

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

TOMAŽ NATEK

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TOMAŽ NATEK

*NAČRTOVANJE IN SINTEZA FLUORESCENČNO
OZNAČENIH NAFTALENSULFONAMIDNIH ZAVIRALCEV
BUTIRILHOLIN-ESTERAZE*

*DESIGN AND SYNTHESIS OF FLUORESCENTLY
LABELLED NAPHTHALENESULFONAMIDE INHIBITORS
OF BUTYRYLCHOLINESTERASE*

UNIFORM MASTER'S STUDY PROGRAMME PHARMACY

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljal na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Staneta Pajka, mag. farm. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo. *In vitro* testiranje končne spojine so izvedli na Fakulteti za farmacijo.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem doc. dr. Stanetu Pajku, mag. farm. za vso strokovno pomoč pri delu in njegovo svetovanje in pomoč pri pisanju magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi asist. dr. Danijelu Knezu za izvedbo zaviralnih testov in vsem sodelavcem Katedre za farmacevtsko kemijo, s katerimi sem si lahko delil laboratorijske prostore.

Zahvaljujem se tudi svoji družini za nesebično podporo tekom študija in vse nemalokrat potrebne besede spodbude.

Izjava

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

Tomaž Natek

Ljubljana, 2017

KAZALO

POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1 UVOD	1
1.1 ALZHEIMERJEVA BOLEZEN	1
1.2 HIPOTEZE NASTANKA ALZHEIMERJEVE BOLEZNI	3
1.2.1 Holinergična hipoteza.....	3
1.2.2 Hipoteza proteinopatij	4
1.3 ZDRAVLJENJE ALZHEIMERJEVE BOLEZNI	5
1.4 HOLIN-ESTERAZE (CHE)	6
1.4.1 Acetilholin-esteraza (AChE)	7
1.4.2 Butirilholin-esteraza (BChE)	8
1.5 OZNAČEVANJE HOLIN-ESTERAZ PO KOELLE-JU	10
1.6 RAZVOJ ZAVIRALCA BChE	11
1.7 „KLIK“ KEMIJA	12
2 NAČRT ZA DELO	15
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 REAGENTI IN TOPILA	17
3.2 METODE.....	17
4 EKSPERIMENTALNO DELO	19
4.1 SINTEZA (1-BENZILPIPERIDIN-3-IL)METANAMINA (3).....	19
4.2 SINTEZA N-[(1-BENZILPIPERIDIN-3-IL)METIL]NAFTALEN-2-SULFONAMIDA (4).....	20
4.3 SINTEZA 1,1,1-TRIFENIL-2,5,8,11-TETRAOKSATRIDEKAN-13-OLA (5).....	20
4.4 SINTEZA 1-(1,1,1-TRIFENIL-2,5,8,11-TETRAOKSATRIDEKAN-13-IL)PIPERAZINA (6).....	21
4.5 SINTEZA 13-AZIDO-1,1,1-TRIFENIL-2,5,8,11-TETRAOKSATRIDEKANA (7)	22
4.6 POSKUS SINTEZE 2-{2-[2-(2-AZIDOETOKSI)ETOKSI]ETOKSI}ETAN-1-OLA (8).....	23
4.7 SINTEZA 2-{2-[2-(2-AZIDOETOKSI)ETOKSI]ETOKSI}ETAN-1-OLA (8)	23
4.8 SINTEZA 1-AZIDO-2-{2-[2-(2-BROMOETOKSI)ETOKSI]ETOKSI}ETANA (9).....	24
4.9 SINTEZA 2-[2-(2-AZIDOETOKSI)ETOKSI]ETANOLA (10)	24
4.10 SINTEZA 1-AZIDO-2-[2-(2-BROMOETOKSI)ETOKSI]ETANA (11)	25
4.11 SINTEZA 2-(2-AZIDOETOKSI)ETANOLA (12)	25
4.12 SINTEZA 1-AZIDO-2-(2-BROMOETOKSI)ETANA (13)	26
4.13 SINTEZA TERC-BUTIL 4-(PROP-2-IN-1-IL)PIPERAZIN-1-KARBOKSILATA (14)	26
4.14 SINTEZA 1-(PROP-2-IN-1-IL)PIPERAZINJEVEGA KLORIDA (15)	27
4.15 SINTEZA 4-NITRO-7-[4-(PROP-2-IN-1-IL)PIPERAZIN-1-IL]-2,1,3- BENZOKSADIAZOLA (16).....	28
4.16 SINTEZA 6-(DIETILAMINO)-N,N-DIETIL-9-{2-[4-(PROP-2-IN-1-IL)PIPERAZIN-1-KARBONIL]FENIL}KSANTEN-3-IMINJEVEGA KLORIDA (17).....	29

4.17	SINTEZA 6-(DIETILAMINO)-N,N-DIETIL-9-{2-[4-(PROP-2-IN-1-IL)PIPERAZIN-1-KARBONIL]FENIL}KSANTEN-3-IMINIJEVEGA KLOORIDA (17) – 1. POSKUS OPTIMIZIRANJA REAKCIJE.....	30
4.18	SINTEZA 6-(DIETILAMINO)-N,N-DIETIL-9-{2-[4-(PROP-2-IN-1-IL)PIPERAZIN-1-KARBONIL]FENIL}KSANTEN-3-IMINIJEVEGA KLOORIDA (17) – 2. POSKUS OPTIMIZIRANJA REAKCIJE.....	30
4.19	SINTEZA 6-(DIETILAMINO)-N,N-DIETIL-9-{2-[4-(1,1,1-TRIFENIL-2,5,8,11-TETRAOKSATRIDEKAN-13-IL)PIPERAZIN-1-KARBONIL]FENIL}-3H-KSANTEN-3-IMINIJEVEGA KLOORIDA (18)	31
4.20	POSKUS SINTEZE 6-(DIETILAMINO)-N,N-DIETIL-9-{2-[4-(2-{2-[2-(2-HIDROKSJETOKSI)ETOKSI]ETOKSI}ETIL)PIPERAZIN-1-KARBONIL]FENIL}-3H-KSANTEN-3-IMINIJEVEGA KLOORIDA (19)	32
4.21	SINTEZA 6-(DIETILAMINO)-N,N-DIETIL-9-{2-[4-(2-{2-[2-(2-HIDROKSJETOKSI)ETOKSI]ETOKSI}ETIL)PIPERAZIN-1-KARBONIL]FENIL}-3H-KSANTEN-3-IMINIJEVEGA KLOORIDA (19)	33
4.22	SINTEZA 9-{2-[4-(2-{2-[2-(2-BROMOETOKSI)ETOKSI]ETOKSI}ETIL)PIPERAZIN-1-KARBONIL]FENIL}-6-(DIETILAMINO)-N,N-DIETILKSANTEN-3-IMINIJEVEGA KLOORIDA (20)	33
4.23	SINTEZA N-(2-{2-[2-(2-AZIDOETOKSI)ETOKSI]ETOKSI}ETIL)-N-[(1-BENZILPIPERIDIN-3-IL)METIL]NAFTALEN-2-SULFONAMIDA (21).....	34
4.24	POSKUS SINTEZE N-{2-[2-(2-AZIDOETOKSI)ETOKSI]ETIL}-N-[(1-BENZILPIPERIDIN-3-IL)METIL]NAFTALEN-2-SULFONAMIDA (22) -1.	35
4.25	POSKUS SINTEZE N-{2-[2-(2-AZIDOETOKSI)ETOKSI]ETIL}-N-[(1-BENZILPIPERIDIN-3-IL)METIL]NAFTALEN-2-SULFONAMIDA (22) -2.	35
4.26	POSKUS SINTEZE N-[2-(2-AZIDOETOKSI)ETIL]-N-[(1-BENZILPIPERIDIN-3-IL)METIL]NAFTALEN-2-SULFONAMIDA (23)	36
4.27	SINTEZA N-[2-(2-AZIDOETOKSI)ETIL]-N-[(1-BENZILPIPERIDIN-3-IL)METIL]NAFTALEN-2-SULFONAMIDA (23)	36
4.28	SINTEZA N-[(1-BENZILPIPERIDIN-3-IL)METIL]-N-{2-[2-(4-{4-(7-NITRO-2,1,3-BENZOKSADIAZOL-4-IL)PIPERAZIN-1-IL]METIL}-1H-1,2,3-TRIAZOL-1-IL)ETOKSI]ETIL}NAFTALEN-2-SULFONAMIDA (24)	37
4.29	POSKUS SINTEZE 9-[2-(4-{[1-(2-{2-[2-(2-N-[(1-BENZILPIPERIDIN-3-IL)METIL]NAFTALEN-2-SULFONAMIDO)ETOKSI]ETOKSI]ETOKSI}ETIL)-1,2,3-TRIAZOL-4-IL]METIL}PIPERAZIN-1-KARBONIL]FENIL]-6-(DIETILAMINO)-N,N-DIETILKSANTEN-3-IMINIJEVEGA KLOORIDA (25).....	38
4.30	POSKUS SINTEZE 9-{2-[4-({1-[2-(2-{N-[(1-BENZILPIPERIDIN-3-IL)METIL]NAFTALEN-2-SULFONAMIDO)ETOKSI]ETIL}-1,2,3-TRIAZOL-4-IL]METIL}PIPERAZIN-1-KARBONIL]FENIL}-6-(DIETILAMINO)-N,N-DIETILKSANTEN-3-IMINIJEVEGA KLOORIDA (26)	39
5	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	39
5.1	PREGLED SINTEZE FLUORESCENČNO OZNAČENEGA ZAVIRALCA BChE	39
5.2	PRIPENJANJE PIPERAZINSKEGA DERIVATA NA FLUOROFOR.....	46
5.3	PRIPENJANJE DISTANČNIKA NA SULFONAMID 4	48
5.4	OVREDNOTENJE FLUORESCENČNO OZNAČENEGA ZAVIRALCA 24	50
6	SKLEP.....	52
7	VIRI.....	53

KAZALO SLIK

SLIKA 1: PRIMERJAVA ZDRAVIH MOŽGANOV IN MOŽGANOV PRI AB (A) TER PRIKAZ ŠIRJENJA POŠKODB MOŽGANOV Z NAPREDOVANJEM AB (B).....	2
SLIKA 2: PRIMERI PROB ZA DOLOČANJE AB S PET.	3
SLIKA 3: PRIMERJAVA ZDRAVEGA MOŽGANSKEGA TKIVA IN MOŽGANSKEGA TKIVA Z MOŽGANSKIMI LEZIAMI PRI AB (A) TER AMILOIDNI PLAKI IN NEVROFIBRILARNE PENTLJE VIDNE POD MIKROSKOPOM (B).....	4
SLIKA 4: STRUKTURNI PRIKAZ UČINKOVIN, KI SE UPORABLJAJO PRI ZDRAVLJENJU AB.....	6
SLIKA 5: TEMELJNE REAKCIJE OZNAČEVANJA CHE PO KOELLE-JU.	10
SLIKA 6: STRUKTURNI PRIKAZ ZADETKA VIRUTALNEGA REŠETANJA (SPOJINA 1) IN OPTIMIZIRANA MOLEKULA ZAVIRALCA BChE (SPOJINA 2)..	11
SLIKA 7: SHEMATSKA PRIMERA NEKATALIZIRANE (A) IN KATALIZIRANE (B) HUISGENOVE 1,3-DIPOLARNE CIKLOADICIJE S TIPIČNIMI REAKCIJSKIMI POGOJI.	12
SLIKA 8: PRIMER HUISGENOVE 1,3-DIPOLARNACIKLOADICIJE, KJER NI POTREBNA KAZALIZA Z BAKROVIMI(I) IONI IN BAZO.....	13
SLIKA 9: PRIMERA REAKCIJ, KI PRAV TAKO SODITA POD ‚KLIK‘ KEMIJO; (A)DIELS-ALDER-JEVA REAKCIJA IN (B) STAUDINGER-JEVA LIGACIJA.	13
SLIKA 10: SHEMATSKI PREGLED STRUKTURE DISTANČNIKOV (A) ZA 1. SINTEZNI PRISTOP IN (B) 2. SINTEZNI PRISTOP. (C) ANALOG ZAVIRALCA BChE 4.....	16
SLIKA 11: REAKCIJSKA SHEMA PRVEGA SINTEZNEGA PRISTOPA.....	41
SLIKA 12: REAKCIJSKA SHEMA SINTEZE DALJŠEGA DISTANČNIKA IN NJEGOVO PRIPENJANJE NA SPOJINO 4	42
SLIKA 13: REAKCIJSKA SHEMA SINTEZE ZA ‚KLIK‘ PRIREJENIH FLUOROFOROV	44
SLIKA 14: REAKCIJSKA SHEMA SINTEZE KRAJŠEGA DISTANČNIKA IN NJEGOVO PRIPENJANJE NA SPOJINO 4.	45
SLIKA 15: MEHANIZEM NASTANKA IMINJEVEGA INTERMEDIATA IN REAKCIJA LE-TEGA S KARBOKSILNO KISLINO.	46
SLIKA 16: ODPRTA IN SPIROLAKTONSKA OBLIKA PRIMARNEGA AMIDA RODAMINA B (A) TER SEKUNDARNI AMID RODAMINA B, KI NE MORE TVORITI SPIROLAKTONA IN PRI VSEH FIZIOLOŠKO RELAVANTNIH PH VREDNOSTIH FLUORESCIRA (B).	48

POVZETEK

S staranjem prebivalstva se povečuje pogostnost za starostnike značilnih obolenj, kamor sodi tudi Alzheimerjeva bolezen, ki je napredujoča nevrodegenerativna bolezen in najpogostejši vzrok demence. Kognitivni propad bolnika kot posledica bolezni je za svoje in skrbnike fizično in psihično izčrpavajoč, zaradi česar je pogosto potrebna premestitev bolnika v oskrbo domov za starostnike. Zaradi neozdravljivosti in velikega socialno-ekonomskega bremena bolezni je iskanje novih učinkovin in diagnostičnih orodij v porastu. Holinergična hipoteza je prvi poskus razlage patogeneze Alzheimerjeve bolezni po kateri holinergična disfunkcija povzroča propad kognitivnih sposobnosti bolnika. Na osnovi te hipoteze so razvili zaviralce acetilholin-esteraze. Potencialna nova tarča za zdravljenje Alzheimerjeve bolezni je soroden encim butirilholin-esteraza, katerega aktivnost se z napredovanjem bolezni nasprotno kot pri acetilholin-esterazi poveča. Butirilholin-esteraza naj bi tako v možganih bolnikov prevzela glavno vlogo hidrolize acetilholina, vključena pa naj bi bila tudi v nastajanje za Alzheimerjevo bolezen značilnih amiloidnih plakov.

Za potrebe razvoja nove, enostavne in neposredne metode za določanje aktivnosti butirilholin-esteraze na možganskih rezinah smo poskušali razviti selektiven fluorescenčno označen zaviralec omenjenega encima. Izhajali smo iz optimiziranega zaviralca **2**, ki so ga razvili raziskovalci na Fakulteti za farmacijo, ga kemijsko modificirali in nanj s pristopi 'klik' kemije pripenjali rodamin B in NBD-Cl. Mesto uvajanja fluorofora smo izbrali glede na kristalno strukturo kompleksa butirilholin-esteraze z zaviralcem **2** ter dobro opisano povezavo med strukturo in aktivnostjo njegovih analogov. Fluorofore smo pripenjali prek hidrofilnega distančnika, da bi se izognili težavam nespecifične vezave zaviralca na lipofilno možgansko rezino. Zaradi težav povezanih s sintetiziranjem zaviralca označenega z rodaminom B, nam je uspelo sintetizirati samo z NBD označen zaviralec **24**, kateremu smo določili *in vitro* sposobnost zaviranja obeh holin-esteraz. Spojina **24** je selektiven zaviralec butirilholin-esteraze s srednjo zaviralno koncentracijo 214,16 nM. Uvedba fluoroforma na zaviralec močno zmanjša aktivnost v primerjavi s spojino **2**, zaradi česar spojina **24** ni bila ustrezna za barvanje možganskih rezin.

Ključne besede: Alzheimerjeva bolezen, zaviralec butirilholin-esteraze, 'klik' kemija

ABSTRACT

Frequency of geriatric diseases is increasing due to population ageing. One of the most common cause of dementia is Alzheimer's disease, which is a progressive neurodegenerative disease. Cognitive deterioration as a consequence of Alzheimer's disease is physically and mentally exhausting for caretakers and it often results in institutionalisation of the patient. Lack of cure and great socioeconomic burden of the disease make research of new medicine and diagnostic tools very important. The cholinergic hypothesis is the first attempt of explaining the pathogenesis of Alzheimer's disease, according to which cholinergic dysfunction causes decline in patients cognitive ability. The hypothesis led to the discovery of cholinesterase inhibitors. A new promising drug target is butyrylcholinesterase as its activity increases in later stages of Alzheimer's disease. On the contrary, activity of acetylcholinesterase decreases. Therefore, it is supposed that butyrylcholinesterase takes over the cholinesterase activity in advanced stages of the disease. Also, butyrylcholinesterase is thought to be involved in formation of amyloid plaques, which are a pathophysiological hallmark of Alzheimer's disease.

For the development of a simple and direct method for detecting butyrylcholinesterase on brain slices we tried to develop a selective fluorescently labeled butyrylcholinesterase inhibitor. Our attempt was based on the structure of an inhibitor **2** that was developed by researchers at the Faculty of Pharmacy. Firstly, we chemically modified its structure to allow introduction of derivatives of rhodamine B and NBD fluorophores by means of click chemistry. The introduction site of fluorophores was chosen on the basis of the crystal structure of the inhibitor **2** in complex with butyrylcholinesterase and well described structure-activity relationships. Fluorophores were attached by a hydrophilic linker in order to minimize nonspecific binding of the inhibitor to the lipophilic brain slice. Because the synthesis of inhibitor labeled with rhodamine B turned out to be troublesome, we managed to synthesise only an inhibitor **24** labeled with NBD. *In vitro* inhibitory potency of compound **24** against both cholinesterases was determined; compound is selective towards butyrylcholinesterase with half maximal inhibitory concentration of 214.16 nM. Attachment of the fluorophore caused a significant loss of binding capacity to the enzyme when compared to inhibitor **2** and as a consequence compound **24** was not appropriate for detection of butyrylcholinesterase on brain slices.

Key words: Alzheimer's disease, butyrylcholinesterase inhibitor, click chemistry

SEZNAM OKRAJŠAV

AB	Alzheimerjeva bolezen
Aβ	amiloid beta
ACN	acetonitril
ACh	acetilholin ("acetylcholine")
AChE	acetilholin-esteraza ("acetylcholinesterase")
APP	amiloidni prekuzorski protein
BChE	butirilholin-esteraza ("butyrylcholinesterase")
bs	širok singlet ("broad singlet")
ChAT	holin acetiltransferaza ("choline acetyltransferase")
ChE	holin-esteraza
ChEI	zaviralec holin-esteraz ("cholinesterase inhibitor")
d	dublet
dd	dublet dubleta
DCM	diklorometan
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
ESI	razpršilna ionizacija ("electrospray ionisation")
EtOAc	etilacetat
EtOH	etanol
Et₃N	trietilamin
Hex	heksan
IC₅₀	srednja zaviralna koncentracija ("half maximal inhibitory concentration")
<i>J</i>	sklopitvena konstanta
m	multiplet
M_r	relativna molekulska masa
MeOH	metanol
MF	mobilna faza
MS	masna spektrometrija
MsCl	metansulfonil klorid
MTBE	metil <i>terc</i> -butil eter
NBD-Cl	4-kloro-7-nitrobenzoksadiazol
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartat

NMM	<i>N</i> -metilmorfolin
NMR	jedrska magnetna resonanca
PET	pozitronska emisijska topografija
q	kvartet
R_f	retencijski faktor
s	singlet
t	triplet
td	triplet dubleta
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoplastna tekočinska kromatografija ("thin-layer chromatography")
TMS	tetrametilsilan
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija ("World Health Organization")

1 UVOD

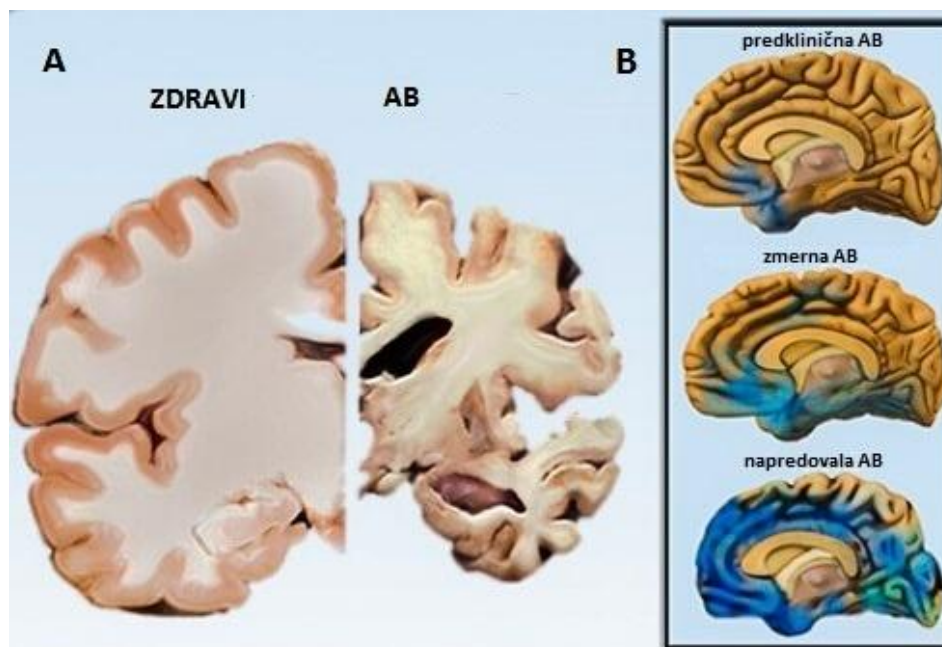
1.1 Alzheimerjeva bolezen

Demenca je sindrom mnogih bolezenskih stanj, pri katerih so motene kognitivne funkcije posameznika. Motnjam v spominu, razmišljanju, orientaciji, učenju in jeziku so pogosto pridružene spremembe vedenja, čustvenega odziva in motivacije. Po ocenah WHO se je leta 2016 z demenco spopadalo 47,5 milijonov ljudi, pri čemer je vsako leto okoli 7,7 milijona primerov več (1). Zaradi staranja prebivalstva pričakujejo, da se bo pogostost demence do leta 2030 podvojila in potrojila do leta 2050 (2). Napovedi vzbujajo skrb, saj zdravstveni sistemi niso pripravljeni na breme, kakršnega napovedujejo ocene. Ocenjeni stroški povezani z demenco znašajo na svetovni letni ravni 555 milijard evrov, kar kaže na velik socialno-ekonomski vpliv bolezni (2). Najpogostejši vzrok demence v razvitem svetu je Alzheimerjeva bolezen (AB) (3,4). AB je napredujoča nevrodegenerativna motnja, ki se kaže kot upad kognitivnih sposobnosti in spomina. Bolezni so v napredovalih stadijih pogosto pridruženi vznemirjenost, agresija, depresija, tavanje in drugi simptomi, ki imajo negativen vpliv na kvaliteto življenja bolnika in njegovih bližnjih. Zaradi napredujočega upada kognitivnih funkcij na vseh področjih, postanejo bolniki v napredovalih stadijih bolezni nezmožni opravljati tudi najosnovnejše naloge. Skrbniki bolnikov, ki so najpogosteje svojci, se s propadom bolnika težko spopadajo, zato je pogosto potrebna institucionalizacija bolnika (4).

Eden najpomembnejših dejavnikov tveganja AB je starost posameznika. Pri večini bolnikov se bolezen razvije po 65. letu starosti. Študije kažejo na podvojitve pogostosti bolezni na vsakih šest dodatnih let življenja, pri čemer je tveganje za razvoj bolezni nad 85. letom starosti kar 50-odstotno (2). Raziskovalci so določili tudi veliko genetskih dejavnikov, ki so povezani s povečanim tveganjem za razvoj AB. Ti geni so povezani z imunskim in vnetnim odzivom, metabolizmom holesterola in maščob ter tvorbo endosomalnih veziklov (3). Največje tveganje predstavljajo mutacije na genih za APP ter presenilin-1 in presenilin-2, ki povzročajo družinsko obliko AB (2,3). Dejavniki tveganja iz okolja so kajenje, sladkorna bolezen, debelost, dislipidemija, hipertenzija, poškodba glave in bolezni ožilja. Tveganje za nastanek bolezni je manjše pri posameznikih z višjo stopnjo izobrazbe in pri mediteranski dieti (2).

Patofiziologija AB je povezana s poškodbo in umiranjem živčnih celic, ki izhajajo iz hipokampusa, predela možganov, ki je vključen v procese spomina in učenja. Poškodbe

živčnih celic se z nadaljevanjem bolezni razširijo po celotnih možganih (2,4). Pri AB opazimo nastanek možganskih lezij in so posledica agregiranja proteinov v možganskem tkivu. Te povzročajo okvare in smrt živčnih celic, a mehanizem teh poškodb ni znan. Pri AB poznamo dve vrsti možganskih lezij: zunajcelične amiloidne plake in znotrajcelične neurofibrilarne pentlje (5).

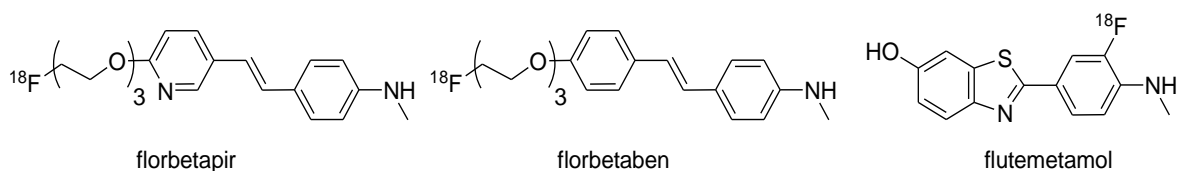


Slika 1: Primerjava zdravih možganov in možganov pri AB (A) in prikaz širjenja poškodb možganov z napredovanjem AB (B). Privzeto in prirejeno po (6).

Za diagnosticiranje AB se uporabljajo standardizirani nevropsihiatrični testi kognitivne funkcije, s čimer se določa intelektualna prizadetost posameznika (2,5). Klinično diagnozo AB določajo demenca, ki so jo ugotovili z nevropsihiatričnim testom, prizadetost najmanj dveh kognitivnih področij (motnje jezikovne dejavnosti, gibanja, prepoznavanja predmetov...), napredujoča izguba spomina in pričetek bolezni med 40. in 90. letom starosti. Zavest pri bolnikih ni motena. Pri diagnosticiranju je še potrebno izključiti druge bolezni, kot so frontotemporalna demenca, vaskularna demenca, demenca z Lewyjevimimi telesci in druge, ki povzročajo napredujočo izgubo spomina in kognitivnih sposobnosti. Kljub vsem kriterijem klinične diagnoze je dokončna potrditev bolezni mogoča le s histopatološkim pregledom možganskega tkiva (5). Za potrditev bolezni je nujna sočasna prisotnost obeh vrst možganskih lezij v možganski skorji bolnikov ter hudo zmanjšanje števila živčnih celic in sinaps, predvsem holinergičnih (5,7). Ker omenjene možganske lezije niso specifične zgolj za AB in so v manjši meri prisotne tudi pri

nekaterih nebolelih posameznikov, je za diagnozo bolezni nujna tudi kvantifikacija možganskih lezij (5).

Zaradi številnih patoloških karakteristik AB se je razvilo tudi veliko število različnih pristopov zgodnjega odkrivanja bolezni. S pomočjo visokoločljivostne magnetne resonance lahko opazujemo atrofijo možganskih struktur. Z radioaktivnimi kontrastnimi sredstvi v povezavi s pozitronsko emisijsko tomografijo (PET) lahko opazujemo tudi patološke strukture bolezni, kot so amiloidni plaki, razvijajo pa se tudi kontrastna sredstva, ki bi omogočala slikanje neurofibrilarnih pentelj (7,8). S kontrastnimi sredstvi usmerjenimi proti komponentam holineričnega sistema, se določa tudi holinerična disfunkcija (9). Aplikacija teh tehnologij je možna pri raziskovanju patofizioloških procesov, nadzoru bolezni, določanju odziva na zdravljenje ter tudi diagnosticiranju. Glavna omejitev tovrstnih tehnologij je njihova cena, vendar lahko upamo na pocenitev, saj je zaradi velikega potenciala uporaba tovrstnih tehnologij čedalje bolj pogosta (7).



Slika 2: Primeri prob za določanje A β s PET. Privzeto in prirejeno po (10).

1.2 Hipoteze nastanka Alzheimerjeve bolezni

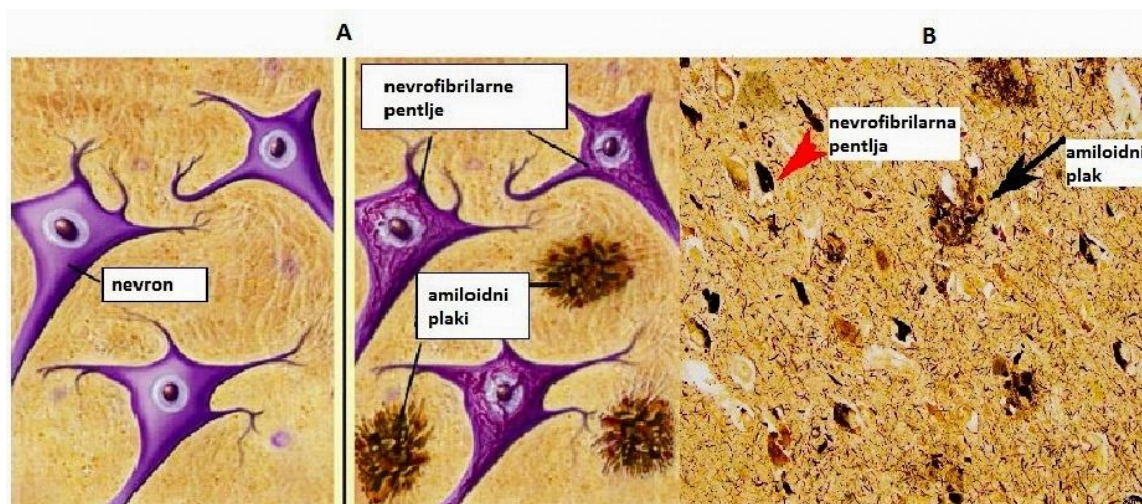
1.2.1 Holinerična hipoteza

Pri AB so v možganih bolnikov najbolj prizadeti holinerični nevroni, kar se skupaj z zmanjšanimi koncentracijami acetilholina (ACh) odraža v za bolezen karakteristični holinerični disfunkciji (3,4,11). V 70. letih prejšnjega stoletja so s sistematičnimi biokemijskimi raziskavami bolnikov poskušali določiti nevrokemijske spremembe povezane z AB. Odkrili so zmanjšano koncentracijo holin acetiltransferaze (ChAT), encima, ki je odgovoren za sintezo ACh. Kasneje so odkrili tudi zmanjšan privzem in izločanje ACh ter izgubo holineričnih povezav iz bazalnega Meynertovega jedra v možgansko skorjo (4). Na podlagi holineričnega primanjkljaja v možganih bolnikov se je oblikovala holinerična hipoteza AB, po kateri je poškodba holineričnih živčnih celic in s tem povezana izguba holineričnega prenosa vzrok izgubljanja spomina in kognitivne funkcije (4). Holinerična disfunkcija naj bi prek delovanja na holicaptivne nevrone povzročala tudi disfunkcijo drugih neurotransmiterskih sistemov kot sta glutamatergični in

serotonergični sistem (4). Na podlagi holinergične hipoteze zdravimo AB z zaviralci holin-esteraz, ki dvigujejo raven ACh v možganih in tako izboljšujejo simptomatiko bolezni (2,12,13).

1.2.2 Hipoteza proteinopatij

Najbolj uveljavljen model nastanka AB je amiloidna hipoteza. Temelji na nastanku amiloidnih plakov, katerih glavna sestavina je amiloid beta ($A\beta$). $A\beta$ je kratek peptid, ki je stranski produkt cepitve transmembranskega proteina, amiloidnega prekursorskega proteina (APP). Cepitev APP lahko poteče na dveh različnih mestih, pri čemer lahko nastane topni amiloidni prekursorski protein α , ki ne povzroča tvorbe amiloidnih plakov, ali $A\beta$ (14). Monomerne oblike $A\beta$ so topne v vodi, a se pri višjih koncentracijah te povezujejo v oligomerne agregate, ki se nadalje povezujejo v amiloidne fibrile. Amiloidni fibrili se kopičijo zunaj živčnih celic v skupkih, ki jih imenujemo amiloidni plaki, ali v stenah malih žil, kjer povzročajo angiopatije (2). Amiloidni plaki povzročajo okvaro živčnih celic in posledično klinično sliko AB, vendar mehanizem okvare živčnih celic ni znan (14). Vse več pozornosti se posveča tudi topnim oligomerom proteina $A\beta$, ki izkazujejo nevrotoksične lastnosti (14). Amiloidno hipotezo potrjujejo genetske napake, ki vodijo v nastanek družinske oblike AB. Ta se razvije pri mlajši starosti, med 40. in 50. letom starosti in izkazuje isto klinično sliko kot sporadična oblika AB. Povzročajo jo mutacije v genih za APP, presenilin-1 in presenilin-2, ki povzročajo povečano nastajanje $A\beta$ (3,14).



Slika 3: Primerjava zdravega možganskega tkiva in možganskega tkiva z možganskimi lezijami pri AB (A) ter amiloidni plaki in nevrofibrilarne pentlje vidne pod mikroskopom. (B). Privzeto in prirejeno po (15,16).

Pri AB opazimo tudi agregacijo proteina tau v obliki neurofibrilarnih pentelj. Vloga proteina tau je stabilizacija mikrotubulov citoskeleta in njegovo delovanje je regulirano prek fosforilacije. Pri AB pride do povečane fosforilacije proteina tau, kar povzroči njegovo disociacijo od mikrotubulov. S tem se poveča koncentracija prostega hiperfosforiliranega tau, ki posledično agregira znotraj živčnih celic (14). Opisane tvorbe vodijo v poškodbe živčnih celic in njihovo smrt, kar se odraža v propadu kognitivnih sposobnosti posameznika (4).

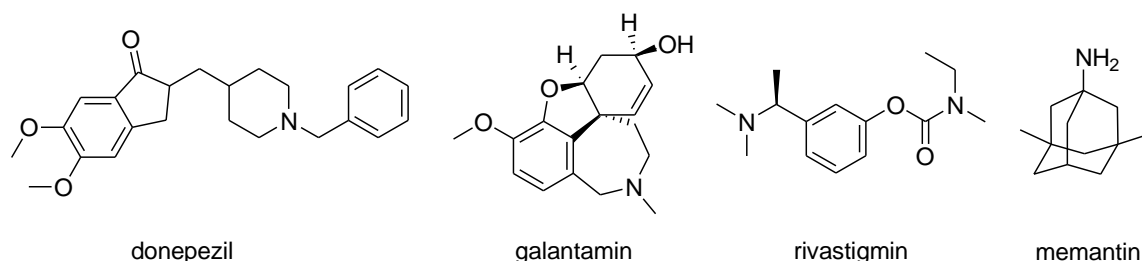
Kljub velikim naporom raziskovalcev ostaja vzrok nastanka amiloidnih plakov in neurofibrilarnih vozlov neznan. Prav tako ni jasno, ali so amiloidni plaki ali neurofibrilarne pentlje poglaviti vzrok nastanka bolezni. Nekatera opažanja namreč ne dajejo zanesljivih zaključkov, da je ena patofiziološka sprememba vzrok za drugo. Pri več mišjih modelih s povečanim nastajanjem A β namreč ni opaziti signifikantne izgube živčnih celic ali nastajanja neurofibrilarnih pentelj (14). Tudi v malih možganih človeka, kljub obsežnemu odlaganju amiloidnih plakov, ni opazne izgube živčnih celic ali nastajanja neurofibrilarnih pentelj (14). Agregiranje proteina tau po drugi strani opazimo tudi pri drugih bolezenskih stanjih kot je kronična travmatska encefalopatija (8). V živčevju bolnikov je opaziti tudi vnetje in imunski odziv, a ni znano, ali je to vzrok ali posledica bolezni (2,14). Ker je AB kompleksna bolezen, v katero je vključenih veliko patofizioloških procesov in dejavnikov, ostaja vzrok njenega nastanka do današnjega dne neznan.

1.3 Zdravljenje Alzheimerjeve bolezni

Za zdravljenje AB se uporabljajo učinkovine z delovanjem na sistem živčnih prenašalcev – zaviralci holinesteraz (ChEI) in antagonist NMDA receptorjev, ki pomagajo lajšati simptomatiko bolezni. ChEI zavirajo hidrolizo ACh in tako dvigujejo njegovo raven v sinaptični špranji holinergičnih nevronov, s čimer se izboljša kognitivna sposobnost bolnika. Najpomembnejši terapevtski učinek zdravljenja s ChEI je stabilizacija kognitivne funkcije za eno leto pri približno 50% bolnikov z AB. Pri približno 20% bolnikov je lahko obdobje kognitivne stabilizacije podaljšano do 24 mesecev. Veliko kliničnih študij je tudi pokazalo, da se bolniki, pri katerih zdravljenje z eno vrsto ChEI ni učinkovito, v 50% primerov pozitivno odzovejo na drugo vrsto ChEI (17). V terapiji AB se danes uporabljajo donepezil, rivastigmin in galantamin (13). Takrin, ki je bil prvi registriran ChEI za zdravljenje AB, so zaradi hepatoksičnosti umaknili s trga in se danes uporablja le še v raziskovalne namene. Donepezil in galantamin selektivno zavirata acetilholin-esterazo

(AChE), medtem ko rivastigmin zavira tudi butirilholin-esterazo (BChE). Zaviranje BChE lahko igra pomembno vlogo, saj se koncentracija AChE z napredovanjem AB zmanjša, medtem ko se koncentracija BChE poveča (17,18). Galantamin se veže tudi na nikotinske receptorje, kjer z alosterično modulacijo okrepi učinek ACh in izboljša holinerški prenos (13,19). Učinek ChEI ni nujno omejen zgolj na dvig koncentracije ACh v možganih. ChE namreč tvorijo asociacije z agregati A β , zaradi česar raziskovalci sklepajo na njihovo vpletenost v razvoj amiloidnih plakov (20). Učinek ChEI na tem področju sicer ni dokazan ali razjasnjen, vendar so ugotovili, da posamezniki s kasnejšim pričetkom zdravljenja ne dosežejo iste stopnje izboljšanja kot tisti, ki so z zdravljenjem začeli prej (13).

Glutamat je glavni ekscitatorni živčni prenašalec v osrednjem živčevju. Prekomerna glutamatergična stimulacija vodi v poškodbo živčnih celic prek prevelike obremenitve celice s kalcijevimi ioni. Ekscitotoksični učinek glutamata lahko zmanjšamo z zaviranjem receptorjev, na katere se veže glutamat. Memantin je nekompetitvni antagonist NMDA receptorjev in se uporablja za zdravljenje bolnikov z zmerno do hudo AB. Uporablja se lahko samostojno ali v kombinaciji z ChEI (21).



Slika 4: Strukturni prikaz učinkovin, ki se uporabljajo pri zdravljenju AB. Donepezil, galantamin in rivastigmin so ChEI, memantin je antagonist NMDA receptorjev.

Največji problem zdravljenja AB je neozdravljivost bolezni. Ker te učinkovine ne delujejo na sam vzrok bolezni, je zdravljenje učinkovito le določen čas, medtem pa se AB razvija naprej do popolnega propada kognitivne sposobnosti bolnika (2,3).

1.4 Holin-esteraze (ChE)

ACh je živčni prenašalec v osrednjem in perifernem živčevju, kjer je vključen v številne fiziološke procese, kot so delovanje skeletnih in gladkih mišic, delovanje notranjih organov, kognitivni procesi in drugi. Reakcijo sinteze med holinom in acetil-CoA katalizira encim holin-acetiltransferaza (ChAT). ACh se nato shrani v vezikle s pomočjo vezikularnega acetilholinskega transporterja, kjer je ACh zaščiten pred encimsko razgradnjo. Ob akcijskem potencialu se vezikli združijo z membrano in ACh se sprosti v

sinaptično špranjo, kjer učinek posreduje prek vezave na muskarinske in nikotinske receptorje. Muskarinski in nikotinski receptorji obstajajo v različnih podvrstah, ki se med seboj razlikujejo po učinku, prostorski porazdelitvi in mehanizmu delovanja. Učinek ACh s cepitvijo estrske vezi izniči holin-esteraze (ChE), pri čemer nastaneta acetat in holin. Nastali holin se ponovno privzame v presinaptični nevron, kjer se ponovno uporabi pri sintezi ACh (22).

Poznamo dve ChE: AChE in BChE. Oba encima sta pripadnika iste družine α/β hidrolaz, kamor sodijo tudi proteaze, lipaze, peroksidaze in drugi. Skupna značilnost encimov te družine je terciarna struktura β -ravnin, ki jih povezujejo α -vijačnice, ter hidrolazna aktivnost, ki izhaja iz katalitične triade. Katalitično triado v aktivnem mestu AChE in BChE sestavljajo aminokislinski ostanki serina, histidina in glutamata in je ključna za njuno encimsko aktivnost (23,24). Hidroliza estrske vezi poteka prek nukleofilnega napada hidroksilne skupine serina, pri čemer nastaneta aciliran encim in prost holin. Aciliran encim se vrne v prvotno obliko prek nukleofilnega napada molekule vode, pri čemer sodelujeta aminokislinska ostanka glutamata in histidina. Sprosti se očetna kislina (25).

1.4.1 Acetilholin-esteraza (AChE)

AChE je najpomembnejši encim pri regulaciji holineričnega prenosa v živčnem sistemu. Nahaja se v motoričnih ploščicah ter v sinapsah holineričnih nevronov, kjer s hidrolizo ACh prekinja njegovo delovanje. Aktivno mesto encima se nahaja znotraj približno 20 Å globoke jamice. Katalitična triada, ki je temelj aktivnega mesta, se nahaja na dnu te jamice. To obkroža 14 aromatskih aminokislinskih stranskih verig, ki tvorijo holinski vezavni žep, acilni žep in periferno anionsko mesto. Acilni žep tvorita dva fenilalanina, s čimer je omejena velikost substrata, ki lahko dostopa do aktivnega mesta (25). Aminokislinski ostanki, ki niso vključeni v vezavne žepe, naj bi prek π -kationskih interakcij pomagali pri usmerjanju in prehajanju pozitivno nabitih substratov v bližino aktivnega mesta. Na robu jamice se nahaja tudi periferno anionsko mesto, kamor se lahko vežejo ACh in drugi substrati, ki delujejo kot nekompetitivni zaviralci encima (25). Periferno anionsko mesto je povezano s substratno inhibicijo AChE pri visokih substratnih koncentracijah. Z vezavo ACh na periferno anionsko mesto, ko je v aktivnem mestu že vezana druga molekula ACh, se namreč omeji dostop vode, ki je potrebna za deacetilacijo encima (25,26).

1.4.2 Butirilholin-esteraza (BChE)

Obstoj BChE so dokazali leta 1932 na možganskem izolatu, ki je kataliziral hidrolizo holinskih estrov. Ker je bil omenjen izolat sposoben katalizirati hidrolizo tudi neholinskih estrov, so sklepali na prisotnost dveh različnih encimov. En encim je bil specifičen za razgradnjo ACh, medtem ko je bil drug encim sposoben katalizirati tudi različne holinske in neholinske estre. Zato so prvi encim poimenovali specifična holinesteraza (AChE) in drugega nespecifična holinesteraza (BChE) (23).

BChE je strukturno precej podobna AChE, a se encima tudi izrazito razlikujeta v strukturi in kinetiki. Katalitično triado tudi pri BChE sestavljajo stranske verige serina, histidina in glutamata. Nahaja se na dnu jamice z globino 20 Å, ki jo obkroža 6 aromatskih aminokislinskih stranskih verig. V aktivnem mestu encima najdemo kot pri AChE tudi holinsko vezavno mesto in acilni žep. Acilni žep BChE obkrožajo stranske verige levcina in valina, zaradi česar je omenjeni žep bistveno večji kot pri AChE, kjer žep obkrožajo večje stranske verige fenilalanina (23,24,27). Tudi holinsko vezavno mesto je zaradi zamenjave fenilalanina z alaninom pri BChE precej večje. Zaradi razlik v velikosti vezavnih mest je BChE sposobna v vezavno mesto sprejeti večje substratne molekule kot AChE (23,27).

Obe holin-esterazi, AChE in BChE, si delita več kot 50% aminokislinske sekvence, čeprav se genska zapisa za posamezna encima nahajata na različnih kromosomih. Oba encima sta sposobna učinkovite hidrolize ACh, a 80% holinesterazne aktivnosti v zdravih možganih opravi ACh (28). Zato do nedavnega niso pripisovali pomembne vloge BChE pri regulaciji ACh (29). Označili so jo celo kot nespecifičen in nepomemben encim, ki moti raziskave AChE (23). Ker butirilholin ni fiziološki substrat, ampak le sredstvo s katerim se lahko eno holinesterazo loči od druge, tudi funkcija BChE ni povsem jasna. Vendar nova opažanja kažejo na pomembno vlogo, ki jo ima BChE v telesu.

Mnoga leta je bila BChE predmet zanimanja predvsem na področju anestezije. Pri nekaterih bolnikih so ugotovili možnost nastanka podaljšanega in življenjsko ogrožajočega zastajanja dihanja po administraciji mišičnega relaksanta sukcinilholina. Pri teh bolnikih so ugotovili nezmožnost učinkovite eliminacije zdravila, ki se v glavnini metabolizira prek BChE. Zato so pri bolnikih, ki so doživeli podaljšano apnejo po administraciji zdravila, sklepali na obstoj neobičajne oblike BChE z zmanjšano katalitično aktivnostjo (23,27).

Novejše ugotovitve so pokazale na vključenost BChE v različne fiziološke in patofiziološke procese. Karakterizacija mišk z izbitim genom za AChE je pokazala na

vlogo BChE pri hidrolizi ACh. Miške brez aktivne AChE so sicer posebej občutljive na toksične učinke specifičnih zaviralcev BChE, a brez težav preživijo do odrasle starosti. BChE je torej sposobna kompenzirati popolno pomanjkanje AChE (29). Holinesterazi se razlikujeta tudi v kinetiki delovanja. AChE je pri višjih koncentracijah ACh substratno inhibirana. Na drugi strani je BChE pri nizkih koncentracijah manj učinkovita in najbolj učinkovita pri substratnih koncentracijah, pri katerih je delovanje AChE zavrto. Zato naj bi BChE s hidrolizo presežnega ACh igrala vlogo pri regulaciji holinergičnega prenosa, kar podpira tudi dejstvo neposredne bližine BChE iz glialnih celic in AChE iz sinaptične špranje (29).

V raziskavi na mišjem modelu AB, so pokazali vpliv BChE na nastanek amiloidnih plakov, ki so najbolj značilna patofiziološka karakteristika AB. S križanjem so ustvarili miši s pospešenim nastajanjem A β in so brez gena za BChE. Ugotovili so, da je pri miših brez BChE nastajanje amiloidnih plakov manjše v primerjavi s kontrolno skupino z genom za BChE (11). Vpliv, ki ga ima BChE na patofiziologijo AB, nakazujejo tudi spremembe v aktivnosti encima v možganih bolnikov.

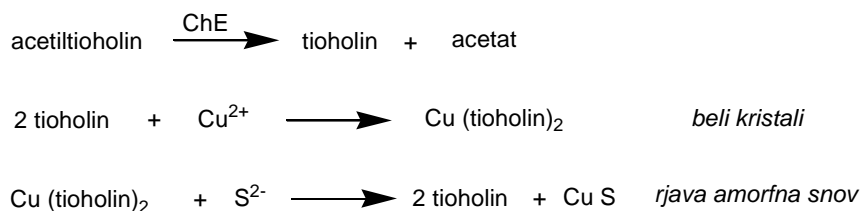
Aktivnost BChE v hipokampusu in temporalnem režnju se pri bolnikih z AB v primerjavi z nebolelimi signifikantno poveča, medtem ko se aktivnost AChE zmanjša ali ostane nespremenjena. Encimska aktivnost BChE v hipokampusu je tudi v pozitivni korelaciji s starostjo posameznika, medtem ko se aktivnost AChE s starostjo ne spreminja. Pri demenci po možganski kapi, shizofreniji in depresiji ni signifikantne razlike v aktivnosti holinesteraz (18). Mehanizem, prek katerega BChE vpliva na razvoj AB, ostaja neznan, vendar njen vpliv ni zanemarljiv in raziskave usmerjene v BChE odpirajo nove pristope k razumevanju in zdravljenju bolezni.

Sestavni del amiloidnih plakov so poleg agregiranih skupkov A β tudi tesno asociirane ChE, predvsem BChE. Agregati A β naj bi z asociacijo z BChE postajali čedalje bolj kompaktni, s čimer se povečuje tudi njihov patološki učinek na možgansko tkivo. V začetni stopnji razvoja amiloidnih lezij, ko so povezave med agregati še rahle, namreč v njih ni prisotnih ChE. Z nadaljnjim agregiranjem postanejo skoraj vsi agregati A β tesno povezani z BChE, zaradi česar sklepajo, da BChE sodeluje pri transformaciji amiloidnih lezij iz začetne benigne oblike v končno maligno obliko (20). Idejo podpirajo tudi opažanja amiloidnih lezij v možganih nekaterih nebolelih posameznikov. Pri teh posameznikih amiloidni plaki namreč niso asociirani z aktivnostjo BChE (30).

1.5 Označevanje holin-esteraz po Koelle-ju

Za označevanje holin-esterazne aktivnosti v tkivnih pripravkih se danes uporablja več kot pol stoletja stara metoda po Koelle-ju. Temelji na encimski hidrolizi acetiltioholina, ki je tioestrski analog ACh (31–33). Tkivne rezine se inkubirajo v raztopini acetiltioholina in bakrovega (II) glicinata. Inkubacijska raztopina je tudi nasičena s končnim produktom reakcije bakrovim tioholinom. Na mestu holin-esterazne aktivnosti encim cepi acetiltioholin na očetno kislino in tioholin. Slednji z bakrovimi (II) ioni tvori bakrov tioholin, ki zaradi slabe topnosti kristalizira na mestu encimske hidrolize. Zaradi nasičenosti inkubacijskega medija s končnim produktom reakcije je kristalizacija takojšnja in difuzija končnega produkta reakcije zmanjšana ali povsem zavrta (32,33). V naslednji stopnji se beli kristali bakrovega tioholina s pomočjo kratke inkubacije v amonijevem sulfidu pretvorijo v rumenorjave amorfne skupke bakrovega sulfida, katerih barvo lahko ojačamo s kratko inkubacijo v srebrovem nitratu.

Hidrolizo acetiltioholina katalizirata obe ChE, zato se za razlikovanje med posameznima ChE lahko uporabi butiriltioholin, katerega hidroliza je specifična za BChE. Druga možnost razlikovanja je dodatek specifičnih zaviralcev ChE inkubacijskemu pufru: etopropazin kot specifični zaviralec BChE ali BW284C51 kot specifični zaviralec AChE, odvisno od encima, katerega opazujemo (31).

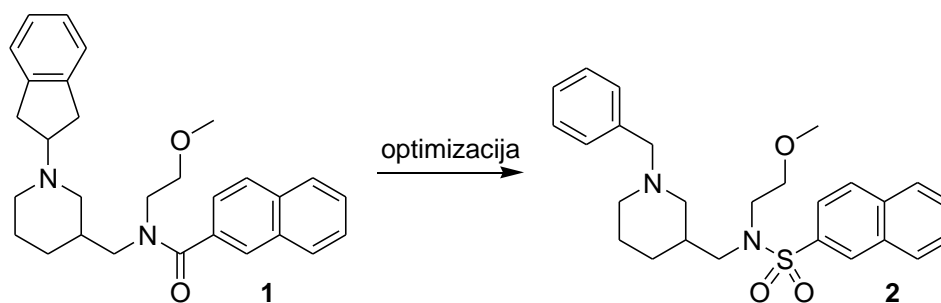


Slika 5: Temeljne reakcije označevanja ChE po Koelle-ju.

Po izvornem postopku barvanja ChE po Koelle-ju celoten postopek vključno s spiranjem in fiksacijo tkiv zahteva precej časa. Po izvornem postopku mora biti tkivo tudi v celoti potopljeno v inkubacijski pufer, kar pomeni tudi veliko porabo inkubacijskega medija. Obstajajo tudi različne modificirane oblike originalne metode, ki se od izvirne razlikujejo v načinu barvanja (npr. sposobnost tioholina za reduciranje $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ v $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, ki z bakrovimi ioni tvori obarvan netopen kompleks) (34), vendar je Koellejeva metoda tudi danes še vedno široko uporabljena.

1.6 Razvoj zaviralca BChE

Zaradi porasta aktivnosti BChE in zmanjšane izražanja AChE v možganskih strukturah bolnikov z napredovalo AB se predpostavlja, da holin-esterazno aktivnost pri napredovali AB prevzame BChE (28,29). Selektivno zaviranje BChE zvišuje raven ACh v možganski skorji podgan in izboljša sposobnost učenja pri ostarelih podganah (29). Zato je BChE postala obetavna tarča za razvoj novih zdravil za zdravljenje AB. Na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani so na podlagi kristalne strukture BChE s filtriranjem pripravili knjižnico spojin, katero so uporabili za molekularno sidranje spojin v vezavno mesto BChE. Odkrili so 40 zadetkov spojin, katerim so nato določili zaviralno aktivnost na BChE. Od 40 je 7 spojin imelo sposobnost zaviranja BChE, od katerih je bila najbolj učinkovita spojina **1** z $IC_{50} = 21,3$ nM. Omenjeni spojini so določili tudi zaviralno sposobnost proti AChE, s čimer so ugotovili veliko selektivnost spojine za BChE. Spojino so sintetizirali tudi sami in jo ločili na posamezna enantiomera. Ugotovili so, da je aktivnost spojine močno odvisna od njenih optičnih lastnosti in da je zaviralna aktivnost (-)-enantiomera več kot 10-krat nižja od eutomera z $IC_{50} = 13$ nM (28).



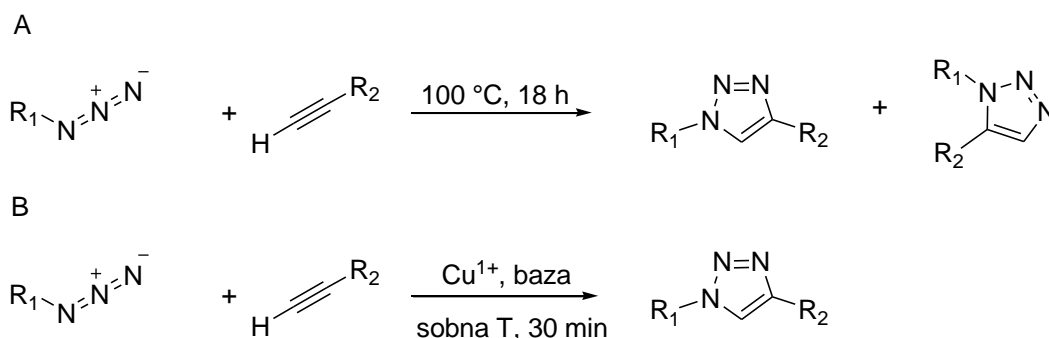
Slika 6: Strukturni prikaz zadetka virtualnega rešetanja (spojina **1**) in optimizirana molekula zaviralca BChE (spojina **2**). Privzeto in prirejeno po (35).

Spojino **1** so nadalje optimizirali, da bi našli spojino z ugodnejšo biološko uporabnostjo, ki je potrebna za učinkovitost spojine *in vivo*. V prvi stopnji so karboksamidno skupino zamenjali s sulfonamidno skupino. Pri načrtovanju zdravilnih učinkovin je to pogost pristop, s katerim poskušamo izboljšati biološko uporabnost in metabolno stabilnost končnih spojin. Preizkusili so tudi zamenjavo naftalenske skupine z različnimi substituiranimi fenilnimi obroči ter zamenjavo indanske strukture z različno substituiranimi benzilnimi obroči. Z odstranitvijo in zamenjavo z drugimi linearnimi alkilnimi substituenti so preverili vpliv na dušik vezane alkilne verige na aktivnost zaviralcev. S sintetiziranjem 1,4-piperidinskih derivatov so preizkusili še vpliv vzorca

disubstitucije na piperidinskem obroču. Vsem sintetiziranim spojinam so *in vitro* določili sposobnost zaviranja BChE in AChE. Od vseh preizkušenih spojin se je spojina **2** izkazala kot najbolj učinkovit zaviralec BChE z $IC_{50} = 5$ nM (35).

1.7 ‚Klik‘kemija

‚Klik‘ kemija je sintezni pristop, pri katerem s praktičnimi in zanesljivimi reakcijami spajamo enostavno dostopne reagente v nove spojine. Odlikujejo jo enostavnost, dobra selektivnost in visoki izkoristki (36). Reakcije ‚klik‘ kemije potekajo pri milih reakcijskih pogojih, pri sobni temperaturi in tudi v vodi. Ker so reakcije selektivne, zaščita funkcionalnih skupin ni potrebna, kar skrajša število sinteznih korakov do končne spojine in omogoča selektiven potek reakcije tudi v kompleksnih kemijskih okoljih (37). Pri reakcijah ‚klik‘ kemije nastane samo en določen reakcijski produkt z visokim izkoristkom, zato sta tudi izolacija in končno čiščenje hitrejša in enostavnejša. Zaradi omenjenih odlik je ‚klik‘ kemija široko uporabna na številnih področjih kemijskih znanosti. Uporablja se na področju odkrivanja novih zdravilnih učinkovin in dostavnih sistemov, pri sintezi biokonjugatov, nanodelcev in polimerov, pri označevanju bioloških tarč v tkivih in celicah ter v diagnostične namene (37–39).

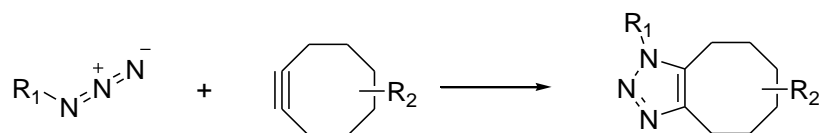


Slika 7: Shematska primera nekatalizirane (A) in katalizirane (B) Huisgenove 1,3-dipolarne cikloadicije s tipičnimi reakcijskimi pogoji.

Prva opisna reakcija ‚klik‘ kemije je modificirana Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija, pri kateri se molekuli azida in alkina spojita, pri čemer se tvori 1,2,3-triazol. Pri nekatalizirani reakciji, ki poteče pri višji temperaturi, nastaneta dva izomera končnega produkta. Leta 2002 so ugotovili, da dodatek bakrovih (I) soli in prisotnost šibke baze (npr. organski amini, zadostuje pa že voda) drastično poveča hitrost in izboljša selektivnost reakcije. Reakcija je kemoselektivna, zaradi česar predhodna uvedba zaščitnih skupin ni potrebna, in regioselektivna, pri čemer nastane samo en reakcijski produkt. Reakcija dobro

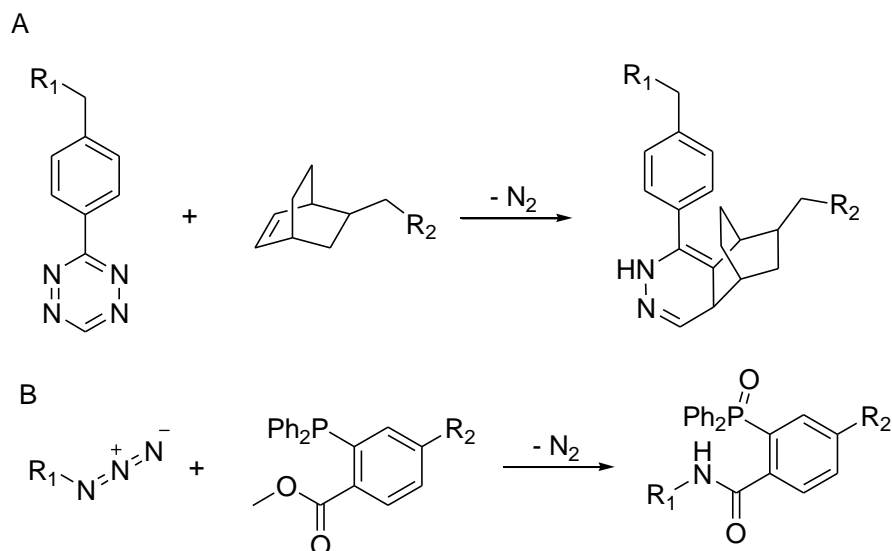
poteka tudi v vodnem okolju, kjer voda deluje tudi kot šibka baza, in je zaradi široke uporabe postala sinonim za ‚klik‘ kemijo (37).

Zaradi toksičnih učinkov bakra na celice je uporabnost zgoraj opisane reakcije pri označevanju bioloških tarč omejena na raziskave *in vitro*. Za potrebe *in vivo* označevanja so raziskovalci razvili modificirano obliko reakcije, kjer kataliza s pomočjo bakra ni potrebna. Alkinska komponenta je v tem primeru vključena v napet oktinski obroč, ki je posledično bolj reaktiven, in omogoča zaobitev potrebe po katalizatorju. Posebno je tovrstna metodologija uporabna pri fluorescenčnem označevanju znotrajceličnih komponent (37). ‚Klik‘ reakcija azida in alkina, ki jo vodi sprostitvev napetega alkenkega obroča, se je izkazala uporabna tudi pri sintezi radiofarmacevtikov, posebej takšnih z radioaktivnimi kovinami. Pri z bakrom katalizirani reakciji je namreč problematična zamenjava radioaktivnega izotopa z neradioaktivnim, ki izhaja iz katalizatorja (40).



Slika 8: Primer Huisgenove 1,3-dipolarnacikloadicije, kjer ni potrebna kataliza z bakrovimi(I) ioni in bazo. Privzeto in prirejeno po (36).

Poznamo tudi druge reakcije, ki jih prištevamo med reakcije ‚klik‘ kemije, vendar zaradi posameznih omejitev ne zadoščajo povsem kriterijem ‚klik‘ kemije. To so ligacije tiolov z maleimidi, aldehydov z amini, izotiocianatov z amini in nukleofilov z epoksidi. Sem sodita tudi Diels-Alder-jeva reakcija in Staudinger-jeva ligacija (40).



Slika 9: Primera reakcij, ki prav tako sodita pod ‚klik‘ kemijo; (A)Diels-Alder-jeva reakcija in (B) Staudinger-jeva ligacija. Privzeto in prirejeno po (40).

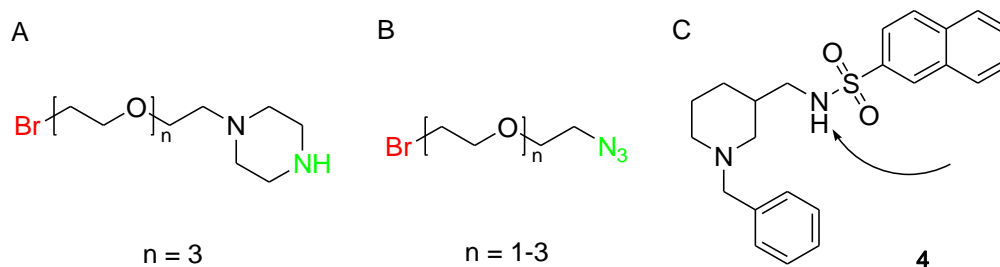
„Klik“ kemija je zaradi zanesljivosti in enostavnosti reakcij postala pomembno orodje iskanja novih spojin vodnic. Omogoča hitro pripravo zajetnih knjižnic analognih spojin in s tem olajša raziskovanje strukturno-aktivnostnih relacij in pospeši optimizacijo spojin vodnic. Ker je uporabna skupaj s pristopi kombinatorne kemije in strukturno podprtega načrtovanja spojin, dopolnjuje in razširja tradicionalne načine iskanja novih aktivnih učinkovin (38). S pristopi „klik“ kemije lahko torej z manjšim številom sinteznih korakov pripravimo knjižnice spojin z veliko raznolikostjo, zato je njena uporaba na področju iskanja novih spojin postala nepogrešljiva. Reakcije „klik“ kemije so uporabne tudi pri neobičajnem načinu iskanja novih aktivnih spojin, kjer biološka tarča sama *in situ* določi svoj najbolj optimalen ligand (41).

Zaradi bioortogonalne narave „klik“ kemije so tovrstne reakcije pomembno orodje tudi za označevanje in detekcijo bioloških tarč v kompleksnih vzorcih, kot so celični ekstrakti ali žive celice. Z označevanjem bioloških tarč se raziskuje lokalizacija biomolekul v časovnem okviru, kar pomaga pri ugotavljanju njihovih funkcij znotraj celic. Z uporabo reakcij „klik“ kemije so raziskovalci uspeli selektivno derivatizirati in označiti proteine, viruse, sladkorje, DNA, RNA in lipide (37,42–44).

2 NAČRT ZA DELO

Histokemijska metoda določanja aktivnosti ChE po Koelle-ju se več kot pol stoletja po njenem razvoju še vedno uporablja v različnih optimiziranih različicah. Izvedba barvanja rezin po izvornem protokolu terja veliko časa in zahteva porabo velike količine inkubacijskega pufra, zaradi česar je lahko določanje holin-esterazne aktivnosti na možganskih rezinah tudi precej stroškovno potratno. V želji po enostavnejši in hitrejši metodi določanja aktivnosti BChE v možganskih rezinah bomo poskušali razviti selektiven in fluorescenčno označen zaviralec BChE. Kot spojino vodnico bomo uporabili spojino **2**, ki je optimiziran zaviralec BChE, ki so ga razvili na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo. Na molekulo spojine **2** bomo preko distančnika poskušali pripeti flurofor, saj bi s tako označenim zaviralcem in fluorescenčnim mikroskopom lahko enostavno in neposredno zaznali BChE na določenem področju možganske rezine.

S pomočjo kristalne strukture kompleksa spojine **2** z BChE so raziskovalci ugotovili način vezave omenjenega zaviralca v vezavno mesto encima. S protoniranim piperidinskim dušikom tvori zaviralec močne kation- π interakcije s stransko verigo tirozina, medtem ko se benzilni obroč prilega v žleb, ki ga tvorijo stranske verige aromatskih aminokislin holinskega vezavnega žepa. Naftalenski obroč zasede acilni-vezavni žep, kjer z aminokislinskim ostankom triptofana tvori π - π interakcije. En sulfonamidni kisik tvori vodikovo vez s kisikovim atomom treonina. Veriga $(\text{CH}_2)_2\text{-O-CH}_3$ je usmerjena proti zunanosti encima, kjer eterni kisik tvori vodikovo vez z molekulo vode, ki je z vodikovo vezjo s stransko verigo asparagina vezana v strukturo encima (35). Opisane interakcije spojine **2** z BChE pričajo o dobro optimizirani strukturi zaviralca, ki pa vseeno dopušča vezavo dodatnega elementa na koncu na sulfonamid vezane verige. Zato smo to mesto izbrali za vezavo distančnika, prek katerega bi na molekulo vezali fluorofor. Zaradi ugodnih fotokemijskih in fizikalno-kemijskih lastnosti smo si izbrali rodamin B. Fluorofor bomo poskušali pripeti na analog zaviralca BChE **4**, in sicer na dva načina: 1) z neposredno vezavo rodamina B na distančnik, katerega bomo nato pripeli na zaviralec **4**, in 2) z vezavo predpripravljenega distančnika na molekulo zaviralca **4**, katerega bomo nato s pomočjo 'klik' kemije spojili z ustrezno modificiranim rodaminom B.



Slika 10: Shematski pregled strukture distančnikov (A) za 1. sintezni pristop in (B) 2. sintezni pristop. Z rdečo barvo je označeno mesto pripenjanja na zaviralec. Z zeleno je označeno mesto pripenjanja na fluorofor. (C) Analog zaviralca BChE **4**. S puščico je označeno mesto pripenjanja distančnikov.

Osnovni skelet distančnika sestavlja kratek polietilenglikol različnih dolžin. Polietilenglikolni distančnik bomo uporabili, ker je zaradi kisikovih atomov precej hidrofilen. Tako bomo poskušali zmanjšati nespecifično vezavo zaviralca na možgansko rezino, ki zaradi celičnih membran in drugih celičnih struktur izkazuje lipofilne lastnosti. Rodamin B bomo na distančnik vezali prek amidne vezi s karboksilno kislino rodamina B, na drugem koncu pa bomo prek bromida distančnik pripenjali na sulfonamidni dušik spojine **4**. Pri drugem pristopu bomo na konceh distančnika uvedli bromidno skupino na eni strani in azidno skupino na drugi strani molekule. Distančnik bomo nato pripeli na sulfonamidni dušik spojine **4** in nastalo spojino prek 'klik' reakcije spojili z rodaminom B, kateremu bomo predhodno pripeli alkin.

Sintetiziranim spojinam bomo določili inhibitorno aktivnost in preizkusili njihovo uporabnost za detekcijo BChE na možganskih rezinah podgan.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Reagenti in topila

Pri magistrski nalogi smo uporabili kemikalije in topila proizvajalcev Acros Organics (Belgija), Merck (Nemčija), Fluka (Švica) in Sigma-Aldrich (ZDA). Brezvodni THF smo pripravili neposredno pred uporabo z destilacijo v argonovi atmosferi.

3.2 Metode

Mešanje in segrevanje reakcijske zmesi

Pri izvedbi reakcij smo reakcijske zmesi mešali in, kjer je bilo potrebno, segrevali z magnetnim mešalnikom – grelnikom IKA Labortechnik RCT basic in teflonskim magnetom.

Odstranjevanje topil pri znižanem tlaku

Topila smo odstranjevali z rotavaporjem Rotavapor R-124 proizvajalca Büchi, pri čemer smo podtlak ustvarili z vodno črpalko. Temperatura vodne kopeli je bila nastavljena na 40°C. Topila z višjo temperaturo vrelišča smo odstranjevali z rotavaporjem Rotavapor R-205 opremljenim z regulatorjem tlaka Vacuum Controller V-850 in membransko črpalko Büchi Vac V-500 proizvajalca Büchi. Podtlak smo nastavili po potrebi, glede na topilo, ki smo ga odstranjevali. Temperatura vodne kopeli je bila nastavljena na 40°C.

Risanje in poimenovanje spojin

Za potrebe risanja spojin in njihovega poimenovanja smo uporabili računalniški program ChemBioDraw Ultra 12.0 (CambridgeSoftCoorporation).

Tankoplastna tekočinska kromatografija (TLC)

Uporabili smo plošče TLC Silica gel 60 F₂₅₄ proizvajalca Merck. Silikagel z dodanim fluorescenčnim indikatorjem v debelini 0,20 mm je nanosen na aluminijast nosilec. Uporabili smo različne mobilne faze, ki so navedene pri sintezah posameznih spojin. Spojine smo detektirali pod UV-žarnico Lamag UV-Cabinet pri valovnih dolžinah 254 nm in 366 nm, in z raztopino vizualizacijskega reagenta ninhidrina.

Preparativna tankoplastna tekočinska kromatografija

Uporabili smo plošče PLC Silica gel 60 F₂₅₄ proizvajalca Sigma Aldrich. Silikagel brez dodanega fluorescenčnega indikatorja v debelini 1,0 mm je nanosen na stekleno podlago. Za razvijanje smo uporabili mobilno fazo DCM/MeOH = 9/1. Ploščo smo

posušili in nato liso produkta spraskali s plošče. Produkt smo nato ekstrahirali v DCM, silikagel pa smo odstranili s filtracijo skozi filtrirni papir.

Kolonska kromatografija

Čiščenje spojin smo izvajali v steklenih kolonah različnih dimenzij. Kot stacionarno fazo smo uporabili Silica gel 60 s premerom delcev 0,040-0,063 mm proizvajalca Merck. Kot mobilno fazo smo uporabili različne mešanice topil, ki so v volumskih deležih navedene pri sintezah posameznih spojin.

Jedrska magnetna resonanca (NMR)

¹H-spektri so bili posneti na spektrometru Bruker AVANCE III na Fakulteti za farmacijo. Meritve posameznih spojin so bile posnete v devteriranem topilu, ki je navedeno pri rezultatih posameznih spojin. Nekaterih produktov vmesnih stopenj zaradi težavnega čiščenja ali reaktivnosti nismo analizirali in smo jih uporabili direktno v naslednji sintezni stopnji. Spektre smo računalniško obdelali s programom MestRec 4.7 podjetja Mestrelab Research. Kemijski premiki so podani v ppm glede na tetrametilsilan (TMS). Sklopitvene konstante (*J*) so podane v Hertzih (Hz).

Masna spektrometrija (MS)

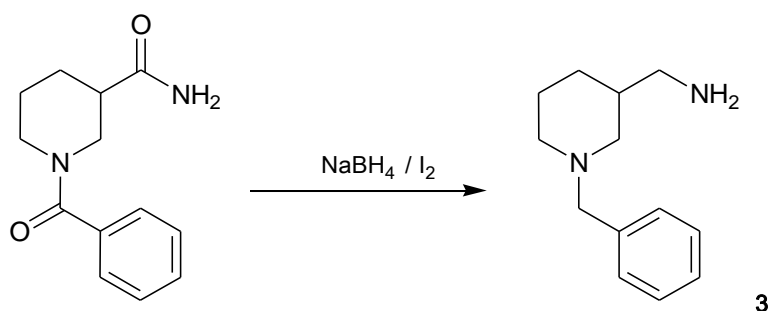
Masne spektre spojin so posneli na Fakulteti za farmacijo na masnem spektrometru Advion Expression Compact Mass Spectrometer proizvajalca Advion, s tehniko razpršilne ionizacije ESI.

Določanje tališča

Spojinam smo določili temperaturo tališča s talilnim mikroskopom Wagner & Munz Polytherm A in termometrom 52 II Thermometer proizvajalca Fluke na Fakulteti za farmacijo. Temperature tališč niso korigirane.

4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 Sinteza (1-benzilpiperidin-3-il)metanamina (3)



V trogrlo bučko opremljeno z magnetnim mešalom smo natehtali 1-benzoilpiperidin-3-karboksamid (4,65 g; 20 mmol) in bučko prepihali z argonom. Pod nadtlakom argona smo v čašo dodali 40 ml brezvodnega THF. Reakcijski zmesi smo nato dodali natrijev borohidrid (1,97 g; 52 mmol) in med mešanjem ohladili na ledeni kopeli. Bučko smo nato odstavili z ledene kopeli in med mešanjem v enakomernem curku dodali jod (5,07 g; 20 mmol), ki smo ga raztopili v 20 ml brezvodnega THF. Po dodatku raztopine smo reakcijsko zmes pod argonovo atmosfero mešali pri temperaturi vrelišča še 16h.

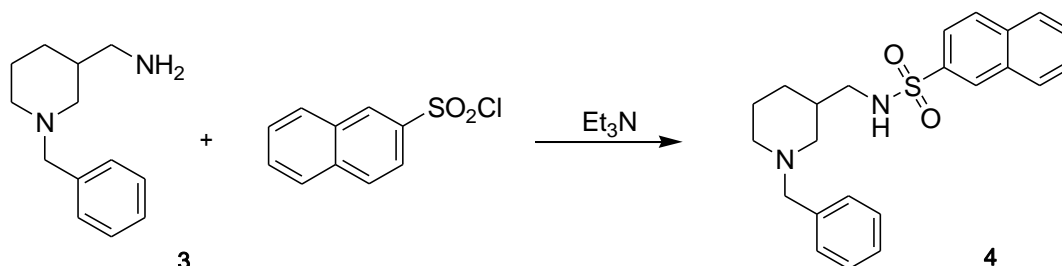
Reakcijski zmesi smo pri sobni temperaturi po kapljicah dodali metanol (10 ml), s čimer smo odstranili prebitno količino diborana (B_2H_6). Topilo smo nato uparili pri znižanem tlaku in ostanku dodali 50 mL 20% vodne raztopine NaOH. Produkt smo ekstrahirali z MTBE (3×30 ml) in organsko fazo posušili nad Na_2SO_4 . Topilo smo uparili pod znižanim tlakom in surov produkt takoj uporabili pri naslednji stopnji.

Opis: brezbarvno olje

Izkoristek: 75%

Rf: 0,12 (MF: DCM/MeOH = 9/1)

4.2 Sinteza N-[(1-benzilpiperidin-3-il)metil]naftalen-2-sulfonamida (4)



Spojino **3** smo raztopili v 40 ml DCM in zmesi dodali Et₃N (2,1 ml; 16,5 mmol). Zmes smo ohladili na ledeni kopeli in med mešanjem počasi dodali naftalen-2-sulfonil klorid (3,4 g; 15 mmol). Po dodatku naftalen-2-sulfonil klorida smo reakcijsko zmes mešali na sobni temperaturi še 4 dni.

Reakcijsko zmes smo spirali z vodo (30 ml), nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (30 ml) in nato z nasičeno vodno raztopino NaCl (30 ml). Organsko fazo smo sušili nad Na₂SO₄, filtrirali in uparili topilo pod znižanim tlakom. Surov produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF: DCM/MeOH = 30/1 proti 10/1).

Opis: gosto in viskozno rjavkasto olje

Izkoristek: 41%

Rf: 0,67 (MF: DCM/MeOH = 9/1)

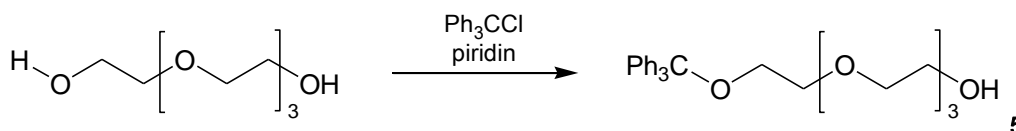
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1,02–1,11 (1H, m), 1,43–2,14 (5H, m), 2,51–2,99 (4H, m), 3,38–3,46 (2H, m), 5,20 (1H, bs), 7,20–7,32 (5H, m), 7,55–7,68 (2H, m), 7,78 (1H, dd, *J*₁ = 8,8 Hz, *J*₂ = 2,0 Hz), 7,88–7,98 (3H, m), 8,37–8,42 (1H, m).

MS (ESI): 395,39 [M+H]⁺, 393,51 [M-H]⁻

M_r (izračunana): 394,53

Elementna sestava: C₂₃H₂₆N₂O₂S

4.3 Sinteza 1,1,1-trifenil-2,5,8,11-tetraoksatridekan-13-ola (5)



Tetraetilenglikol (48,0 g; 0,25 mol) smo natehtali v bučko opremljeno z magnetnim mešalom in dodali 3 ml piridina (37 mmol). Po dodatku trifenil klorida (6,88 g; 25 mmol)

smo reakcijsko zmes segrevali na oljni kopeli pri temperaturi 45°C. Reakcijsko zmes smo nato pustili mešati pri omenjeni temperaturi 16 h.

Reakcijski zmesi smo po koncu reakcije dodali 50 ml toluena. Organsko fazo smo spirali z vodo (4 × 50 ml) in z nasičeno vodno raztopino NaCl (2 × 30 ml). Organsko fazo smo nato posušili nad Na₂SO₄, filtrirali in uparili topilo pri znižanem pritisku.

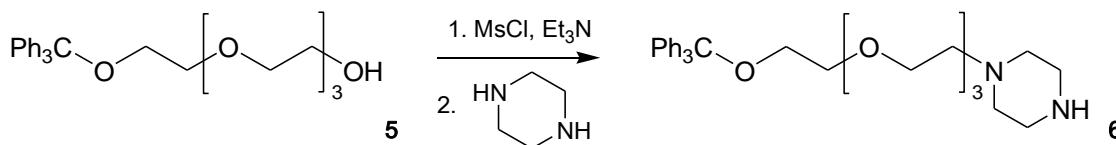
Opis: svetlo zeleno olje

Izkoristek: 89%

Rf: 0,73 (MF: DCM/MeOH = 9/1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 3,17 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H, CH₂), 3,51 (m, *J*₁ = 3,2 Hz, *J*₂ = 4,8 Hz, 2H, CH₂), 3,61 (m, *J*₁ = 3,6 Hz, *J*₂ = 1,2 Hz, 12H, CH₂), 7,15 (m, *J*₁ = 2,4 Hz, *J*₂ = 3,2 Hz, *J*₃ = 1,2 Hz, 3H, Ar-H), 7,21 (m, *J*₁ = 2,4 Hz, *J*₂ = 3,2 Hz, *J*₃ = 1,2 Hz, 6H, Ar-H), 7,39 (m, *J*₁ = 2,4 Hz, *J*₂ = 3,2 Hz, *J*₃ = 1,2 Hz, 6H, Ar-H).

4.4 Sinteza 1-(1,1,1-trifenil-2,5,8,11-tetraoksatridekan-13-il)piperazina (6)



V bučko smo natehtali spojino **5** (5,0 g; 11,5 mmol) in jo raztopili v 50 ml DCM. Nastalo raztopino smo ohlajali na ledeni kopeli in dodali Et₃N (1,8 ml; 12,6 mmol). Ohlajeni reakcijski zmesi smo nato po kapljicah med mešanjem dodali metansulfonil klorid (0,93 ml; 12,0 mmol) in jo po 5 minutah odstavili z ledene kopeli. Po 50 minutah mešanja pri sobni temperaturi smo na podlagi TLC analize reakcijske zmesi ugotovili, da je reakcija potekla do konca. Reakcijsko zmes smo sprali z vodo (30 ml) in nato z nasičeno vodno raztopino NaCl (30 ml). Organsko fazo smo nato posušili z Na₂SO₄, filtrirali in topilo uparili pri znižanem tlaku.

Surov produkt (brezbarvno olje) prve stopnje smo raztopili v ACN (70 ml) in nastali raztopini dodali NaI (1,6 g; 10,7 mmol) ter piperazin (3,7 g; 42,7 mmol). Reakcijsko zmes smo 4 dni mešali pri temperaturi 55°C. Reakcijski zmesi smo uparili topilo pod znižanim tlakom in zaostanek raztopili v 60 ml EtOAc. To raztopino smo nato spirali z vodo (4 × 30 ml) in z nasičeno vodno raztopino NaCl (30 ml) ter posušili nad

Na₂SO₄. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom in izolirali zeleno oranžno olje z rahlim vonjem po aminih.

Opis: zeleno oranžno olje

Izkoristek: 61%

Rf: 0,35 (MF:DCM/MeOH/ Et₃N =9/1/0,1)

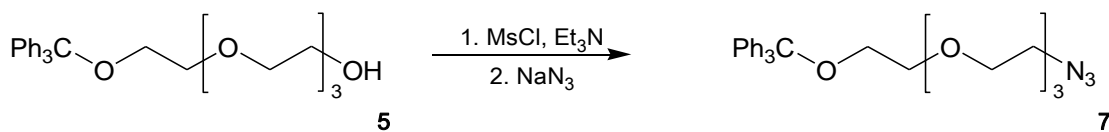
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 2,40 (s, 4H, CH₂), 2,49 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H, CH₂), 2,82 (t, *J* = 6,0 Hz, 4H, CH₂), 2,86 (s, 1H, NH), 3,16 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H, CH₂), 3,53 (m, *J*₁=5,6 Hz, *J*₂ = 2,4 Hz, 4H, CH₂), 3,60 (m, *J*₁ = 4,0 Hz, *J*₂ = 1,2 Hz, 8H, CH₂), 7,14 (m, *J*₁ = 7,2 Hz, *J*₂=1,6 Hz, 3H, Ar-H), 7,21 (m, *J*₁ = 7,6 Hz, *J*₂=1,6 Hz, 6H, Ar-H), 7,39 (m, *J*₁ = 7,2 Hz, *J*₂=1,6 Hz, 6H, Ar-H)

MS (ESI): 505,55 [M+H]⁺, 527,61 [M+Na]⁺

M_r (izračunana): 504,66

Elementna sestava: C₃₁H₄₀N₂O₄

4.5 Sinteza 13-azido-1,1,1-trifenil-2,5,8,11-tetraoksatridekana (7)



Aktivacijo alkohola **5** (3,30 g; 7,56 mmol) z uvedbo mezilata smo izvedli po enakem postopku in z enakimi množinskimi razmerji kot pri sintezi spojine **6**. Reakcijsko zmes smo spirali z vodo (25ml) in nasičeno vodno raztopino NaCl (25 ml), sušili nad Na₂SO₄ in uparili topilo pod znižanim tlakom.

Olje (3,50 g; 6,80 mmol), ki smo ga dobili po uparitvi topila, smo raztopili v 40 ml DMF. Med mešanjem pri sobni temperaturi smo v raztopino dodali natrijev azid (1,77 g; 27,2 mmol). Reakcijsko zmes smo nato čez noč segrevali na oljni kopeli pri temperaturi 60°C. DMF smo uparili pod znižanim tlakom in zaostanek raztopili v EtOAc (50 ml), ki smo ga potem spirali z vodo (5 × 30 ml) in nasičeno vodno raztopino NaCl (30 ml). Po sušenju organske faze nad Na₂SO₄ in filtriranju smo uparili topilo pod znižanim tlakom in dobili olje svetlo zelene barve. Produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF: petrol eter/dietil eter = 1/1).

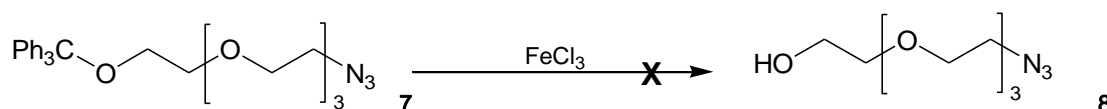
Opis: olje blede zelene barve

Izkoristek: 48%

Rf: 0,53 (MF: EtOAc/Hex.= 1/1)

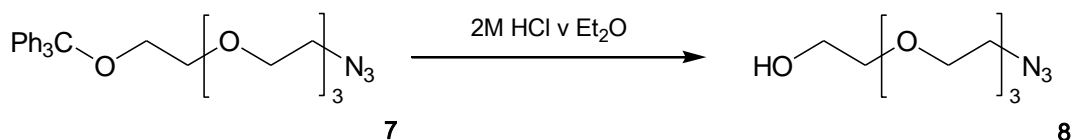
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 3,16 (t, $J = 5,6$ Hz, 2H, CH₂), 3,27 (t, $J = 5,2$ Hz, 2H, CH₂), 3,59 (m, $J_1 = 5,2$ Hz, $J_2 = 2,4$ Hz, $J_3 = 1,2$ Hz, 12H, CH₂), 7,19 (m, $J_1 = 6,8$ Hz, $J_2 = 1,2$ Hz, 9H, Ar-H), 7,39 (m, $J_1 = 6,8$ Hz, $J_2 = 1,6$ Hz, 6H, Ar-H).

4.6 Poskus sinteze 2-{2-[2-(2-azidoetoksi)etoksi]etoksi}etan-1-ola (8)



Spojino **7** (85 mg; 0,18 mmol) smo raztopili v 10 ml DCM in med mešanjem v reakcijsko zmes dodali železov (III) klorid (85 mg; 0,53 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi 48 ur. Reakcijski zmesi, ki je po dveh dneh postala rjavkasta, smo postopoma dodajali vodno raztopino NH₃ (2 ml). Reakcijski zmesi smo nato dodali 25 ml vode in ekstrahirali z DCM (3 × 30 ml). Produkt je zaostal v vodni fazi, zato smo slednjo uparili pod znižanim tlakom in produkt čistili s kolonsko kromatografijo (MF: DCM/MeOH = 10/1 do 2/1). Produkta nismo uspeli dovolj dobro očistiti.

4.7 Sinteza 2-{2-[2-(2-azidoetoksi)etoksi]etoksi}etan-1-ola (8)



Spojino **7** (1,47 g; 3,17 mmol) smo raztopili v 5 ml dietil etra in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Med mešanjem smo postopoma dodali 2M HCl v dietil etru (5 ml; 10 mmol). Nastali raztopini smo uparili topilo in surov produkt čistili s kolonsko kromatografijo (MF: dietil eter/petrol eter=1/1).

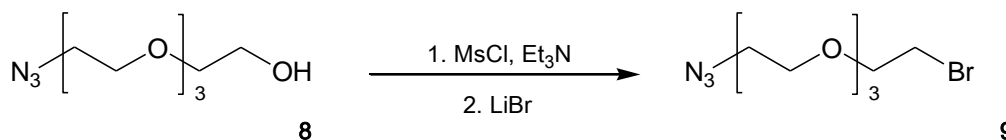
Opis: viskozno olje

Rf: 0,45 (MF: EtOAc/MeOH=9/1)

Izkoristek reakcije: 93%

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 3,34 (t, $J = 5,0$ Hz, 2H, CH_2), 3,55 (m, $J_1 = 3,8$ Hz, $J_2 = 1,2$ Hz, 2H, CH_2), 3,61 (q, $J_1 = 4,6$ Hz, $J_2 = 0,8$ Hz, 10H, CH_2), 3,67 (m, $J_1 = 4,6$ Hz, $J_2 = 3,4$ Hz, 2H, CH_2).

4.8 Sinteza 1-azido-2-{2-[2-(2-bromoetoksi)etoksi]etoksi}etana (9)



Aktivacijo hidroksilne skupine spojine **8** (0,64 g; 2,92 mmol) z uvedbo mezilatne skupine smo izvedli po enakem postopku in z enakimi množinskimi razmerji kot pri sintezi spojine **6**.

Brezbarvno olje (0,85 g; 2,86 mmol) smo raztopili v 50 ml ACN in nastali raztopini med mešanjem dodali litijev bromid (0,31 g; 3,56 mmol). Reakcijska zmes se je pri dodatku soli nekoliko segrela. Reakcijsko zmes smo pustili mešati pri sobni temperaturi 24 ur. Reakcijski zmesi smo uparili topilo in zaostalo suspenzijo nanесли na kratko kolono (MF:DCM/MeOH=9/1).

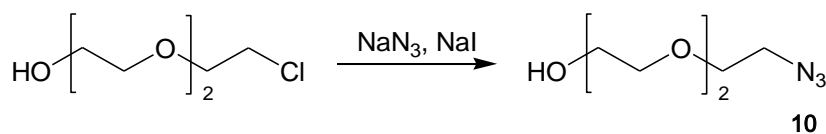
Opis: rdečrjavo olje

Rf: 0,73 (MF: DCM/MeOH=9/1)

Izkoristek reakcije: 79%

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 3,33 (t, $J = 5,2$ Hz, 2H, CH_2), 3,41 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H, CH_2), 3,62 (q, $J_1 = 5,6$ Hz, $J_2 = 1,6$ Hz, 10H, CH_2), 3,70 (td, $J_1 = 6,2$ Hz, $J_2 = 0,6$ Hz, 1H, CH_2), 3,75 (t, $J = 6,4$ Hz, 1H, CH_2).

4.9 Sinteza 2-[2-(2-azidoetoksi)etoksi]etanola (10)



2-[2-(2-kloroetoksi)etoksi]etanol (6,0 g; 35,8 mmol) smo raztopili v 15 ml DMF in nastali raztopini nato dodali NaN_3 (6,98 g; 107,4 mmol) ter NaI (0,53 g; 3,58 mmol). Reakcijsko zmes smo med mešanjem segrevali pri 65 °C en dan. Reakcijski zmesi smo nato uparili topilo pri znižanem tlaku in zaostanek suspendirali v EtOAc. Suspenzijo smo

filtrirali in filtratu uparili topilo pod znižanim tlakom. Surov produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc/MeOH = 9/1).

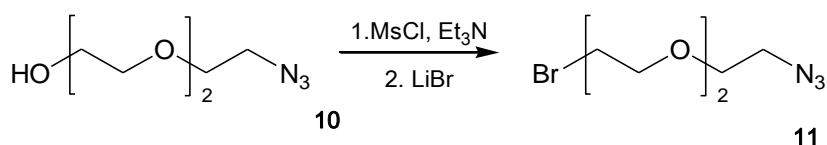
Opis: brezbarvno olje

Izkoristek: 91%

Rf: 0,67 (MF: EtOAc/MeOH = 9/1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 2,24 (t, *J* = 6,0 Hz, 1H, OH), 3,42 (t, *J* = 5,0 Hz, 2H, CH₂), 3,60-3,80 (m, 10H, 5 × CH₂).

4.10 Sinteza 1-azido-2-[2-(2-bromoetoksi)etoksi]etana (**11**)



Aktivacijo alkohola **9** (5,70 g; 32,5 mmol) prek uvedbe mezilatne skupine izvedli po istem postopku in z enakimi množinski razmerji kot pri sintezi spojine **6**. Surov produkt prve stopnje smo izolirali tako, da smo reakcijski zmesi uparili topilo, zaostanek suspendirali v EtOAc (30 ml) in filtrirali skozi tanko plast silikagela. Silikagel smo sprali s 30 ml EtOAc in filtratu uparili topilo.

Drugo stopnjo reakcije smo izvedli po istem postopku kot pri sintezi spojine **8**. Surov produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc).

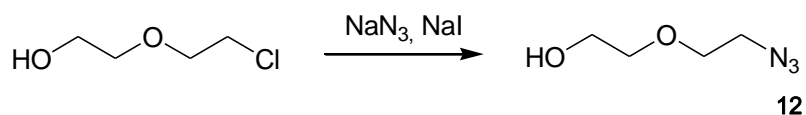
Opis: zelenkasto olje

Izkoristek: 87 %

Rf: 0,81 (MF: EtOAc/MeOH = 8/1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 3,39 (t, *J* = 5,0 Hz, 2H, CH₂), 3,46 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H, CH₂), 3,65-3,72 (m, 6H, 3 × CH₂) 3,82 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H, CH₂).

4.11 Sinteza 2-(2-azidoetoksi)etanola (**12**)



2-(2-kloroetoksi)etanol (12,5 g, 0,10 mol) smo raztopili v 15 ml DMF in reakcijo izvedli po enakem postopku in z istimi množinskimi razmerji kot pri sintezi spojine **9**. Produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc/MeOH = 9/1).

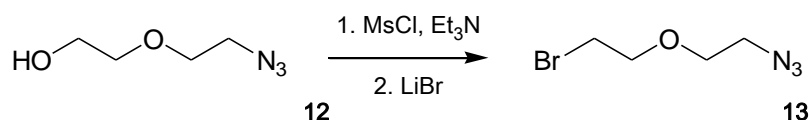
Opis: brezbarvno olje

Izkoristek: 90%

Rf: 0,73 (MF: EtOAc/MeOH = 9/1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 3,82 – 3,55 (m, 6H, 3 × CH₂), 3,41 (t, 2H, *J* = 4.8 Hz, CH₂), 2,03 (t, 1H, *J* = 4.8 Hz, OH)

4.12 Sinteza 1-azido-2-(2-bromoetoksi)etana (**13**)



Aktivacijo hidroksilne skupine spojine **11** (11,8 g; 90 mmol) smo izvedli po enakem postopku z enakimi množinskimi razmerji kot pri sintezi spojine **6**. Produkt prve stopnje smo očistili tako, da smo reakcijski zmesi uparili topilo, zaostanek suspendirali v EtOAc in filtrirali skozi tanko plast silikagela. Filtratu smo nato uparili topilo in takoj nadaljevali z drugo stopnjo reakcije.

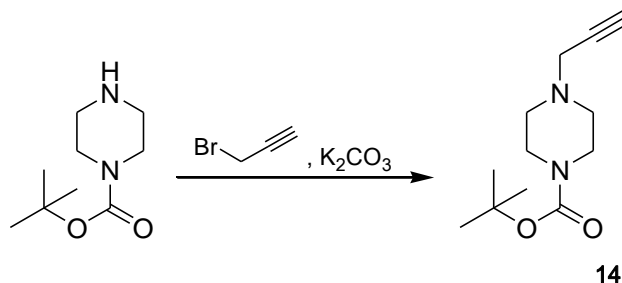
Drugo stopnjo reakcije smo izvedli po postopku opisanem pri sintezi spojine **8**. Produkt reakcije smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc/Hex = 1/1) in produkt takoj uporabili v naslednji stopnji.

Opis: olje rahlo zelene barve

Izkoristek: 86%

Rf: 0,75 (MF: DCM/acetone = 1/8)

4.13 Sinteza *tert*-butil 4-(prop-2-in-1-il)piperazin-1-karboksilata (**14**)



Tert-butil piperazin-1-karboksilat (3,0 g; 16,1 mmol) smo natehtali v 50 ml bučko in dodali kalijev karbonat (4,5 g; 32,2 mmol) ter 30 ml ACN. Ob mešanju smo reakcijski zmesi pri sobni temperaturi po kapljicah dodali propargil bromid (80% raztopina v toluenu) (1,82 ml; 16,9 mmol). Opazili smo rahel porast temperature in nastajanje plina.

Reakcijsko zmes smo po 30 minutah prestavili na oljno kopel in 16 h segrevali pri temperaturi 60°C. Reakcijski zmesi smo odparili topilo in suh zaostanek suspendirali v EtOAc. Nastalo raztopino smo spirali z vodo (30 ml), nasičeno vodno raztopino NaCl (30 ml) in posušili nad Na₂SO₄. Po uparitvi topila smo dobili viskozno rjavo olje, ki smo ga očistili s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc/Hex=1/1).

Opis: oranžni kristali

Rf: 0,33 (MF: EtOAc/Hex=1/1)

Izkoristek reakcije: 64%

T_{tališča}: 152-155

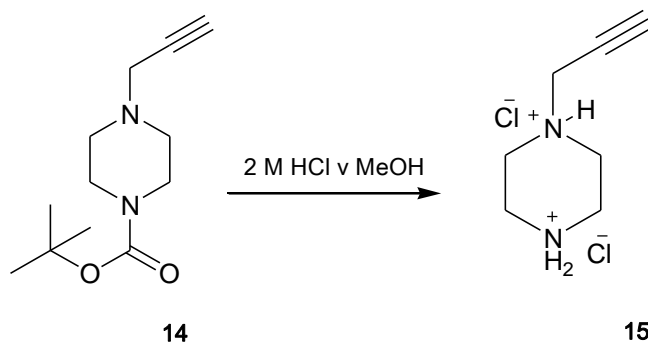
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1,45 (s, 9H, CH₃), 2,23 (t, *J*=2,4 Hz, 1H, C≡CH), 2,51 (t, *J*=5,2 Hz, 4H, NCH₂), 3,31 (d, *J*=2,4 Hz, 2H, C≡CCH₂), 3,46 (t, *J*=5,2 Hz, 4H, NCH₂).

MS (ESI): 125,16 (masna analiza določi le fragmente, najverjetneje spojina razpade pri ionizaciji)

M_r (izračunana): 224,30

Elementna sestava: C₁₂H₂₀N₂O₂

4.14 Sinteza 1-(prop-2-in-1-il)piperazinijevega klorida (15)



V bučko smo odmerili 17,24 ml MeOH in ga ohlajali na ledeni kopeli. Med mešanjem smo ohlajenemu MeOH po kapljicah dodali acetil klorid (2,76 ml) in pustili mešati na ledeni kopeli 20 minut. Nastalo raztopino smo še naprej ohlajali na ledeni kopeli in vanjo med mešanjem dodali *tert*-butil 4-(prop-2-in-1-il)piperazin-1-karboksilat (2,11 g; 9,40 mmol). Reakcijsko zmes smo nato pustili mešati pri sobni temperaturi 3 dni. Reakcijski zmesi smo uparili topilo in izolirali naš produkt.

Opis: svetlozelena sol

Rf: 0,17 (MF: DCM/MeOH/ocetna kislina=9/1/0.01)

Izkoristek reakcije: 98%

T_{tališča}: 215-218

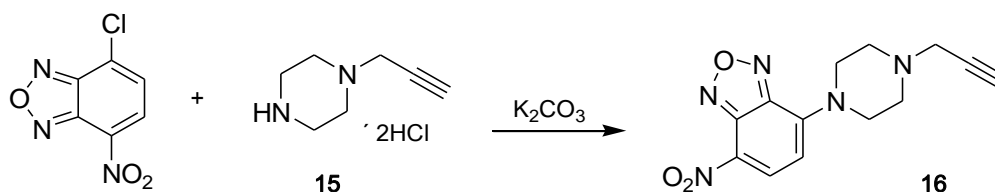
¹H-NMR (400 MHz, piridin-d₅): 2,95 (t, *J*=5,2 Hz, 4H, NCH₂), 3,23 (t, *J*=2,4 Hz, 1H, C≡CH), 3,40 (d, *J*=2,4 Hz, 2H, C≡C-CH₂), 3,47 (t, *J*=5,2 Hz, 2H, NCH₂)

MS (ESI): 125,16 [M+H]⁺

M_r (izračunana): 124,18

Elementna sestava: C₇H₁₂N₂

4.15 Sinteza 4-nitro-7-[4-(prop-2-in-1-il)piperazin-1-il]-2,1,3-benzoksadiazola (**16**)



Derivat piperazina **15** (48,5 mg; 0,30 mmol) in kalijev karbonat (172,7 mg; 1,25 mmol) smo suspendirali v THF in suspenzijo ohladili na ledeni kopeli. K ohlajeni suspenziji smo med mešanjem po kapljicah dodali v 5 ml MeOH raztopljen 4-kloro-7-nitrobenz-2-oksa-1,3-diazol (NBD-Cl) (50 mg; 0,25 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali 24 ur pri sobni temperaturi. Reakcijski zmesi smo nato uparili topilo in zaostanek suspendirali v 50 ml DCM ter sprali z nasičeno vodno raztopino NaCl (30 ml). Organski fazi smo nato uparili topilo, dodatno čiščenje ni bilo potrebno.

Opis: rdeč prah

Rf: 0,63 (MF: DCM/MeOH = 8/1)

Izkoristek reakcije: 71%

T_{tališča}: 141-144 °C

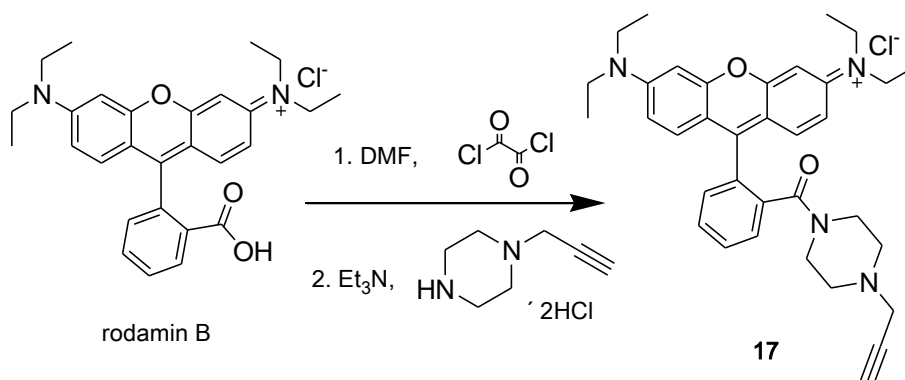
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 2,70 (t, *J*=4,8 Hz, 4H, NCH₂), 3,22 (t, *J*=2,4 Hz, 1H, C≡CH), 3,40 (d, *J*=2,4 Hz, 2H, C≡C-CH₂), 4,16 (s, 2H, NCH₂), 6,70 (d, *J*=9,2 Hz, 1H, Ar-H), 8,48 (d, *J*=9,2 Hz, 1H, Ar-H).

MS (ESI): 288,21 [M+H]⁺, 310,22 [M+Na]⁺

M_r (izračunana): 287,27

Elementna sestava: C₁₃H₁₃N₅O₃

4.16 Sinteza 6-(dietilamino)-N,N-dietil-9-{2-[4-(prop-2-in-1-il)piperazin-1-karbonil]fenil}ksanten-3-iminijevega klorida (**17**)



Rodamin B (0,41g; 0,86 mmol) smo raztopili v 20 ml DCM. Raztopino vijolične barve smo med mešanjem ohladili na ledeni kopeli in dodali katalitično količino DMF. V ohlajeno raztopino smo potem po kapljicah dodali oksalil klorid (0,11 ml; 0,90 mmol). Pri dodajanju oksalil klorida smo opazili izhajanje plina. Po 10 minutah smo reakcijsko zmes odstavili z ledene kopeli in segreli na 55°C za 30 min. Reakcijski zmesi smo nato uparili topilo in dobili stabilno peno intenzivne vijolične barve, ki smo jo takoj uporabili pri naslednji reakciji.

Izolirani kislinski klorid smo raztopili v 10 ml DCM in ga po kapljicah dodali na ledeni kopeli ohlajeni zmesi spojine **15** (138 mg; 0,86 mmol) in Et₃N (0,18 ml; 1,29 mmol) v 20 ml DCM. Reakcijsko zmes smo po dodatku kislinskega klorida mešali na sobni temperaturi 36 ur in nato uparili topilo. Surovemu produktu smo poskušali odstraniti izhodni rodamin B s kolonsko kromatografijo (MF: aceton/DCM = 4/1 proti 1/4), vendar produkta nismo uspeli povsem ločiti od rodamina B. Produkt smo poskusili še enkrat očistiti na koloni (MF: aceton/DCM/očetna kislina = 8/1/0,1, nato aceton/DCM = 1/8), vendar neuspešno.

Opis: viskozno temno vijolično olje

Rf: 0,31 (MF: DCM/MeOH = 9/1)

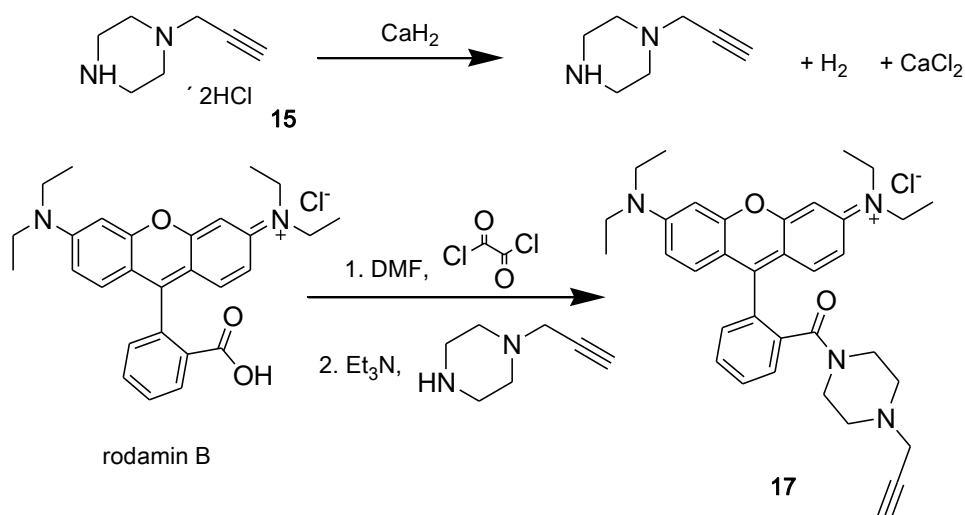
Izkoristek reakcije: 83% (neočiščen produkt)

4.17 Sinteza 6-(dietilamino)-N,N-dietil-9-{2-[4-(prop-2-in-1-il)piperazin-1-karbonil]fenil}ksanten-3-iminijevega klorida (**17**) – 1. poskus optimiziranja reakcije

Izhodni rodamin B (190 mg; 0,40 mmol) smo pretvorili v pripadajoč kislinski klorid po istem postopku kot pri prvi sintezi spojine **17**, le da smo tokrat uporabili prebitno količino oksalil klorida (44,6 μ l; 0,52 mmol). Po uparitvi topila smo izolirani kislinski klorid takoj uporabili pri naslednji reakcijski stopnji.

Reakcijo kislinskega klorida s piperazinskim derivatom **15** smo izvedli po enakem postopku in z istimi množinskimi razmerji kot pri prvi sintezi spojine **17**. Ker reakcija ni dobro potekla, se za čiščenje reakcijskega produkta nismo odločili.

4.18 Sinteza 6-(dietilamino)-N,N-dietil-9-{2-[4-(prop-2-in-1-il)piperazin-1-karbonil]fenil}ksanten-3-iminijevega klorida (**17**) – 2. poskus optimiziranja reakcije



Alkin **15** (118 mg; 0,60 mmol) smo natehtali v bučko in ga suspendirali v 50 ml DCM. Med mešanjem smo suspenziji dodali kalcijev hidrid (37,9 mg; 0,90 mmol) in reakcijsko zmes zaščitili pred zračno vlago. Opazili smo izhajanje plina. Reakcijsko zmes smo pri sobni temperaturi mešali 3 dni. Po treh dneh smo oborino filtrirali skozi grob filter papir in filtratu uparili topilo, pri čemer smo dobili trdno snov zelenkaste barve (70 mg; 0,56 mmol).

Rodamin B (221 mg; 0,46 mmol) smo po enakem postopku kot pri prvi sintezi spojine **17** pretvorili v kislinski klorid. Po uparitvi topila smo dobili intenzivno vijolično obarvano trdno snov, ki smo jo takoj uporabili v naslednji reakcijski stopnji.

Piperazin **15**, ki smo ga izolirali po nevtralizaciji s kalcijevim hidridom smo po enakem postopku kot pri prvi sintezi spojine **17** v prisotnosti Et₃N (83,4 μl; 0,60 mmol) pustili reagirati s pripravljenim kislinskim kloridom rodamina B. Reakcijski produkt je vseboval še precej izhodnega rodamina B, zato smo ga poskušali očistiti s preparativno TLC (MF: DCM/MeOH = 9/1). Iz reakcijske zmesi kljub čiščenju nismo uspeli zadovoljivo odstraniti izhodne spojine.

Opis: viskozno temno vijolično olje

Rf: 0,31 (MF: DCM/MeOH = 9/1)

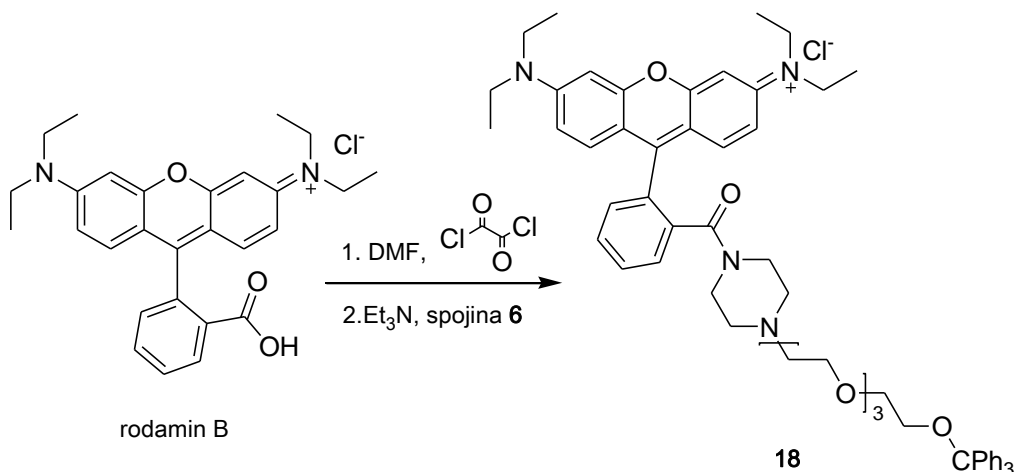
Izkoristek reakcije: 47 % (neočiščen produkt)

MS (ESI): 549,64 [M]⁺

M_r (izračunana): 549,73

Elementna sestava: C₃₅H₄₁N₄O₂

4.19 Sinteza 6-(dietilamino)-N,N-dietil-9-{2-[4-(1,1,1-trifenil-2,5,8,11-tetraoksatridekan-13-il)piperazin-1-karbonil]fenil}-3H-ksanten-3-iminijevega klorida (**18**)



Rodamin B (1,36 g; 2,83 mmol) smo raztopili v 50 ml DCM in ga po enakem postopku z istimi množinskimi razmerji kot pri sintezi spojine **17** pretvorili v kislinski klorid rodamina B.

Po uparitvi topila smo nastali kislinski klorid rodamina B raztopili v 20 ml DCM in raztopino po kapljicah dodali na ledeni kopeli ohlajeni raztopini spojine **6** (1,43 g; 2,83 mmol) in Et₃N (0,59 ml; 4,2 mmol) v DCM (20 ml). Reakcijsko zmes smo mešali na sobni temperaturi 36 ur in nato uparili topilo. Ker je produkt vseboval precej nečistot, predvsem

rodamina B, smo produkt reakcije poskušali očistiti. Surov produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF: DCM/MeOH/NH₃ = 20/1/0,1), vendar iz zmesi nismo uspeli odstraniti izhodnega rodamina B.

Opis: temno vijoličen prah s kovinskim sijajem

Rf: 0,17 (MF:DCM/MeOH/NH₃ = 9/1/0,1)

Izkoristek: 81% (neочиščen produkt)

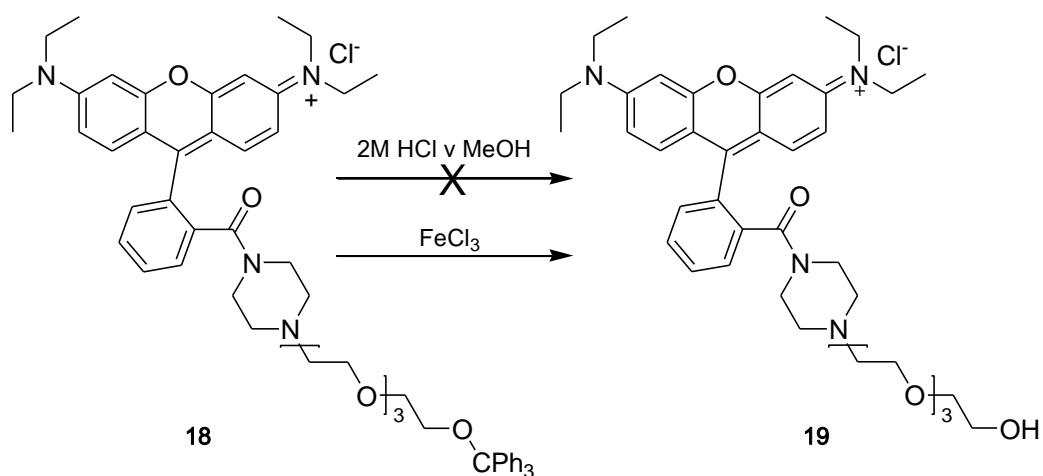
T_{tališča}: 142-145

MS (ESI): 930,24 [M]⁺

M_r (izračunana): 930,2

Elementna sestava: C₅₉H₆₉N₄O₆

4.20 Poskus sinteze 6-(dietilamino)-N,N-dietil-9-{2-[4-(2-{2-[2-(2-hidroksietoksi)etoksi]etoksi]etil)piperazin-1-karbonil]fenil}-3H-ksanten-3-iminijevega klorida (**19**)



Pripravili smo 2 M raztopino HCl v metanolu. 4 ml metanola smo ohlajali na ledeni kopeli in med mešanjem po kapljicah dodali acetil klorid (0,64 ml). Po 20 minutah smo pripravljeno raztopino dodali ohlajeni raztopini spojine **18** (100 mg; 0,11 mmol) v dveh mililitrih MeOH. Po dodatku metanolne raztopine HCl smo mešali še 15 min na ledeni kopeli in nato pri sobni temperaturi en dan. Reakcijski zmesi smo uparili topilo pod znižanim tlakom in dobili temno vijolične kristale. Reakcijski produkt smo analizirali s tankoplastno kromatografijo in ugotovili, da je reakcija slabo potekla, zato smo reakcijsko zmes zavrgli.

4.21 Sinteza 6-(dietilamino)-N,N-dietil-9-{2-[4-(2-{2-[2-(2-hidroksietoksi)etoksi]etoksi}etil)piperazin-1-karbonil]fenil}-3H-ksanten-3-iminijevega klorida (**19**)

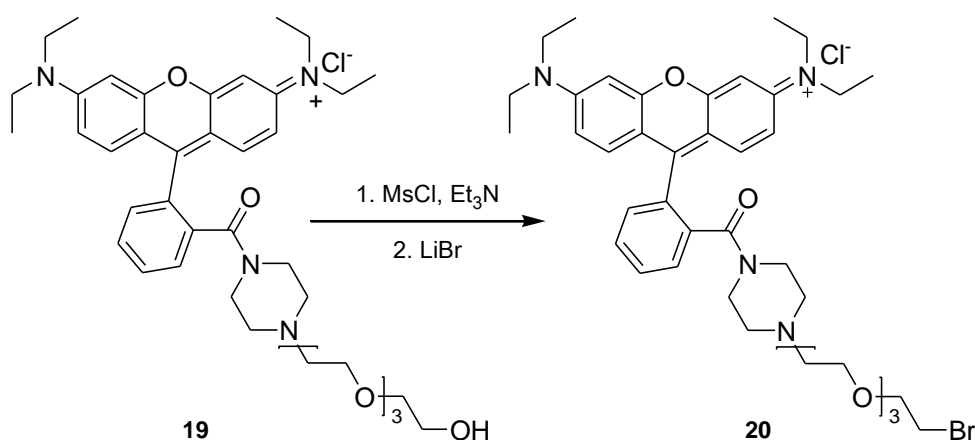
Spojino **18** (105 mg; 0,11 mmol) smo natehtali v stekleno bučko in dodali 10 ml DCM. Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi, da se je spojina **18** povsem raztopila. Raztopini smo nato dodali železov (III) klorid (90 mg; 0,33 mmol) in reakcijsko zmes pustili mešati pri sobni temperaturi en dan. Reakcijski raztopini smo uparili topilo in čistili s kolonsko kromatografijo (MF: DCM/MeOH/NH₃ = 9/1/0,1). Iz reakcijske zmesi kljub čiščenju nismo uspeli povsem odstraniti rodamina B.

Opis: viskozno temno vijolično olje

Rf: 0,21 (MF:DCM/MeOH/NH₃ = 9/1/0,1)

Izkoristek: 79% (neočiščen produkt)

4.22 Sinteza 9-{2-[4-(2-{2-[2-(2-bromoetoksi)etoksi]etoksi}etil)piperazin-1-karbonil]fenil}-6-(dietilamino)-N,N-dietilksanten-3-iminijevega klorida (**20**)



Hidroksilno skupino spojine **19** (72 mg; 0,10 mmol) smo aktivirali z uvedbo mezilata po enakem postopku in z enakimi množinskimi razmerji kot pri sintezi spojine **6**. Reakcijsko zmes smo dvakrat spirali z nasičeno vodno raztopino NaCl (25 ml) in nato organsko fazo posušili nad Na₂SO₄ in topilo uparili pri znižanem tlaku. Dobili smo viskozno vijolično olje, ki smo ga takoj uporabili v naslednji stopnji.

Produkt smo raztopili v 15 ml ACN in med mešanjem pri sobni temperaturi raztopini dodali LiBr (11 mg; 0,13 mmol). Reakcijsko zmes smo potem segreli do temperature 80°C in pustili mešati pri tej temperaturi dva dni. Uparili smo topilo in

zaostanek suspendirali v EtOAc ter sprali z vodo (30 ml), nasičeno vodno raztopino NaCl (30 ml) in sušili nad Na₂SO₄. Glede na TLC analizo je bilo reakcijskega produkta malo, poleg tega nismo uspeli najti primerne mobilne faze, ki bi omogočila zadostno ločbo, zato se za čiščenje nismo odločili.

Opis: viskozno temno vijolično olje

Rf: 0,37 (MF:DCM/MeOH/NH₃ = 9/1/0,1)

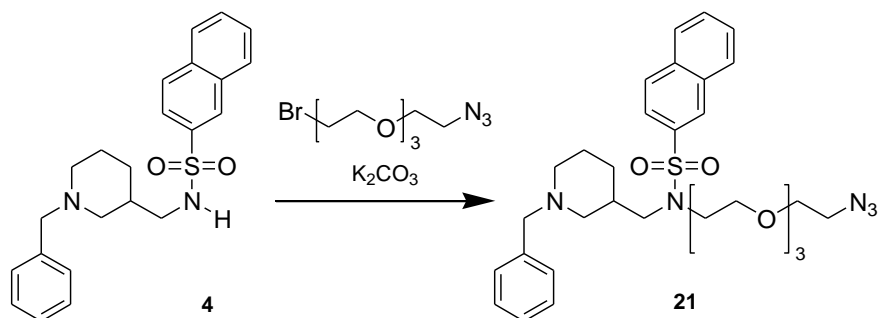
Izkoristek: 76 % (neочиščen produkt)

MS (ESI): 749,82 [M]⁺

M_r (izračunana): 750,78

Elementna sestava: C₄₀H₅₄N₄O₅Br

4.23 Sinteza N-(2-{2-[2-(2-azidoetoksi)etoksi]etoksi}etil)-N-[(1-benzilpiperidin-3-il)metil]naftalen-2-sulfonamida (21)



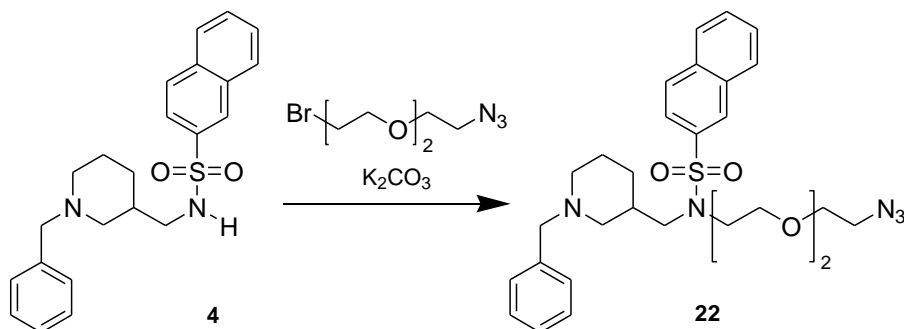
Spojino **4** (166 mg; 0,42 mmol) smo raztopili v 5 ml ACN in dodali K₂CO₃ (73 mg; 0,53 mmol). K nastali suspenziji smo dodali raztopino spojine **9** (96 mg; 0,35 mmol) v 3 ml ACN. Reakcijsko zmes smo mešali na temperaturi 50°C 36 ur, reakcija ni potekla. Temperaturo reakcijske zmesi smo dvignili na 80°C in mešali tri dni. Pri povišani temperaturi je reakcija potekla. Pri znižanem tlaku smo uparili topilo reakcijski zmesi in očistili produkt s kolonsko kromatografijo (MF: DCM/MeOH = 30/1). Ker produkta nismo uspeli v celoti očistiti, smo nečisti produkt takoj uporabili v naslednji stopnji.

Opis: zelenkasto viskozno olje

Rf: 0,22 (MF: DCM/MeOH = 30/1)

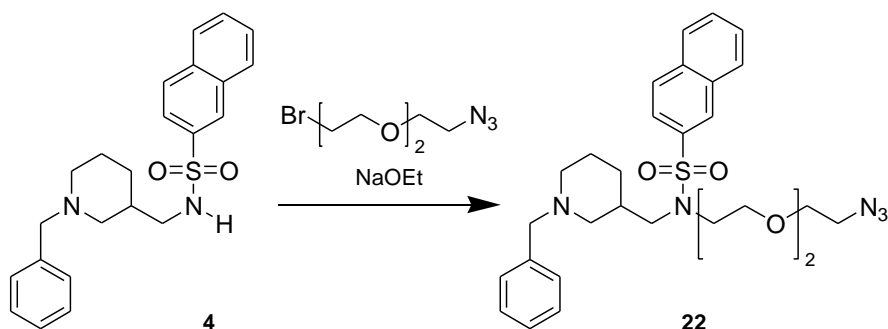
Izkoristek: 62 %

4.24 Poskus sinteze N-{2-[2-(2-azidoetoksi)etoksi]etil}-N-[(1-benzilpiperidin-3-il)metil]naftalen-2-sulfonamida (**22**) -1.



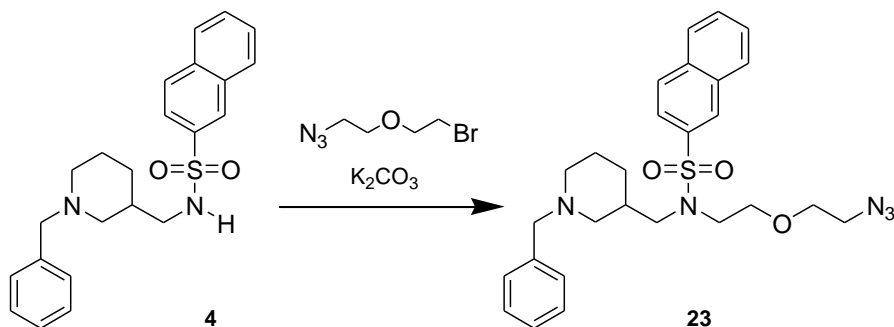
Spojino **4** (400 mg; 1 mmol) smo suspendirali v 10 ml ACN. V raztopino smo nato dodali K_2CO_3 (207,3 mg; 1,5 mmol) in zmes mešali 10 minut. Po 10 minutah smo reakcijski zmesi dodali še spojino **11** (32,2 mg; 1,3 mmol) in reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi en dan. TLC analiza je pokazala neuspešen potek reakcije, zato smo reakcijsko zmes zavrgli.

4.25 Poskus sinteze N-{2-[2-(2-azidoetoksi)etoksi]etil}-N-[(1-benzilpiperidin-3-il)metil]naftalen-2-sulfonamida (**22**) -2.



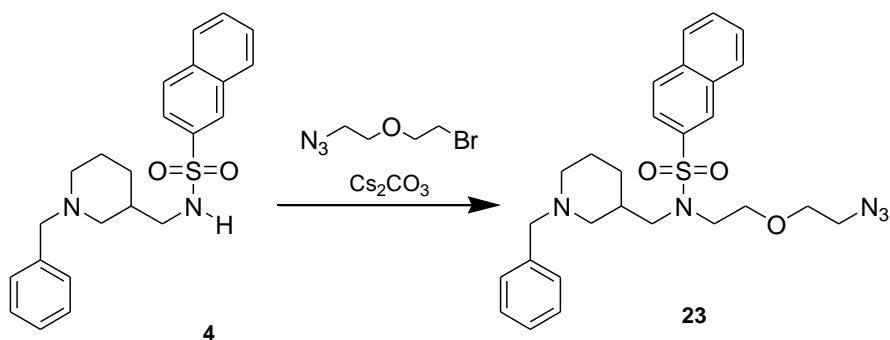
Na ledeni kopeli smo ohladili 10 ml brezvodnega EtOH in med mešanjem dodali natrij (32,2 mg; 1,4 mmol), ki smo ga narezali na majhne lističe. Ko se je ves natrij raztopil, smo dodali spojino **4** (400 mg; 1 mmol) in po 15 minutah spojino **11** (32,2 mg; 1,3 mmol). Reakcijsko zmes smo nato pustili mešati na sobni temperaturi 24 ur. Reakcijsko zmes smo analizirali s TLC in ugotovili neuspešen potek reakcije. Reakcijsko zmes smo zavrgli.

4.26 Poskus sinteze N-[2-(2-azidoetoksi)etil]-N-[(1-benzilpiperidin-3-il)metil]naftalen-2-sulfonamida (**23**)



V bučko smo natehtali spojino **4** (116 mg; 0,25 mmol) in K_2CO_3 (69,1 mg; 0,50 mmol) in dodali ACN (10 ml). Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi in ji med mešanjem dodali spojino **13** (97 mg; 0,50 mmol). Reakcijsko zmes smo en dan segrevali pri $60^\circ C$. Ker je reakcija slabo potekla, smo zmesi dodali še konico spatule NaI in zopet reakcijsko zmes pri $60^\circ C$ mešali čez noč. Ker reakcija ni dobro potekla tudi po dodatku natrijevega jodida, smo reakcijsko zmes zavrgli.

4.27 Sinteza N-[2-(2-azidoetoksi)etil]-N-[(1-benzilpiperidin-3-il)metil]naftalen-2-sulfonamida (**23**)



Spojino **4** (100 mg; 0,25 mmol) in Cs_2CO_3 (165,5 mg; 0,51 mmol) smo suspendirali v 5 ml ACN in vsebino bučke prepihali z argonom. Reakcijski zmesi smo nato dodali spojino **13** (73,9 mg; 0,38 mmol) in zmes prestavili na oljno kopel. Reakcijsko zmes smo mešali 3 dni pri $60^\circ C$. Reakcijski zmesi smo nato uparili topilo pod znižanim tlakom ter produkt čistili s kolonsko kromatografijo (MF: DCM/MeOH = 9/1 do 9/2).

Opis: oranžkasto viskozno olje

Rf: 0,59 (MF:DCM/MeOH = 20/1)

Izkoristek reakcije: 56 %

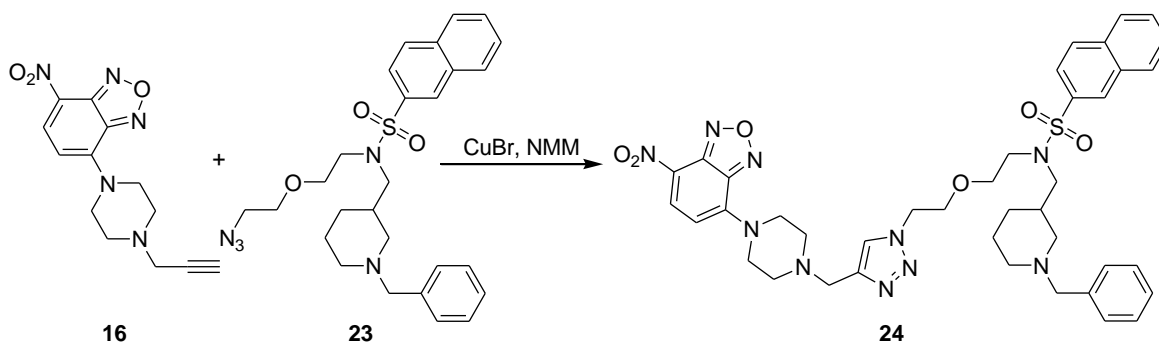
¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃): 0,99 (m, $J_1 = 9,2$ Hz, $J_2 = 2,8$ Hz, 1H, CH), 1,66 (m, $J_1 = 10,8$ Hz, $J_2 = 3,2$ Hz, 4H, CH₂), 1,98 (t, $J = 9,2$ Hz, 2H, CH₂), 2,78 (m, $J_1 = 23,6$ Hz, $J_2 = 9,6$ Hz, 2H, CH₂), 3,13 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H, CH₂), 3,28 (m, $J_1 = 9,2$ Hz, $J_2 = 5,2$ Hz, 4H, CH₂), 3,53 (m, $J_1 = 6,4$ Hz, $J_2 = 4,8$ Hz, 6H, CH₂), 7,28 (m, $J_1 = 8,2$ Hz, $J_2 = 1,2$ Hz, 5H, Ar-H), 7,63 (m, $J_1 = 12,4$ Hz, $J_2 = 1,6$ Hz, 2H, Ar-H), 7,76 (dd, $J_1 = 6,8$ Hz, $J_2 = 1,6$ Hz, 1H, Ar-H), 7,93 (m, $J_1 = 8,8$ Hz, $J_2 = 3,2$ Hz, 3H, Ar-H), 8,38 (m, $J_1 = 1,6$ Hz, $J_2 = 0,8$ Hz, 1H, Ar-H).

MS (ESI): 508,20 [M+H]⁺, 530,22 [M+Na]⁺

M_r (izračunana): 507,23

Elementna sestava: C₂₇H₃₃N₅O₃S

4.28 Sinteza N-[(1-benzilpiperidin-3-il)metil]-N-{2-[2-(4-{[4-(7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol-4-il)piperazin-1-il]metil}-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoksi]etil}naftalen-2-sulfonamida (**24**)



Alkin **16** (8,0 mg; 0,025 mmol) in azid **23** (12,7 mg; 0,025 mmol) smo raztopili v 20 ml EtOAc. Nastali raztopini smo med mešanjem pri sobni temperaturi dodali N-metilmorfolin (5,5 μ l; 0,05 mmol) in konico spatule CuBr (katalitična količina) ter nastalo zmes segrevali na temperaturi 40°C en dan. Reakcijski zmesi smo uparili topilo pod znižanim tlakom in produkt ločevali s kolonsko kromatografijo (MF: DCM/MeOH=40/1 proti 10/1).

Opis: oranžna trdna snov

R_f: 0,49 (MF:DCM/MeOH=8/1)

T_{tališča}: 131-134°C

Izkoristek reakcije: 86%

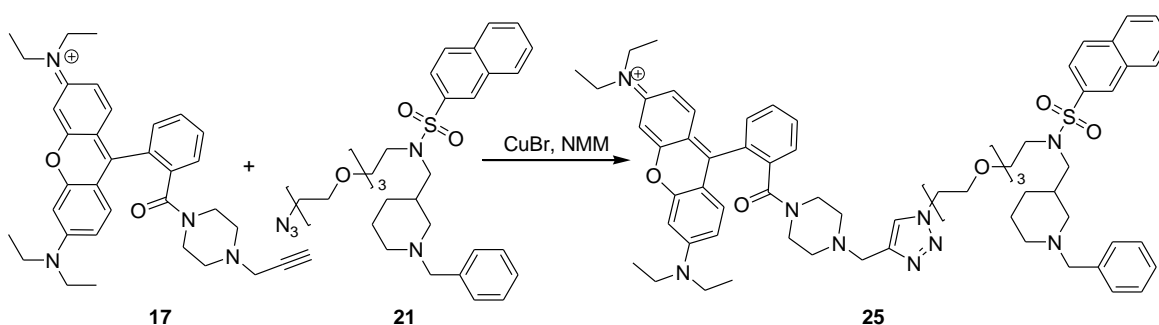
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 0,92 (m, $J_1=6,8$ Hz, $J_2=1,2$ Hz, 2H, CH₂CH₂), 1,29 (d, $J=17,6$ Hz, 4H, CH₂CH₂), 1,76 (m, $J=1,2$ Hz, 4H, CH₂CH₂), 2,05 (m, $J=1,2$ Hz, 2H, CH₂CH₂), 2,79 (t, $J=5,2$ Hz, 2H, CH₂CH₂), 3,04 (m, $J_1=11,2$ Hz, $J_2=6,8$ Hz, 2H, CH₂CH₂), 3,31 (m, $J_1=22$ Hz, $J_2=6$ Hz, 2H, CH₂CH₂) 3,58 (q, $J=5,2$ Hz, 2H, CH₂CH₂) 3,79 (dd, $J_1=4,4$ Hz, $J_2=5,2$ Hz, 4H, CH₂CH₂), 4,11 (s, 2H, CH₂), 4,51 (t, $J=5,2$ Hz, 1H, CH), 6,25 (d, $J=9,2$ Hz, 1H, Ar-H), 7,29 (d, $J=2,8$ Hz, 6H, Ar-H), 7.68 (m, $J_1=9,8$ Hz, $J_2=1,6$ Hz, 3H, Ar-H), 7,81 (s, 1H, Ar-H), 7,95 (m, $J_1=9,2$ Hz, $J_2=2$ Hz, 3H, Ar-H), 8,36 (t, $J=9,2$ Hz, 1H, Ar-H).

MS (ESI): 795,45 [M+H]⁺

M_r (izračunana): 794,33

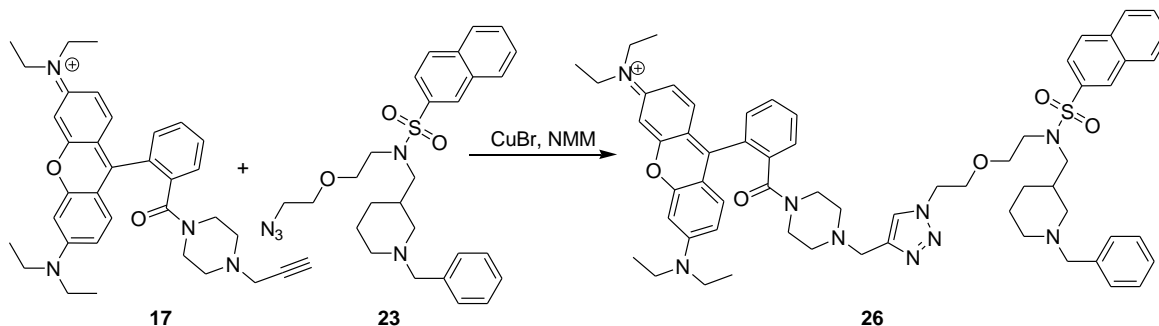
Elementna sestava: C₄₀H₄₆N₁₀O₆S

4.29 Poskus sinteze 9-[2-(4-[[1-(2-{2-[2-(2-{N-[(1-benzilpiperidin-3-il)metil]naftalen-2-sulfonamido}etoksi)etoksi]etoksi}etil)-1,2,3-triazol-4-il]metil]piperazin-1-karbonil)fenil]-6-(dietilamino)-N,N-dietilksanten-3-iminijevega klorida (25)



V stekleno bučko smo natehtali spojino 17 (57,5 mg; 0,10 mmol) in spojino 21 (58,5 mg; 0,10 mmol) in reakcijo izvedli po enakem postopku kot pri sintezi spojine 24. Reakcijsko zmes smo nato analizirali s pomočjo TLC in ugotovili, da reakcija ni potekla uspešno. Reakcijsko zmes smo zavrgli.

4.30 Poskus sinteze 9-{2-[4-({1-[2-(2-{N-[(1-benzilpiperidin-3-il)metil]naftalen-2-sulfonamido}etoksi)etil]-1,2,3-triazol-4-il}metil)piperazin-1-karbonil]fenil}-6-(dietilamino)-N,N-dietilksanten-3-iminijevega klorida (26)



Alkin **17** (17,3 mg; 0,03 mmol) in azid **23** (10,1 mg; 0,02 mmol) smo natehtali v stekleno bučko in reakcijo izvedli po istem postopku kot pri sintezi spojine **24**. Po analizi reakcijske zmesi s TLC smo ugotovili neuspešen potek reakcije, zato smo reakcijsko zmes zavrgli.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

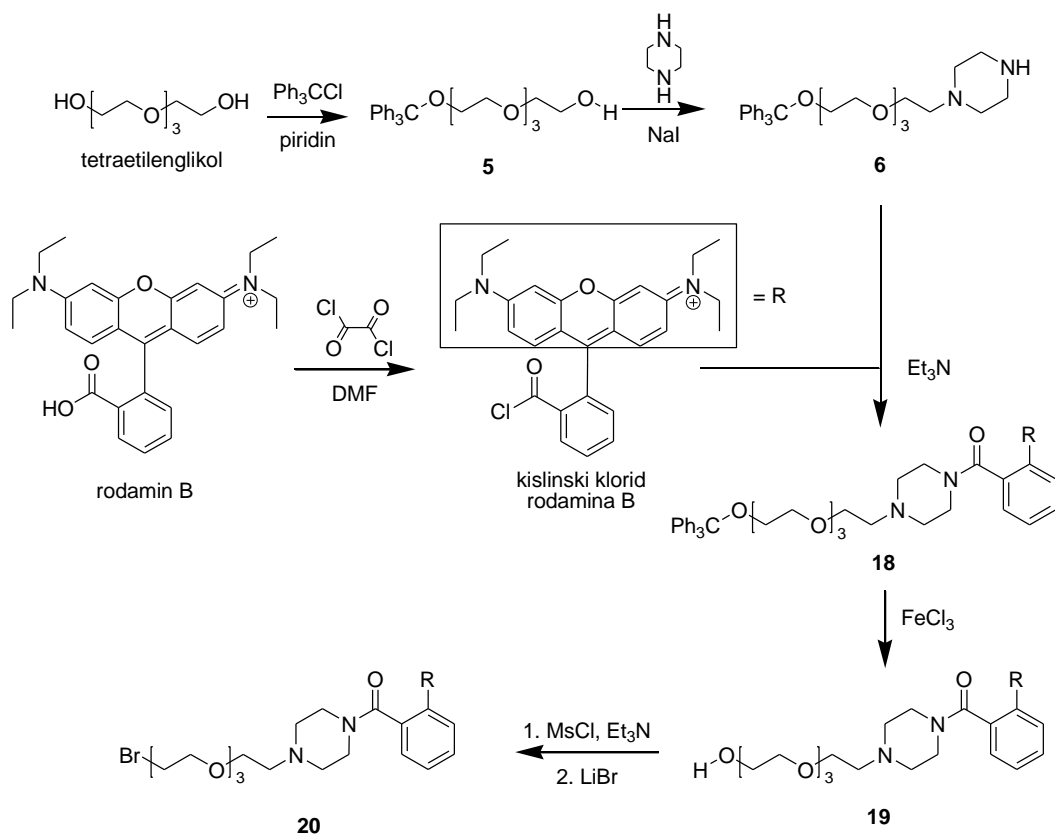
5.1 Pregled sinteze fluorescenčno označenega zaviralca BChE

Sintezo fluorescenčno označenega zaviralca BChE smo začeli z 1-benzoilpiperidin-3-karboksamidom, ki so ga sintetizirali na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo. Za redukcijo obeh karbonilnih skupin so na Katedri za farmacevtsko kemijo uporabljali LiAlH_4 , vendar je pri omenjenem pristopu prihajalo do številnih stranskih produktov. Zato smo se odločili poskusiti za redukcijo z BH_3 , ki smo ga tvorili *in situ* z dodatkom raztopine joda (I_2) k suspenziji NaBH_4 , pri čemer smo izolirali (1-benzilpiperidin-3-il)metanamin **3** (45). Naš pristop ni bistveno boljši od redukcije z LiAlH_4 , saj so še vedno bili prisotni številni stranski produkti. Nato smo z naftalen-2-sulfonil kloridom v prisotnosti Et_3N primarni amin **3** pretvorili v sulfonamid **4** (46). Ta predstavlja tisti del zaviralca, ki se veže v aktivno mesto BChE. Sulfonamidni skupini lahko brez težav odcepimo proton, pri tem pa dušik postane nukleofil. Tudi zato je to mesto zelo primerno za uvedbo ustreznega distančnika, ki bo povezoval del probe, ki zagotavlja vezavo v aktivno mesto BChE, s fluoroforom.

Pripravo distančnika smo začeli iz komercialno dostopnega tetraetilenglikola, kateremu smo najprej uvedli tritilno zaščitno skupino na eno od dveh hidroksilnih skupin.

Tetraetilenglikol smo pustili reagirati s trifenilmetil kloridom ob prisotnosti piridina. Pri tem velik prebitok tetraetilenglikola zagotavlja uvedbo zaščitne skupine samo na eno hidroksilno skupino (47). Prebitni tetraetilenglikol je dobro topen v vodi, medtem ko se produkt raje porazdeljuje v organsko fazo. Drugo hidroksilno skupino tritilno zaščitene tetraetilenglikola **5** smo aktivirali z uvedbo mezilatne skupine in spojino zreagirali s prebitnim piperazinom, s čimer smo dobili spojino **6** (48,49).

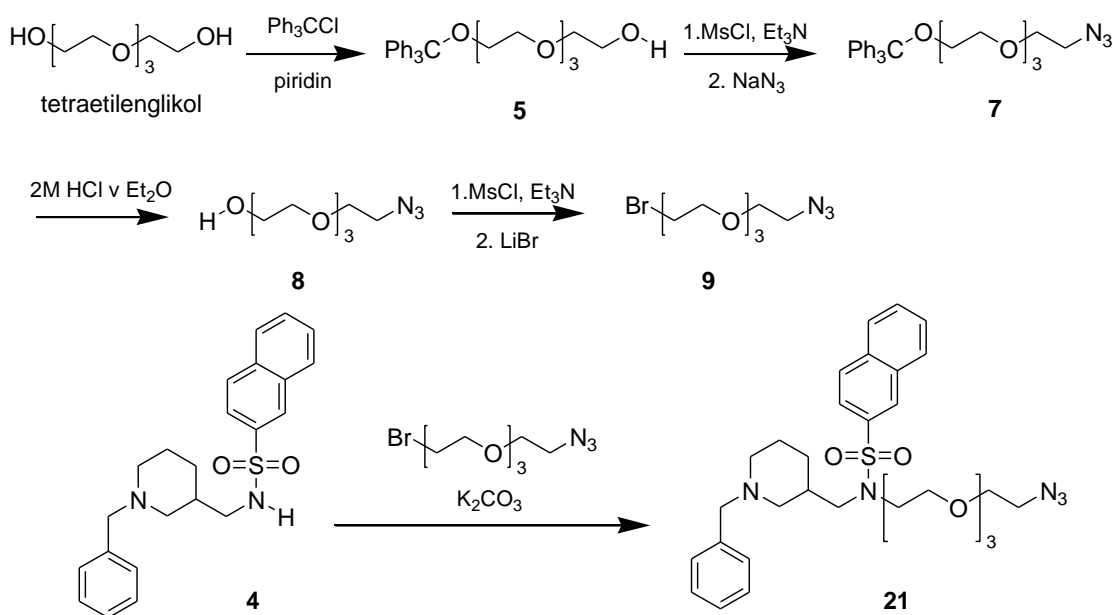
Fluorofor naše prve izbire je bil rodamin B, ki spada v skupino barvil s ksantenskim obročem. Izbrali smo ga zaradi ugodnih fotofizikalnih lastnosti. Rodaminski derivati so dobro topni v vodi in zelo fotostabilni, zato so pogosto uporabljeni pri označevanju in zaznavanju različnih spojin (50). Rodamin B smo pretvorili v kislinski klorid s pomočjo oksalil klorida in katalitično količino DMF (51). Nastali kislinski klorid je nato reagiral s spojino **6** do spojine **18**. Kljub čiščenju produkta na koloni, nam ni uspelo ločiti izhodnega rodamina, ki je v zmesi ostal po nepopolni pretvorbi v kislinski klorid ali hidrolizi kislinskega klorida. Zaradi majhnih količin produkta nismo poizkusili očistiti s prekristalizacijo, pri normalnofazni kolonski kromatografiji pa nismo bili uspešni. Rodamini posedujejo permanentni naboj, so v obliki soli, a so obenem tudi zelo lipofilni. Zaradi omenjenih lastnosti je čiščenje zelo zahtevno; za prekristalizacijo smo imeli premajhne količine, medtem ko so se derivati rodamina ob kolonski normalno fazni kromatografiji obnašali zelo neobičajno. Ločitev rodaminskih derivatov smo na TLC ploščicah uspeli doseči, a z isto mobilno fazo pri kolonski kromatografiji nismo bili uspešni. Kljub vsemu smo šli v naslednje stopnje z nečistim produktom, saj smo se nadejali, da bi končni produkt, katerega bi potrebovali le nekaj 10 mg, lahko očistili s normalnofazno preparativno kromatografijo. V naslednjem koraku smo poskušali odstraniti tritilno zaščito na terminalni hidroksilni skupini. Ker odščita tritilne skupine z 2M HCl v MeOH ni bila uspešna, smo jo poskusili odstraniti z železovim (III) kloridom (52). V prisotnosti FeCl₃ smo tritilno zaščitno skupino uspeli odstraniti. Pridobili smo spojino **19**, ki je še vedno vsebovala precej izhodnega rodamina B, katerega kljub čiščenju na koloni nismo uspeli odstraniti. Hidroksilno skupino spojine **19** smo prek aktivacije z mezilatom poskušali pretvoriti v bromidno skupino spojine **20** (48,49). Prek bromida smo namreč nameravali pripeti distančnik z vezanim rodaminom na sulfonamidni dušik spojine **4**. Ker uvedba bromida ni potekla najbolje, poleg tega pa je reakcijski produkt vseboval še sorazmerno veliko nezreagirane rodamina B, smo to sintezno pot opustili, čeprav je MS analiza pokazala nastanek reakcijskega produkta.



Slika 11: Reakcijska shema prvega sinteznega pristopa

Zaradi neuspeha pri prvi sintezni poti smo poskusili na sulfonamid **4** pripeti fluorofor s pomočjo ‚klik‘ kemije. Osredotočili smo se na reakcijo alkina z azidom, pri kateri se v prisotnosti katalitične količine bakrove (I) soli in šibke baze omenjeni skupini spojita v 1,2,3-triazol (**53**). Reakcijo odlikujejo mili reakcijski pogoji, visoki izkoristki, selektivnost in enostavno čiščenje reakcijskih produktov, zaradi česar je uporabna na številnih področjih kemijskih znanosti (**38**). Tudi pri tem pristopu smo izhajali iz enakih izhodnih spojin. Na sulfonamid **4** smo poskušali pripeti distančnik iz tetraetilenglikola z azidno skupino na terminalnem mestu, na katero bi kasneje pripeli modificiran rodamin B z alkinsko skupino. Tako kot v prvem pristopu smo sintezo linkerja začeli iz tetraetilenglikola, kateremu smo uvedli zaščitno tritilno skupino na eni hidroksilni skupini, s čimer smo dobili spojino **5** (**47**). Prosto hidroksilno skupino smo aktivirali z uvedbo mezilatne skupine, dobre izstopajoče skupine, ki smo jo z nukleofilno substitucijo enostavno zamenjali z azidom in dobili spojino **7** (**48,49**). V naslednji reakciji smo odstranili tritilno zaščitno hidroksilne skupine. Kot pri sintezi spojine **19** smo uporabili železov (III) klorid (**52**). Reakcija je uspešno potekla, vendar nam kljub čiščenju na koloni ni uspelo očistiti produkta. Tritilno zaščitno smo zato poskusili odstraniti z 2M HCl v dietil

etru in produkt **8** nam je po izbiri ustrezne mobilne faze uspelo očistiti s kolonsko kromatografijo. Prosto hidroksilno skupino spojine **8** smo nato aktivirali z uvedbo mezilata in na mestu hidroksilne skupine uvedli bromid, s čimer smo sintetizirali spojino **9** (48,49). Nastala spojina je tetraetilenglikol, ki ima na eni strani hidroksilno skupino zamenjano z azidom in na drugem koncu z bromidno funkcionalno skupino. Prek bromida smo nastali linker **9** v prisotnosti K_2CO_3 in pri povišani temperaturi uspeli pripeti na sulfonamidni dušik spojine **4**, s čimer smo pridobili spojino **21**, ki ima na strukturi izhodnega zaviralca BChE pripet tetraetilenglikolni distančnik s terminalno azidno skupino.



Slika 12: Reakcijska shema sinteze daljšega distančnika in njegovo pripenjanje na spojino **4**

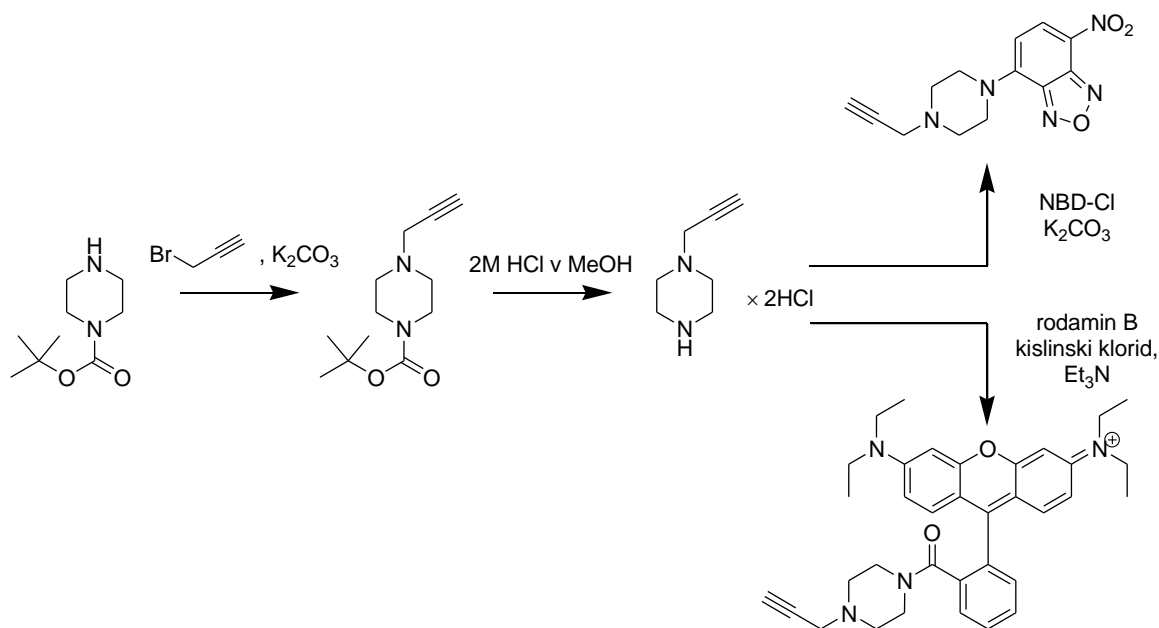
Na modificiran zaviralec **21** smo nato poskušali pripeti rodamin B. Zato je bila potrebna uvedba alkinske funkcionalne skupine v molekulo rodamina B. Alkinsko skupino smo na fluorofor uvajali prek piperazina, na dušik katerega smo predhodno uvedli propargilno skupino. Izhajali smo iz komercialno dostopnega 1-Boc-piperazina, katerega smo s propargil bromidom v prisotnosti K_2CO_3 pretvorili v spojino **14** (54). Nastalemu alkinu **14** smo nato odstranili Boc zaščitno skupino v kisljih pogojih (2M HCl v metanolu) in izolirali spojino **15** v obliki dikloridne soli.

Rodamin B smo pretvorili v kislinski klorid prek reakcije z oksalil kloridom v prisotnosti katalitične količine DMF (51). Neposredno po poteku reakcije smo reakcijski zmesi uparili topilo in presežek oksalil klorida ter poskušali kislinski klorid zreagirati s spojino **15** v prisotnosti Et_3N . Reakcija je sicer potekla, vendar precej rodamina B ni zreagiralo, najverjetneje zaradi nepopolne pretvorbe v kislinski klorid ali hidrolize

slednjega. Zato smo veliko truda vložili v čiščenje reakcijskega produkta **17**, da bi reakcijsko zmes očistili izhodnega rodamina B. Kljub temu, da smo produkt dvakrat čistili s kolonsko kromatografijo, nam ni uspelo odstraniti izhodnega rodamina B.

Izkoristek pripenjanja piperazina **15** smo poskušali izboljšati z dodatkom večjega prebitka oksalil klorida glede na rodamin B z namenom, da bi izboljšali pretvorbo karboksilne kisline v kislinski klorid. Čeprav smo pri reakciji uporabili 1,3 ekv. oksalil klorida, je sledeča reakcija s piperazinom **15** slabo potekla in reakcijskega produkta niti nismo poskušali očistiti. Ker pretvorba rodamina B v kislinski klorid z večjim prebitkom oksalil klorida ni doprinesla k učinkovitejšemu poteku reakcije, smo reakcijo poskusili izboljšati še s predhodno nevtralizacijo piperazinijeve soli. Spojina **15** je namreč v obliki dikloridne soli, zaradi česar je nukleofilnost dušika majhna. Pred reakcijo s kislinskim kloridom smo sicer pred dodatkom kislinskega klorida piperazinu **15** dodali prebitno količino Et_3N , ki pretvori amino skupini piperazina **15** v prosto obliko, poleg tega pa nevtralizira pri reakciji nastalo klorovodikovo kislino. Kljub predhodni nevtralizaciji piperazinijeve soli s kalcijevim hidridom nismo opazili signifikantnega izboljšanja reakcije. V reakcijski zmesi smo namreč še vedno zaznali veliko nezreagirane rodamina B, zaradi česar je izolacija reakcijskega produkta zelo težavna. Rodaminski alkin **17** smo nato poskusili očistiti še s preparativnim TLC, ki je primerna metoda čiščenja le za manjše količine reakcijskega produkta. Vendar nam tudi na preparativni TLC plošči ni uspelo doseči dobre ločitve reakcijskega produkta **17** od rodamina B. Izolirali smo sicer nekoliko čistejši produkt, ki je še vedno imel prisotno izhodno spojino.

Zaradi težav povezanih s sintetiziranjem alkinskega derivata rodamina B in njegovim pripenjanjem na modificiran zaviralec BChE, smo se odločili za uporabo drugega flourofora. Izbrali smo NBD-Cl, ki je derivat benzofurazana in postane fluorescenčen po substituciji klorida na mestu 4 z alifatskim aminom. Spojine z benzofurazanskim ogrodjem odlikujejo dobra reaktivnost in enostavnost uvedbe. Zato se veliko uporabljajo pri analitiki, predvsem za derivatizacijo aminov, ki nimajo ugodnih kromoforov ali so njihove koncentracije zelo nizke. Derivatizaciji sledi separacijska tehnika (npr. tekočinska kromatografija) in določitev koncentracije s fluorescenčnim detektorjem (55). Alkinski derivat piperazina **15** smo v prisotnosti K_2CO_3 pri sobni temperaturi enostavno pripeli na NBD-Cl, s čimer smo sintetizirali spojino **16** (56). Reakcija je dobro potekla in dodatno čiščenje na koloni ni bilo potrebno.

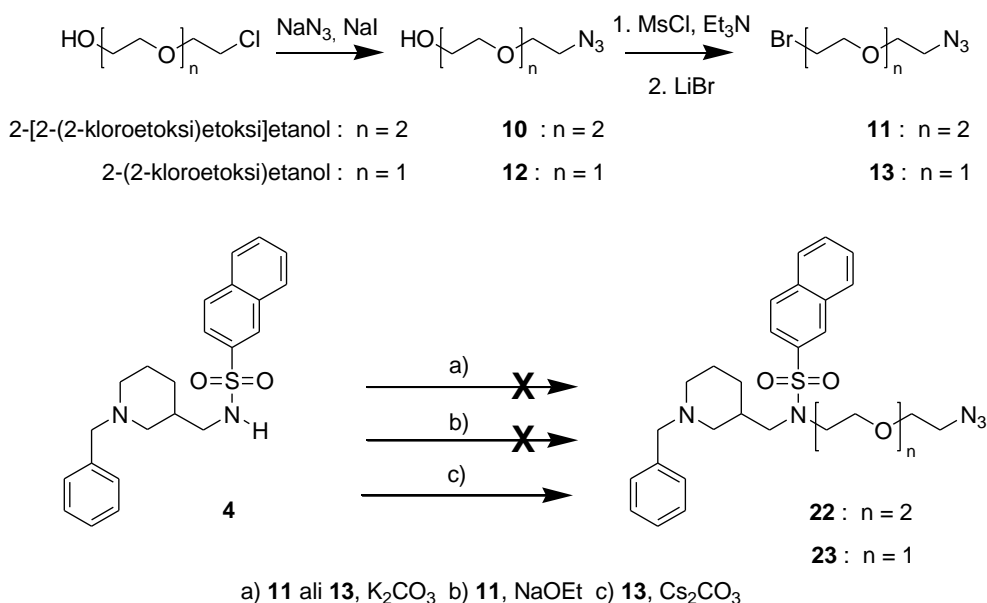


Slika 13: Reakcijska shema sinteze za ‚klik‘ prirejenih fluoroforov

Kljub neuspešni izolaciji rodaminskega alkina **17** smo nečisti produkt poskusili zreagirati s prej pripravljenim azidom **21**. Upali smo na znatno spremembo retencijskega faktorja tako nastale spojine, zaradi česar bi lahko končni produkt očistili izhodnega rodamina B. ‚Klik‘ reakcija spojitve terminalnega azida in alkina v prisotnosti bakrovih (I) ionov v 1,4-disubstituiran triazol je dobro opisana in v literaturi najdemo različne izvedbe omenjene reakcije. Reakcijo med spojinama **17** in **21** smo izvedli z bakrovim bromidom v vlogi katalizatorja v prisotnosti *N*-metilmorfolina, ki sodeluje pri katalizi (53). Reakcija v nasprotju s pričakovanji ni potekla uspešno. Pogoje reakcije smo še preverili z reakcijo fenilacetilena z azidom **21**, vendar tudi uspešnost te reakcije ni bila gotova. Možno je, da je reakcija dejansko potekla, vendar produkta reakcije nismo zaznali zaradi slabe ločitve od izhodnih spojin. Interpretacija TLC kromatogramov rodaminskih derivatov je namreč težavna; rodamin je kation, ki je kljub temu še vedno lipofilen. Zato je predvsem čiščenje zelo oteženo; pri kromatografiji so skoraj vedno prisotne razvlečene lise, poleg tega je pa intenzivno rdeče obarvan in pušča sledi na vseh površinah, ki pridejo z njim v stik.

Zaradi neuspešne ‚klik‘ reakcije alkinskega derivata rodamina B in pomanjkanja spojine **21** smo se znova lotili priprave linkerja, prek katerega bi povezali molekuli zaviralca in fluorofora. Tokrat smo sintezno pot začeli z 2-[2-(2-kloroetoksi)etoksi]etanolom, ki je komercialno dostopen trietilenglikolni derivat. Z njegovo uporabo smo skrajšali sintezno pot, ker predhodna uvedba zaščitne skupine in njena kasnejša odstranitev ni bila potrebna. Najprej smo sintetizirali spojino **10** prek

nukleofilne substitucije z natrijevim azidom (57). Nato smo po večkrat uporabljenem postopku prek mezilata uvedli bromid na mestu hidroksilne skupine spojine **10** (48). Nastali linker **11** smo nato prek bromida pripenjali na zaviralec **4**. Za to reakcijsko stopnjo smo preizkusili dvoje različnih pogojev, pri čemer smo spreminjali bazo s katero smo poskušali odcepiti proton z rahlo kislega sulfonamidnega dušika spojine **4**. Reakcijo smo najprej poskusili izvesti s K_2CO_3 po enakem postopku kot pri sintezi spojine **21** in nato še z raztopino natrijevega etoksida v etanolu. Obe reakciji sta slabo potekli. Na TLC plošči smo sicer zaznali novo liso, ki bi lahko bila zelen produkt, vendar smo v reakcijski zmesi opazili še veliko količino izhodnih spojin **4** in **11**.

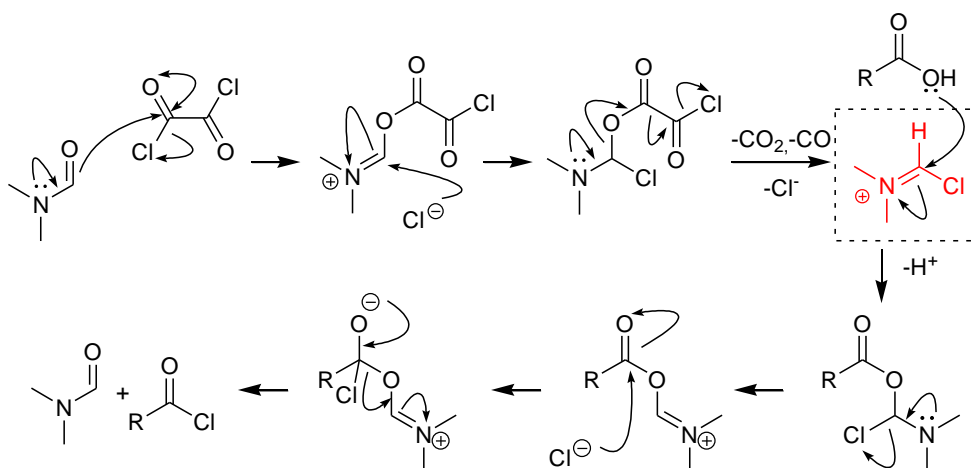


Slika 14: Reakcijska shema sinteze krajšega distančnika in njegovo pripenjanje na spojino **4**.

Distančnik **11** smo hranili pri sobni temperaturi in kmalu opazili spremembo barve iz rahlo rumene v rjavo. Najverjetneje je pri shranjevanju nastajal HBr, ki lahko cepi etrne vezi. Ker je bil produkt neuporaben za nadaljnje reakcije, smo ponovno sintetizirali nov linker po istem postopku, kot smo sintetizirali distančnik **11**. Tokrat smo izhajali iz komercialno dostopnega 2-(2-kloroetoksi)etanol, ki je cenejši kot trientilenglikolni derivat. Dobili smo krajši distančnik **13** s terminalno azidno in bromidno funkcionalno skupino na enem in drugem koncu. Poskušali smo ga pripeti na zaviralec **4** po podobnem postopku kot pri sintezi spojine **21**. Kot bazo smo uporabili K_2CO_3 , vendar je reakcija slabo potekla kljub povišani temperaturi. Zato smo po posvetu s kolegi K_2CO_3 zamenjali s Cs_2CO_3 , ki je šibka baza, a je posebej uporabna v organski sintezi zaradi dobre topnosti v organskih topilih (58). Reakcija je tokrat potekla bolje in po čiščenju smo izolirali spojino **23**.

5.2 Pripenjanje piperazinskega derivata na fluorofor

Pri sintezi fluorescenčno označenega zaviralca nam je največ težav povzročalo pripenjanje 1-(prop-2-in-1-il)piperazinijevega klorida (**15**) na molekulo rodamina B. Rodamin B ima v strukturi karboksilno skupino vezano na fenilnem obroču na mestu 2, katero smo poskušali pretvoriti v kislinski klorid. Kislinski kloridi so namreč zelo reaktivni elektrofilni zaradi elektronegativnega kloridnega iona in enostavno reagirajo z nukleofili. Kislinski klorid rodamina B smo pripravljali z majhnim prebitkom oksalil klorida in katalitično količino DMF v raztopini DCM (51). Reakcijsko zmes smo med dodajanjem oksalil klorida ohlajali na ledeni kopeli. Pri reakciji oksalil klorida z DMF nastane iminijev intermediat in sprostita se CO₂ in CO. Tudi mi smo opazili izhajanje plina. Iminijev intermediat nato reagira s karboksilno kislino in jo pretvori v kislinski klorid, pri čemer se katalizator reakcije regenerira.



Slika 15: Mehanizem nastanka iminijevega intermediiata in reakcija le-tega s karboksilno kislino.

Po koncu reakcije smo pod znižanim tlakom odstranili nezreagiran reagent in kislinski klorid takoj uporabili pri reakciji s piperazinom **15** v prisotnosti Et₃N. Piperazinski derivat **15** ima dve amski skupini, pri čemer je na mestu 1 terciarni amin in na mestu 4 sekundarni amin. Sekundarni amin je dober nukleofil, ki enostavno vstopa v nukleofilni napad na elektrofilni ogljikov atom kislinskega klorida. Za potek reakcije je potreben dodatek baze, ki pretvori alkin **15** iz dikloridne soli v prost amin in nevtralizira pri reakciji sproščeno klorovodikovo kislino. Izkoristek reakcije ni bil dober, vendar je največjo težavo predstavljal ostanek rodamina B, ki ga nismo uspeli popolnoma odstraniti. Preizkusili smo številne mobilne faze za kolonsko kromatografijo, a neuspešno.

Zaradi težav s čiščenjem produkta **17** smo reakcijo poskušali optimizirati, da bi v reakcijski zmesi ostalo čim manj izhodne spojine. Pretvorbo rodamina B v pripadajoč

kislinski klorid smo poskušali izboljšati z uporabo prebitne količine oksalil klorida. Reakcijo smo izvedli po enakem postopku, le da smo tokrat uporabili 1,3 ekvivalente oksalil klorida.

Ker reakcija rodamina B s prebitkom oksalil klorida ni bistveno izboljšala izkoristka reakcije smo posumili, da je razlog za neuspešne reakcije v piperazinskem derivatu. Piperazin **15** je namreč v obliki dikloridne soli, zaradi česar sta aminske skupini slabo reaktivni. Kot bazo smo sicer dodali prebitno količino Et_3N , vendar bi lahko izmenjava klorida potekla prepočasi. Zato smo piperazinu **15** dodali prebitno količino CaH_2 in reakcijsko zmes zaščitili pred zračno vlago. Opazili smo izhajanje plina. Pri reakciji se namreč piperazinijeva sol nevtralizira, nastane kalcijev klorid in sprosti se vodik. Prednost kalcijevega hidrida je v tem da je sam netopen v DCM, kakor tudi nastali CaCl_2 , oba smo odstranili iz reakcijske zmesi s filtracijo. V filtratu je ostal raztopljen piperazin **15**, ki smo ga takoj uporabili v reakciji, vendar tudi tokrat nismo opazili bistvenega izboljšanja reakcije.

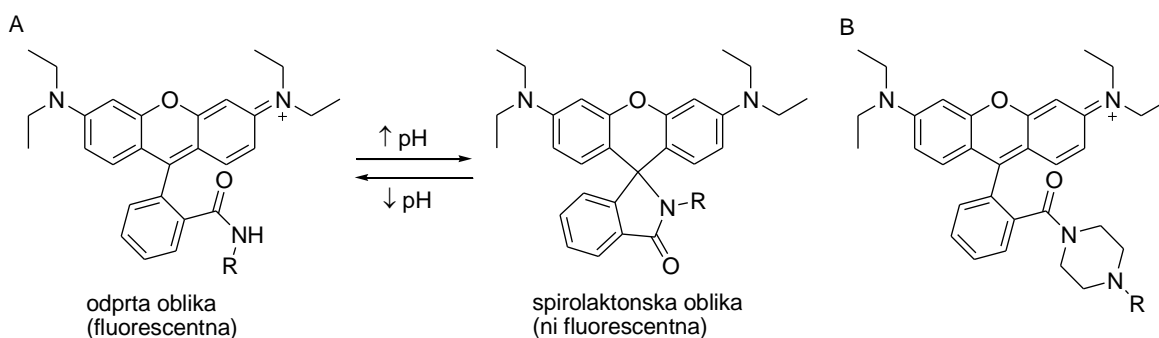
Produkt **17** smo poskusili očistiti tudi s preparativnim TLC, vendar nam tudi v tem primeru ni uspelo zagotoviti zadovoljive ločitve reakcijskega produkta od izhodne spojine.

V literaturi najdemo veliko primerov sintetiziranja rodaminskih derivatov za uporabo pri označevanju posameznih bioloških tarč ali kot kemosenzorje za različne kovinske ione. Velika večina teh spojin je v obliki spirolaktona, ki se tvori med karboksilno skupino na mestu 2 fenilnega obroča in ksantenskim ogljikom na mestu 9. Molekula rodamina v obliki spirolaktona ni fluorescenčna, fluorescira pa po odprtju obroča, zaradi česar je takšna struktura uporabna v različnih aplikacijah, kjer odprtje obroča in posledično fluorescenco povzroči sprememba pH v kislo območje ali prisotnost kovinskih kationov (50). Spirolaktonsko obliko bi bilo lažje čistiti, ker slednja nima naboja, vendar to v našem primeru ni prišlo v poštev, ker nismo želeli preklopa med fluorescenčno in nefluorescenčno obliko. Tudi zato smo uporabili sekundarni amin, ki ne tvori spirolaktonske oblike.

V literaturi smo našli zgolj nekaj primerov sinteze terciarnih amidov rodaminskih derivatov na mestu 2 fenilnega obroča. V prvem primeru so po tvorbi laktonskega obroča v bazičnih pogojih tega zreagirali s prebitkom piperazina v prisotnosti AlMe_3 (50). Zaradi piroforičnih lastnosti trimetilaluminija, ki zahtevajo izkušeno rokovanje, se za poskus te reakcije nismo odločili. V ostalih primerih so reakcijo pripenjanja izvajali s pomočjo sklopitvenih reagentov, kot sta HATU in HBTU (50,59). Tega pristopa se nismo poslužili,

ker ponavadi s sklopitvenimi reagenti reakcije tvorbe amida potečejo še s slabšimi izkoristki, kot s kislinskimi kloridi. Pretvorbo karboksilne kisline rodamina B v kislinski klorid bi lahko izvedli tudi s pomočjo drugih halogenirajočih sredstev kot so SOCl_2 , PCl_3 ali PCl_5 .

Vzrok slabe reaktivnosti na mestu karboksilne skupine rodamina B je morda sterična oviranost tega mesta. Mesto je namreč postavljeno med dva obroča, zaradi česar je dostop reagentov do tega mesta omejen. Zanimivo bi bilo poskusiti reakcijo s pripenjanjem distančnika na bolj izpostavljeni mesti 4 in 5 fenilnega obroča.



Slika 16: Odprta in spiro-laktonska oblika primarnega amida rodamina B (A) ter terciarni amid rodamina B, ki ne more tvoriti spiro-laktona in pri vseh fiziološko relevantnih pH vrednostih fluorescira (B).

Zaradi težav s pripenjanjem piperazina **15** na karboksilno skupino rodamina B smo se odločili za zamenjavo fluorofora. Izbrali smo NBD-Cl, ki je derivat benzofurazana, slednjega pa odlikuje dobra reaktivnost z alifatskimi amini. Spojino **16** smo enostavno sintetizirali z reakcijo piperazina **15** in NBD-Cl v prisotnosti K_2CO_3 . Klorid na mestu 4 benzofurazanskega obroča je zaradi elektron-privlačne nitro skupine na mestu 7 aktiviran, zaradi česar NBD-Cl enostavno vstopa v nukleofilno aromatsko substitucijo. Dodatek baze nevtralizira klorovodikovo kislino, ki nastane pri reakciji.

5.3 Pripenjanje distančnika na sulfonamid **4**

Na sulfonamid **4** smo pripenjali pripravljene distančnike (**9**, **11**, **13**) na mesto sulfonamidnega dušika. Pripravljene distančniki so imeli terminalno bromidno in azidno skupino. Razlikovali so se v številu etilenglikolnih enot. Dušik sulfonamida **4** je rahlo kisel, zato lahko v bazičnih pogojih z njega odcepimo proton. Po odcepcitvi protona nastane sulfonamidni anion, ki je stabiliziran z delokalizacijo naboja na kisikova atoma sulfonamidne skupine. Nastali anion je nukleofil in lahko napade elektrofilni ogljikov

atom distančnika, na katerega je vezan brom, ki je dobro izstopajoča skupina. Reakcijo pripenjanja smo najprej izvajali s spojino **9** pri 50°C v ACN ob prisotnosti prebitne količine K₂CO₃. Reakcija pri tej temperaturi ni potekla in je potekla šele po dvigu temperature na 80°C. Sintetizirali smo spojino **21**, ki smo jo nato uporabili v reakciji z rodaminskim alkinom **17**, a slednja reakcija ni uspešno potekla.

Ker nismo bili povsem prepričani v ustreznost pripojitve distančnika **9** na zaviralec **4**, smo reakcijo sintetiziranja spojine **22** izvajali po enakem postopku, vendar reakcijske zmesi tokrat nismo segrevali na 80°C. Pripenjanje linkerja **11** tokrat ni bilo uspešno. Zato smo ga poskušali pripeti tudi s pomočjo natrijevega etoksida v etanolu. Raztopino etoksida smo pripravili neposredno pred reakcijo. Reakcijo med spojinama **11** in **4** smo izvajali pri sobni temperaturi, a reakcija ni potekla. Morebiten vzrok neuspešnega poteka reakcij bi lahko tičal v neustrezno pripravljenem linkerju **11**. Z aktivacijo hidroksilne skupine prek uvedbe mezilata in posledično substitucijo z bromidom smo večkrat imeli dobre uspehe, zato je neustreznost linkerja malo verjetna. Morda je vzrok neuspešnega poteka reakcije prenizka temperatura reakcijske zmesi, kajti pri sintezi spojine **21** je reakcija potekla šele po segrevanju zmesi na 80°C. Pri nižji temperaturi je topnost izhodnih spojin in kalijevega karbonata slabša, kar bi lahko botrovalo neuspeli sintezi.

Natrijev etoksid je močna baza, ki je zmožna odcepitve rahlo kislega protona na sulfonamidnem dušiku spojine **4**. Računalniško izračunan pK_a sulfonamidnega dušika je 10,1 in etoksida 15,5, zaradi česar je deprotonacija spojine **4** na mestu dušika gotova (60,61). Vzrok neuspešnega poteka reakcije bi lahko bila slaba topnost spojine **4** v etanolu. Kljub temu, da pri odcepitvi protona nastane natrijeva sol, njeno topnost omejujeta lipofilni naftalenska in fenilna skupina. Na žalost reakcije nismo poskusili pri višji temperaturi. Z višanjem temperature se topnost spojin veča in reakcija bi morda pri višji temperaturi bolje potekla zaradi večjega števila trkov med reaktanti.

Pri sintezi spojine **23** smo še enkrat poskusili izvesti reakcijo z dvema ekvivalentoma K₂CO₃ v ACN pri 60°C. Ker je reakcija po enem dnevu slabo potekla, smo reakcijski zmesi dodali še katalitično količino natrijevega jodida. Jodid je namreč dober nukleofil, ki izvrši nukleofilno substitucijo bromida. Pri tem dobimo boljše izstopajočo skupino in reakcija hitreje steče. Po reakciji se jodid regenerira. Tudi po dodatku jodida, reakcija ni dobro potekla. Zaradi neuspeha pri sintezi spojine **23** smo poskusili še z novimi reakcijski pogoji. Tokrat smo kot bazo uporabili Cs₂CO₃, ki je šibka baza. Za razliko od

ostalnih karbonatov je Cs_2CO_3 bolje topen v organskih topilih (58,62). Reakcija, ki smo jo izvajali pri 60°C , je tokrat bolje potekla s končnim izkoristkom 56%.

5.4 Ovrednotenje fluorescenčno označenega zaviralca **24**

Po težavah s sintezo pripenjanja rodamina B na sulfonamid **4** nam je uspelo sintetizirati zaviralec fluorescenčno označen z NBD **24**. Končni spojini smo posneli NMR spekter in masni spekter, s katerimi smo potrdili njeno strukturo. Interpretacija NMR spektra spojine je bila nekoliko otežena zaradi same strukture spojine. Ta vsebuje dva nearomatska obroča, zaradi česar spojina obstaja v velikem številu konformacij, ki se ne izpovprečujejo dovolj hitro in pri NMR dobimo spekter več različnih konformerov. Kljub temu smo uspeli iz spektra potrditi strukturo končne spojine.

Končno spojino smo pretvorili v dikloridno sol, da smo izboljšali topnost spojine, tej pa so določili še zaviralno sposobnost za encim BChE. Ugotovili smo, da smo z vezavo fluorofora prek distančnika na spojino **4** dobili spojino z $\text{IC}_{50} = 214.16 \pm 5.68 \text{ nM}$ na BChE, pri čemer je aktivnost AChE ostala nespremenjena. Slednji rezultat nam pove, da je spojina sicer selektivna na BChE, a je glede na aktivnosti ostalih sulfonamidnih derivatov slabše aktivna. Za primerjavo, najboljši zaviralec iz serije sulfonamidov je imel $\text{IC}_{50} = 5 \text{ nmol/L}$. Zaradi slabe zaviralne sposobnosti spojine **24** nismo preizkusili pri barvanju možganskih rezin, kot smo sprva nameravali. Pri barvanju rezin bi morali uporabiti vsaj 100-krat večjo koncentracijo kot je IC_{50} , če bi želeli doseči, da je na večino encima BChE vezan inhibitor. Verjetno, bi nam slednje onemogočila že nespecifična vezava zaviralca na možgansko rezino, ki bi jo pri tako visoki koncentraciji lahko pričakovali (63).

Vezava velikega fragmenta na molekulo zaviralca ni prispevala k tvorbi pozitivnih interakcij zaviralca z encimom. Inhibitor, ki nam je bil za osnovo pri načrtovanju fluorescenčno označenega inhibitorja, je že zelo optimizirana spojina; v seriji sulfonamidov so namreč raziskovalci s Fakultete za farmacijo pripravili preko 80 analogov in dobro opisali povezavo med strukturo in aktivnostjo (35). Pri tako optimizirani spojini to pomeni, da zelo verjetno že manjše spremembe v strukturi privedejo do padca zaviralne aktivnosti, v kolikor nova spojina ne tvori dodatne interakcije s tarčo. Če predpostavimo, da vezava spojine **24** v aktivno mesto ostane nespremenjena, sta pripeta distančnik in fluorofor kriva za zmanjšanje aktivnosti. Očitno ta del ne tvori dodatnih interakcij ob vezavi na tarčo, ki bi kompenzirale zmanjšanje prostostnih stopenj spojine **24** in odstranitev vode iz površine molekule liganda in encima. Distančnik s fluoroforom lahko v

raztopini zavzame ogromno možnih konformacij, katerih nabor se zoži ob vezavi v aktivno mesto (64). Poleg tega smo načrtovali distančnik tako, da bi slednji prispeval k vodotopnosti, kar pa ima negativen vpliv ob vezavi na tarčo, ko se mora voda odstraniti s površine. V primeru, da je distančnik lipofilen, pa je več možnosti za nespecifične interakcije z lipofilnimi deli možganskih struktur. Zaradi neobetavnih rezultatov spojine **24**, smo ocenili, da je nadaljnje razvijanje fluorescenčno označenega zaviralca BChE po zastavljenem načrtu nesmiselno. Smiselno bi bilo načrtovanje iz inhibitorja z nižjo IC_{50} , kot jo je imel inhibitor na podlagi katerega smo načrtovali mi. V tem primeru bi npr. ob enaki relativni izgubi aktivnosti, še vedno imeli spodoben zaviralec. Poleg tega bi bilo smiselno optimizirati dolžino distančnika, tako da izguba prostostnih stopenj ob vezavi zaviralca ne bi bila tako velika. Lahko bi tudi izhajali iz ireverzibilnega zaviralca. Takšen bi z encimom tvoril kovalentno vez, zaradi česar bi lahko možganske rezine intenzivneje spirali in omejili vpliv nespecifične vezave zaviralca na rezino.

6 SKLEP

Za potrebe razvoja nove metode za detekcijo BChE na možganskih rezinah smo načrtovali, sintetizirali in ovrednotili selektiven fluorescenčno označen zaviralec BChE **24**. Izhajali smo iz optimiziranega zaviralca **2** s srednjo zaviralno koncentracijo 5 nM. Na podlagi vezave zaviralca v aktivno mesto encima smo na mestu alkilne verige zaviralca **2** uvedli hidrofilen distančnik, ki smo ga priredili za ‚klik‘ reakcijo z modificiranim fluoroforom NBD. Uvedba NBD v molekulo zaviralca je povzročila veliko zmanjšanje sposobnosti zaviranja BChE (srednja zaviralna koncentracija 214.16 ± 5.68 nM), zaradi česar spojine nismo preizkusili za označevanje BChE na možganskih rezinah, kot smo načrtovali. Za barvanje rezin bi namreč morali uporabiti visoko koncentracijo zaviralca, kar bi najverjetneje povzročilo nespecifično vezavo spojine **24** na rezino.

Pri sintezi fluorescenčno označenih analogov spojine **2** smo naleteli na večje število ovir, zaradi česar nam je uspelo sintetizirati zgolj eno spojino. Največ težav nam je povzročila sinteza zaviralcev, katere smo neuspešno poskušali označiti z rodaminom B, predvsem zaradi težavnega čiščenja sintetiziranih spojin. Rodamin B smo izbrali, da bi zmanjšali vezavo fluorescenčno označenih spojin na hidrofobne sestavine možganskih rezin, vendar se je sinteza izkazala za problematično, zato smo kot fluorofor uporabili NBD. Kljub neuspešni sintezi večjega števila spojin, smo uspeli razviti sintezno pot za sintezo fluorescenčno označenih zaviralcev BChE na osnovi zaviralca **2**, vendar smo ocenili, da je nadaljnje razvijanje takšnih zaviralcev po izbrani poti nesmiselno.

7 VIRI

1. WHO: Dementia Fact Sheet. 2016. Dostopno 22.12.2016 na <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/en/>.
2. Duthey B: Background paper 6.11: Alzheimer disease and other dementias. Public Health Approach Innov. 2013; 1–74.
3. Scheltens P, Blennow K, Breteler MMB, de Strooper B, Frisoni GB, Salloway S, et al: Alzheimer's disease. The Lancet. 2016; 388(10043): 505–17.
4. Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK: The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. J Neurol Neurosurg Amp Psychiatry. 1999; 66(2): 137-147.
5. Praprotnik D. Alzheimerjeva bolezen–uganka staranja Alzheimer's disease–an enigma of old age. MED RAZGL. 1995; 34: 211–223.
6. Shiel WC: Dementia, Alzheimer's, and Aging Brains. WebMD: 2016. Dostopno 7.1.2017 na http://www.onhealth.com/content/1/dementia_memory_brain_disorder.
7. Perrin RJ, Fagan AM, Holtzman DM: Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease. Nature. 2009; 461(7266): 916–22.
8. Villemagne VL, Okamura N: Tau imaging in the study of ageing, Alzheimer's disease, and other neurodegenerative conditions. Curr Opin Neurobiol. 2016; 36: 43–51.
9. Roy R, Niccolini F, Pagano G, Politis M: Cholinergic imaging in dementia spectrum disorders. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2016; 43(7): 1376–86.
10. Yang Y, Zhang X, Cui M, Zhang J, Guo Z, Li Y, et al: Preliminary Characterization and In Vivo Studies of Structurally Identical 18F- and 125I-Labeled Benzyloxybenzenes for PET/SPECT Imaging of β -Amyloid Plaques. Sci Rep. 2015; 5: 12084.
11. Reid GA, Darvesh S: Butyrylcholinesterase-knockout reduces brain deposition of fibrillar β -amyloid in an Alzheimer mouse model. Neuroscience. 2015; 298: 424–35.
12. Racchi M: Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules. Pharmacol Res. 2004; 50(4): 441–51.
13. Grossberg GT: Cholinesterase Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease: Curr Ther Res. 2003; 64(4): 216–35.
14. Mudher A, Lovestone S: Alzheimer's disease–do tauists and baptists finally shake hands? Trends Neurosci. 2002; 25(1): 22–26.
15. Bruno D: Amyloid plaques and neurofibrillary tangles. Dostopno 17.2.2017 na http://thebrain.mcgill.ca/flash/d/d_08/d_08_cl/d_08_cl_alz/d_08_cl_alz.html.

16. Teich A: Featured research. Columbia University Medical Center: 2011. Dostopno 20.2.2017 na <http://www.cumc.columbia.edu/dept/taub/res-featured-9-2015.html#top>.
17. Giacobini E: Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacol Res.* 2004; 50(4): 433–40.
18. Perry EK, Perry RH, Blessed G, Tomlinson BE: Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1978; 4(4): 273–7.
19. Coyle J, Kershaw P: Galantamine, a cholinesterase inhibitor that allosterically modulates nicotinic receptors: effects on the course of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry.* 2001; 49(3): 289–299.
20. Guillozet AL, Mesulam M-M, Smiley JF, Mash DC: Butyrylcholinesterase in the life cycle of amyloid plaques. *Ann Neurol.* 1997; 42(6): 909–918.
21. Reisberg B, Doody R, Stöffler A, Schmitt F, Ferris S, Möbius HJ: Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2003; 348(14): 1333–1341.
22. Waymire JC: Acetylcholine neurotransmission. McGovern Medical School: 2000. Dostopno 14.12.2016 na <http://nba.uth.tmc.edu/neuroscience/s1/chapter11.html>.
23. Darvesh S, Hopkins DA, Geula C: Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat Rev Neurosci.* 2003; 4(2): 131–8.
24. Nicolet Y: Crystal Structure of Human Butyrylcholinesterase and of Its Complexes with Substrate and Products. *J Biol Chem.* 2003; 278(42): 41141–7.
25. Colovic MB, Krstic DZ, Lazarevic-Pasti TD, Bondzic AM, Vasic VM: Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol.* 2013; 11(3): 315–335.
26. Colletier J-P, Fournier D, Greenblatt HM, Stojan J, Sussman JL, Zaccai G, et al: Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase. *EMBO J.* 2006; 25(12): 2746–2756.
27. Lockridge O: Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacol Ther.* 2015; 148: 34–46.
28. Brus B, Košak U, Turk S, Pišlar A, Coquelle N, Kos J, et al: Discovery, Biological Evaluation, and Crystal Structure of a Novel Nanomolar Selective Butyrylcholinesterase Inhibitor. *J Med Chem.* 2014; 57(19): 8167–79.
29. Greig NH, Utsuki T, Yu Q, Zhu X, Holloway HW, Perry T, et al: A New Therapeutic Target in Alzheimer's Disease Treatment: Attention to Butyrylcholinesterase. *Curr Med Res Opin.* 2001; 17(3): 159–65.
30. Darvesh S: Butyrylcholinesterase radioligands to image Alzheimer's disease brain. *Chem Biol Interact.* 2013; 203(1): 354–7.

31. Naik NT: Technical variations in Koelle's histochemical method for demonstrating cholinesterase activity. *J Cell Sci.* 1963; 3(65): 89–100.
32. Malmgren H, Sylvén B: On the chemistry of the thiocholine method of Koelle. *J Histochem Cytochem.* 1955; 3(6): 441–5.
33. Koelle GB, Friedenwald JS: A histochemical method for localizing cholinesterase activity. *Exp Biol Med.* 1949; 70(4): 617–622.
34. Karnovsky MJ, Roots L: A 'direct-coloring' thiocholine method for cholinesterases. *J Histochem Cytochem.* 1964; 12(3): 219–21.
35. Košak U, Brus B, Knez D, Šink R, Žakelj S, Trontelj J, et al: Development of an in-vivo active reversible butyrylcholinesterase inhibitor. *Sci Rep.* 2016; 6: 39495.
36. Aragão-Leoneti V, Campo VL, Gomes AS, Field RA, Carvalho I: Application of copper(I)-catalysed azide/alkyne cycloaddition (CuAAC) 'click chemistry' in carbohydrate drug and neoglycopolymers synthesis. *Tetrahedron.* 2010; 66(49): 9475–92.
37. Best MD: Click Chemistry and Bioorthogonal Reactions: Unprecedented Selectivity in the Labeling of Biological Molecules. *Biochemistry (Mosc).* 2009; 48(28): 6571–84.
38. Kolb HC, Sharpless KB: The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discov Today.* 2003; 8(24): 1128–1137.
39. Karoli T, Mamidyala SK, Zuegg J, Fry SR, Tee EHL, Bradford TA, et al: Structure aided design of chimeric antibiotics. *Bioorg Med Chem Lett.* 2012; 22(7): 2428–33.
40. Zeng D, Zeglis BM, Lewis JS, Anderson CJ: The Growing Impact of Bioorthogonal Click Chemistry on the Development of Radiopharmaceuticals. *J Nucl Med.* 2013; 54(6): 829–32.
41. Lewis WG, Green LG, Grynszpan F, Radić Z, Carlier PR, Taylor P, et al: Click Chemistry In Situ: Acetylcholinesterase as a Reaction Vessel for the Selective Assembly of a Femtomolar Inhibitor from an Array of Building Blocks. *Angew Chem Int Ed.* 2002; 41(6): 1053–7.
42. Lutz J, Zarafshani Z: Efficient construction of therapeutics, bioconjugates, biomaterials and bioactive surfaces using azide–alkyne 'click' chemistry. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60(9): 958–70.
43. Neef AB, Schultz C: Selective Fluorescence Labeling of Lipids in Living Cells. *Angew Chem Int Ed.* 2009; 48(8): 1498–500.
44. Marks IS, Kang JS, Jones BT, Landmark KJ, Cleland AJ, Taton TA: Strain-Promoted 'Click' Chemistry for Terminal Labeling of DNA. *Bioconjug Chem.* 2011; 22(7): 1259–63.
45. McKennon MJ, Meyers AI, Drauz K, Schwarm M: A convenient reduction of amino acids and their derivatives. *J Org Chem.* 1993; 58(13): 3568–71.

46. Clayden J, Greeves N, Warren S: *Organic Chemistry*. 2. izdaja, Oxford University Press, Oxford, 2012: 348-9.
47. Chen Y, Baker GL: Synthesis and Properties of ABA Amphiphiles. *J Org Chem*. 1999; 64(18): 6870–3.
48. Bondia AM, Larcher N, Garrelly L, Rossi JC, Pascal R: Synthesis and ligation ability of mono-aminooxy-functionalized dendrigraft poly-L-lysine (DGL). *Tetrahedron Lett*. 2010; 51(25): 3330–3.
49. Sorrell T: *Organic Chemistry*, 2. izdaja, University Science Books, Sausalito, 2006: 213-14.
50. Beija M, Afonso CAM, Martinho JMG: Synthesis and applications of Rhodamine derivatives as fluorescent probes. *Chem Soc Rev*. 2009; 38(8): 2410.
51. Srinivasan R, Tan LP, Wu H, Yang P-Y, Kalesh KA, Yao SQ: High-throughput synthesis of azide libraries suitable for direct 'click' chemistry and in situ screening. *Org Biomol Chem*. 2009; 7(9): 1821.
52. Ding X, Wang W, Kong F: Detritylation of mono- and di-saccharide derivatives using ferric chloride hydrate. *Carbohydr Res*. 1997; 303(4): 445–8.
53. Pajk S, Garvas M, Štrancar J, Pečar S: Nitroxide–fluorophore double probes: a potential tool for studying membrane heterogeneity by ESR and fluorescence. *Org Biomol Chem*. 2011; 9(11): 4150.
54. Khatuya H, Hutchings RH, Kuo G-H, Pulito VL, Jolliffe LK, Li X, et al: Arylpiperazine substituted heterocycles as Selective α 1a adrenergic antagonists. *Bioorg Med Chem Lett*. 2002;12(17):2443–6.
55. Elbashir AA, Suliman FEO, Aboul-Enein HY: The Application of 7-Chloro-4-nitrobenzoxadiazole (NBD-Cl) for the Analysis of Pharmaceutical-Bearing Amine Group Using Spectrophotometry and Spectrofluorimetry Techniques. *Appl Spectrosc Rev*. 2011; 46(3): 222–41.
56. Mistri T, Alam R, Dolai M, Mandal SK, Khuda-Bukhsh AR, Ali M: A 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole based highly sensitive and selective turn-on chemosensor for copper(ii) ion with intracellular application without cytotoxicity. *Org Biomol Chem*. 2013; 11(9): 1563.
57. Iyer SS, Anderson AS, Reed S, Swanson B, Schmidt JG: Synthesis of orthogonal end functionalized oligoethylene glycols of defined lengths. *Tetrahedron Lett*. 2004; 45(22): 4285–8.
58. Lehmann F: Cesium carbonate (Cs_2CO_3). *Synlett*. 2004; 2004(13): 2447–2448.
59. Chen Y-J, Jin S, Xi J, Yao Z-J: New cytotoxic annonaceous acetogenin mimetics having a nitrogen-heterocyclic terminal and their application to cell imaging. *Tetrahedron*. 2014;70(33):4921–8.

60. Lide DR: CRC handbook of chemistry and physics: a ready-reference book of chemical and physical data. 85. izdaja. CRC Press, Boca Raton, 2004.
61. Chemicalize [računalniška aplikacija]. Budimpešta: Chemaxon. Dostopno 20.12.2016 na: <https://chemicalize.com>
62. Ramalingam V, Kwee SK, Ryno LM, Urbach AR: A cucurbit[8]uril sponge. *Org Biomol Chem.* 2012; 10(43): 8587–9.
63. Jelenko A: Razvoj metode za detekcijo aktivnosti in zaviranja butirilholin-esteraze na možganskih rezinah. Magistrska naloga, Ljubljana, 2015: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo
64. Bissantz C, Kuhn B, Stahl M: A Medicinal Chemist's Guide to Molecular Interactions. *J Med Chem.* 2010; 53(14): 5061–84.