsulfonilfenilnim uspeli pridobiti zaviralec MAO-B z visoko jakostjo delovanja – spojina **21** namreč zavira encim že v nanomolarnih koncentracijah. Če njegovo delovanje primerjamo s 4-fluorofenilnim analogom (**02**), pri katerem je bila za 50 % zavrtje encima potrebna 100-krat nižja koncentracija, ugotovimo, da deluje šibkeje. Kljub temu pa bi zaradi boljših hidro-lipofilnih lastnosti morda lahko bil boljša alternativa. Pri metilsulfonilfenilnih analogih smo opazili tudi, da tako *cis* kot *trans* geometrijska izomera selektivno zavirata MAO-B. Selektivnih zaviralcev MAO-A tako z zamenjavo substituenta nismo uspeli pridobiti, vpliva enojne vezi v spojinah pa nismo mogli ovrednotiti, saj reakcija sinteze reduciranega derivata ni potekla.

## 6. SKLEP

Z namenom pridobiti nove potencialne zaviralce encimov MAO-A in MAO-B smo v sklopu raziskovalnega dela magistrske naloge skladno z zastavljenimi cilji sintetizirali analoge znanega zaviralca MAO-B in tako pridobili 6 končnih spojin ter ovrednotili njihovo zaviralno delovanje na obeh izoencimih.

- Uspešno smo pripravili zgolj 4-fluorofenilne azetidinske in metilsulfonilfenilne piperidinske analoge, medtem ko se je sinteza sulfonamidnih piperidinskih derivatov ustavila pri stopnji priprave fosfonijevih soli. Uporabljeni postopek namreč za pripravo sulfonamidnih analogov fosfonijevih soli ni bil ustrezen.
- Wittigova reakcija se je izkazala za ustrezen način pridobivanja dvojne vezi, tako pri analogih s piperidinskim kot z azetidinskim skeletom. V obeh primerih smo pridobili *cis* in *trans* geometrijska izomera, pri čemer smo ugotovili, da v primeru piperidinskega osnovnega skeleta primarno nastaja izomer *trans*, pri azetidinskih analogih pa izomer *cis*.
- Z reakcijo *N*-alkiliranja smo uspešno pridobili nenasičena piperidinska analoga, medtem ko se je izkazalo, da pri nasičenem derivatu reakcija zaradi premajhne reaktivnosti ne poteče. Ugotovili smo, da postopek ni ustrezen za pripravo azetidinskih analogov, saj pride do kvaternizacije aminskega dušika in dvojnega alkiliranja, tako pridobljeni dialkilirani produkti pa so neaktivni pri obeh izoencimih. S prilagoditvijo postopka z regulacijo temperature, časa in spremenjenim razmerjem dodanih reagentov smo nato uspešno pridobili tudi načrtovane monoalkilirane derivate, razen nasičenega derivata. Hkrati smo ugotovili, da ne glede na reakcijske pogoje vedno nastajata tako monoalkilirani kot dialkilirani derivat.
- Oba strukturna izomera piperidinskih analogov (**19**, **21**) selektivno zavirata MAO-B, medtem ko pri monoalkiliranih azetidinskih analogih izomer *cis* (**28**) selektivno zavira MAO-A, izomer *trans* (**29**) pa MAO-B.
- Med preskušanimi spojinami zgolj spojina **21** deluje v nanomolarnem koncentracijskem območju, pri čemer selektivno zavira MAO-B.

Spojina **21** je tako obetaven selektivni zaviralec MAO-B in predstavlja izhodišče za nadaljnje raziskovalno delo, medtem ko so analogi z azetidinskim osnovnim skeletom

precej manj aktivni od piperidinskih analogov in zato za nadaljnje raziskovanje manj zanimivi.

## 7. LITERATURA IN VIRI

1. Kurian MA, Gissen P, Smith M, Heales SJR, Clayton PT: The monoamine neurotransmitter disorders: an expanding range of neurological syndromes. *The Lancet, Neurology* 2011; 10(8): 721-33.
2. Broadley KJ: The vascular effects of trace amines and amphetamines. *Pharmacology & Therapeutics* 2010; 125(3): 363–375.
3. Lemke TL, Williams DA, Roche WF, Zito SW: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 7. izdaja, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013: 143-144, 365-468, 543.
4. Youdim MB, Edmondson D, Tipton KF: The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nature Reviews, Neuroscience* 2006; 7(4): 295-309.
5. Ramsay RR: Molecular aspects of monoamine oxidase B. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2016; 69: 81–89.
6. Finberg JPM: Update on the pharmacology of selective inhibitors of MAO-A and MAO-B: focus on modulation of CNS monoamine neurotransmitter release. *Pharmacology & Therapeutics* 2014; 143(2): 133-52.
7. Reyes-Parada M, Fierro A, Iturriaga-Vásquez P, Cassels BK: Monoamine Oxidase Inhibition In the Light of New Structural Data. *Current Enzyme Inhibition* 2005; 1(1): 85-95.
8. Youdim MBH, Bakhle YS: Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. *British Journal of Pharmacology* 2006; 147: 287–296.
9. Fišar Z: Drugs related to monoamine oxidase activity. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2016; 69: 112–124.
10. Binda C, Newton-Vinson P, Hubalek F, Edmondson DE., Mattevi A: Structure of Human Monoamine Oxidase B, a Drug Target for the Treatment of Neurological Disorders. *Nature Structural Biology* 2002; 9(1): 22-26.
11. Kaludercic N, Carpi A, Menabò R, Di Lisa F, Paolocci N: Monoamine oxidases (MAO) in the pathogenesis of heart failure and ischemia/reperfusion injury. *Biochimica et Biophysica Acta* 2011; 1813(7): 1323–1332.
12. Shulman KI, Herrmann N, Walker SE: Current Place of Monoamine Oxidase Inhibitors in the Treatment of Depression. *CNS Drugs* 2013; 27(10): 789–797.

13. Finberg JPM, Rabey JM: Inhibitors of MAO-A and MAO-B in Psychiatry and Neurology. *Frontiers in Pharmacology* 2016; 7(340).
14. Flisar D: Zdravljenje Parkinsonove bolezni. *Farmacevtski vestnik* 201; 66: 19-22.
15. Ebadi M, Sharma S, Shavali S, El Refaey H: Neuroprotective Actions of Selegiline. *Journal of Neuroscience Research* 2002; 67: 285–289.
16. Youdim MBH, Bar Am O, Yogev-Falach M, Weinreb O, Maruyama W, Naoi M, Amit T: Rasagiline: neurodegeneration, neuroprotection, and mitochondrial permeability transition. *Journal of Neuroscience Research* 2005; 79(1-2): 172-179.
17. Weinreb O, Amit T, Bar-Am O, Chillag-Talmor O, Youdim MBH: Novel Neuroprotective Mechanism of Action of Rasagiline Is Associated with Its Propargyl Moiety: Interaction of Bcl-2 Family Members with PKC Pathway. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2005; 1053: 348-55.
18. Song MS, Matveychuk D, MacKenzie EM, Duchcherer M, Mousseau DD, Baker GB: An update on amine oxidase inhibitors: multifaceted drugs. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2013; 44: 118–124.
19. Mandel S, Weinreb O, Amit T, Youdim MBH: Mechanism of neuroprotective action of the anti-Parkinson drug rasagiline and its derivatives. *Brain Research Reviews* 2005; 48(2): 379– 387.
20. Yáñez M, Padín JF, Arranz-Tagarro JA, Camiña M, Laguna R: History and Therapeutic Use of MAO-A Inhibitors: A Historical Perspective of MAO-A Inhibitors As Antidepressant Drug. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2012; 12(20): 2275-2282.
21. Živin M, Šket D: Temelji patološke fiziologije, 2. izdaja, UL MF Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2011: 305-311.
22. Cai Z: Monoamine oxidase inhibitors: Promising therapeutic agents for Alzheimer's disease (Review). *Molecular Medicine Reports* 2014; 9(5): 1533-1541.
23. Lighezan R, Sturza A, Duicu OM, Ceausu RA, Vaduva A, Gaspar M, Feier H, Vaida M, Ivan V, Lighezan D, Muntean DM, Mornos C: Monoamine oxidase inhibition improves vascular function in mammary arteries from nondiabetic and diabetic patients with coronary heart disease. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 2016; 94(10): 1040-1047.



24. Cui Y, Liu KWK, Liang Y, Ip MSM, Mak JCW: Inhibition of monoamine oxidase-B by selegiline reduces cigarette smoke-induced oxidative stress and inflammation in airway epithelial cells. *Toxicology Letters* 2017; 268: 44–50.
25. Huremović D: Načrtovanje in sinteza derivatov N-propargilpiperidina kot potencialnih zaviralcev monoaminooksidaze tipa B in butilholinesteraze. Magistrska naloga; Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani; 2016.
26. Chen X, Hussain S, Parveen S, Zhang S, Yang Y, Zhu C: Sulfonyl group-containing compounds in the design of potential drugs for the treatment of diabetes and its complications. *Current Medicinal Chemistry* 2012; 19(21): 3578-3604.
27. Paruszewski R, Strupinska M, Rostafinska-Suchar G, Stables J P: Anticonvulsant Activity Of Benzylamides Of Some Amino Acids And Heterocyclic Acids. *Proteine and Peptide Letters* 2003; 10(5): 475-482.
28. Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, Pečar S: Farmaceutvska kemija III. Vaje in seminarji: Dodatne vsebine za razumevanje, Zaščitne skupine, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010.
29. [http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn\\_Pages/Boc\\_Protection/Boc\\_Protection\\_Mech.htm](http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_Mech.htm) (Common Organic Chemistry, Boc Protection (Boc<sub>2</sub>O); dostopano 10. 3. 2017).
30. Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, Pečar S: Farmaceutvska kemija III. Vaje in seminarji: Dodatne vsebine za razumevanje, Redukcije in oksidacije – pregled reagentov, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010.
31. Nahm S, Weinreb SM: N-methoxy-N-methylamides as effective acylating agents. *Tetrahedron Letters* 1981; 22(39): 3815 – 381.
32. Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, Pečar S: Farmaceutvska kemija III. Vaje in seminarji: Dodatne vsebine za razumevanje, Metode N- in O-aciliranja, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010.
33. Valeur E, Bradley M: Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chemical Society Reviews* 2009; 38(2): 606-31.
34. [http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn\\_Pages/Amine\\_to\\_Amide\\_Coupling/Amine\\_to\\_Amide\\_Coupling\\_HATU\\_Mech.htm](http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Amine_to_Amide_Coupling/Amine_to_Amide_Coupling_HATU_Mech.htm) (Common Organic Chemistry, Amine to Amide (HATU); dostopano 11. 03. 2017).
35. Movassagh B, Balalaie S, Shaygana P: A new and efficient protocol for preparation of thiol esters from carboxylic acids and thiols in the presence of 2-(1H-

- benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU).  
ARKIVOC 2007; 13: 47-52.
36. [http://documents.bachem.com/coupling\\_reagents.pdf](http://documents.bachem.com/coupling_reagents.pdf) (Bachem AG, 2017: Coupling Reagents; dostopano: 10. 03. 2017).
  37. Singh J, Satyamurthi N, Singh-Aidhen I: The Growing Synthetic Utility of Weinreb's Amide. *Journal für Praktische Chemie*. 2000; 342(4).
  38. Bruckner R: *Organic Mechanisms: Reactions, Stereochemistry and Synthesis*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1. izdaja, 2010: 311-312, 795-800.
  39. Bruckner R: *Organic Mechanisms: Reactions, Stereochemistry and Synthesis*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1. izdaja, 2010: 457-459.
  40. Edmonds M, Abell A: *Modern Carbonyl Olefination*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2003: 1-17.
  41. [https://chem.libretexts.org/?title=Core/Organic\\_Chemistry/Aldehydes\\_and\\_Ketones/Reactivity\\_of\\_Aldehydes\\_%26\\_Ketones/The\\_Wittig\\_Reaction](https://chem.libretexts.org/?title=Core/Organic_Chemistry/Aldehydes_and_Ketones/Reactivity_of_Aldehydes_%26_Ketones/The_Wittig_Reaction) (MindTouch, 2014, The Wittig reaction; dostopano 11. 03. 2017).
  42. Bruckner R: *Organic Mechanisms: Reactions, Stereochemistry and Synthesis*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1. izdaja, 2010: 311-312, 806-811.
  43. [http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn\\_Pages/Boc\\_Protection/Boc\\_Protection\\_HCl\\_Mech.htm](http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_HCl_Mech.htm) (Common Organic Chemistry, Boc Deprotection (HCl); dostopano 11. 03. 2017).
  44. Salvatore RN, Nagle AS, Jung KW: Cesium Effect: High Chemoselectivity in Direct N-Alkylation of Amines. *Journal of Organic Chemistry* 2002; 67(3): 674-683.