

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EVA RETUZNIK

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



EVA RETUZNIK

**SINTEZA IN VREDNOTENJE DERIVATOV *N*-PROPARGILPIPERIDINA KOT
ZAVIRALCEV MONOAMIN OKSIDAZE TIPA A IN B**

**SYNTHESIS AND EVALUATION OF *N*-PROPARGYLPIPERIDINE
DERIVATIVES AS INHIBITORS OF MONOAMINE OXIDASE TYPE A AND
B**

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sove, mag. farm. Masno spektrometrične meritve so bile opravljene na Institutu Jožef Stefan, encimski testi pa na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem svojemu mentorju, doc. dr. Mateju Sovi, mag. farm., za vse nasvete, usmerjanja in strokovno pomoč tako pri izvedbi eksperimentalnega dela, kot pri pisanju magistrske naloge. Posebno zahvalo namenjam vsem svojim bližnjim, ki so mi bili tekom študijskih let v oporo, me vzpodbujali in vedno verjeli vame.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo z naslovom Sinteza in vrednotenje derivatov N-propargilpiperidina kot zaviralcev monoamin oksidaze tipa A in B izdelala samostojno, pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sove, mag. farm.

Eva Retuznik

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	vi
ABSTRACT	vii
SEZNAM OKRAJŠAV	viii
1. UVOD.....	1
1.1. PARKINSONOVA BOLEZEN.....	1
1.1.1. Opredelitev	1
1.1.2. Etiologija in patogenza.....	1
1.1.3. Zdravljenje	4
1.2. MONOAMIN OKSIDAZA	5
1.2.1. Biokemijsko ozadje	5
1.2.2. MAO-A in depresija.....	7
1.2.3. Zaviralci MAO-A	8
1.2.3.1. Ireverzibilni zaviralci MAO-A	9
1.2.3.2. Reverzibilni zaviralci MAO-A	9
1.2.4. MAO-B in Parkinsonova bolezen	10
1.2.5. Zaviralci MAO-B	10
1.2.5.1. Ireverzibilni zaviralci MAO-B	10
1.2.5.2. Reverzibilni zaviralci MAO-B	11
1.3. RAZISKAVE NA PODROČJU ZAVIRALCEV MAO-B	12
2. NAMEN DELA	13
3. MATERIALI IN METODE	15
3.1. REAGENTI IN TOPILA	15
3.2. KROMATOGRAFSKE METODE	15
3.2.1. Tankoplastna kromatografija (TLC)	15
3.2.2. Kolonska kromatografija.....	15
3.2.3. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)	15
3.3. SPEKTROSKOPSKE METODE	16
3.3.1. Jedrska magnetna resonanca (NMR).....	16
3.3.2. Infrardeča spektroskopija (IR)	16
3.3.3. Masna spektroskopija (MS)	16
3.4. DOLOČANJE TEMPERATURE TALIŠČA	16
3.5. RISANJE SPOJIN IN NOMENKLATURA	16
3.6. BIOLOŠKO TESTIRANJE	16

4. EKSPERIMENTALNO DELO	18
4.1. Sinteza 1-(<i>terc</i> -butoksikarbonil)piperidin-4-karboksilne kisline.....	18
4.2. Sinteza <i>terc</i> -butil 4-(metoksi(metil)karbamoil)piperidin-1-karboksilata	19
4.3. Sinteza <i>terc</i> -butil-4-formilpiperidin-1-karboksilata.....	20
4.4. SINTEZNI POSTOPEK A: <i>Sinteza Wittigovih reagentov</i>	20
4.4.1. Sinteza (1-metilcikloheksil)trifenilfosfonijevega bromida	21
4.4.2. Sinteza (1-metilciklopentil)trifenilfosfonijevega bromida.....	21
4.4.3. Sinteza (fenil-1-propen)trifenilfosfonijevega bromida	22
4.4.4. Sinteza (3,3-dimetilalil)trifenilfosfonijevega bromida.....	22
4.4.5. Sinteza (2-hidroksietil)trifenilfosfonijevega bromida	22
4.4.6. Sinteza trifenil(3-metiltiofen)fosfonijevega bromida.....	23
4.4.7. Sinteza trifenil((tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)metil)fosfonijevega klorida	23
4.4.8. Sinteza 3-(bromometil)tetrahidrofurana.....	24
4.4.9. Sinteza trifenil((tetrahidrofuran-3-il)metil)fosfonijevega bromida.....	25
4.4.10. Sinteza 2-bromo-1,1,1-trifluoroetana.....	25
4.4.11. Sinteza trifenil(2,2,2-trifluoroetil)fosfonijevega bromida.....	26
4.5. SINTEZNI POSTOPEK B: <i>Wittigova reakcija</i>	26
4.5.1. Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>E</i>)-4-(2-cikloheksilvinil)piperidin-1-karboksilata in <i>terc</i> -butil (<i>Z</i>)-4-(2-cikloheksilvinil)piperidin-1-karboksilata.....	27
4.5.2. Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>E</i>)-4-(2-ciklopentilvinil)piperidin-1-karboksilata in <i>terc</i> -butil (<i>Z</i>)-4-(2-ciklopentilvinil)piperidin-1-karboksilata	27
4.5.3. Sinteza <i>terc</i> -butil 4-((<i>1E,3E</i>)-4-fenilbut-1,3-dien-1-il)piperidin-1-karboksilata in <i>terc</i> -butil 4-((<i>1Z,3E</i>)-4-fenilbut-1,3-dien-1-il)piperidin-1-karboksilata	27
4.5.4. Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>E</i>)-4-(4-metilpent-1,3-dien-1-il)piperidin-1-karboksilata in <i>terc</i> -butil (<i>Z</i>)-4-(4-metilpent-1,3-dien-1-il)piperidin-1-karboksilata	29
4.5.5. Sinteza <i>terc</i> butil (<i>E</i>)-4-(3-hidroksiprop-1-en-1-il)piperidin-1-karboksilata in <i>terc</i> butil (<i>Z</i>)-4-(3-hidroksiprop-1-en-1-il)piperidin-1-karboksilata.....	30
4.5.6. Sinteza <i>terc</i> butil (<i>E</i>)-4-(2-(tiofen-3-il)vinil)piperidin-1-karboksilata in <i>terc</i> butil (<i>Z</i>)-4-(2-(tiofen-3-il)vinil)piperidin-1-karboksilata	30
4.5.7. Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>E</i>)-4-(2-(tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)vinil)piperidin-1-karboksilata in <i>terc</i> -butil (<i>Z</i>)-4-(2-(tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)vinil) piperidin-1-karboksilata	32
4.5.8. Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>E</i>)-4-(2-(tetrahidrofuran-3-il)vinil)piperidin-1-karboksilata in <i>terc</i> -butil (<i>Z</i>)-4-(2-(tetrahidrofuran-3-il)vinil)piperidin-1-karboksilata.....	32
4.5.9. Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>E</i>)-4-(3,3,3-trifluoroprop-1-en-1-il)piperidin-1-karboksilata in <i>terc</i> -butil (<i>Z</i>)-4-(3,3,3-trifluoroprop-1-en-1-il)piperidin-1-karboksilata.....	33
4.6. SINTEZNI POSTOPEK C: <i>redukcija dvojne vezi</i>	33

4.6.1. Sinteza <i>terc</i> -butil 4-(4-fenilbutil)piperidin-1-karboksilata.....	33
4.6.2. Sinteza <i>terc</i> -butil 4-(2-(tiofen-3-il)etil)piperidin-1karboksilata.....	34
4.7. SINTEZNI POSTOPEK D: <i>odstranitev Boc zaščitne skupine</i>	35
4.8. SINTEZNI POSTOPEK E: <i>Alkiliranje piperidinskega dušika</i>	35
4.8.1. Sinteza 4-((1 <i>E</i> ,3 <i>E</i>)-4-fenilbut-1,3-dien-1-il)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina	36
4.8.2. Sinteza 4-((1 <i>Z</i> ,3 <i>E</i>)-4-fenilbut-1,3-dien-1-il)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina.....	37
4.8.3. Sinteza 4-(4-fenilbutil)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina	38
4.8.4. Sinteza (<i>E</i>)-4-(4-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina	39
4.8.5. Sinteza (<i>Z</i>)-4-(4-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina.....	40
4.8.6. Sinteza (<i>E</i>)-1-(prop-2-in-1-il)-4-(2-(tiofen-3-il)vinil)piperidina.....	40
4.8.7. Sinteza (<i>Z</i>)-1-(prop-2-in-1-il)-4-(2-(tiofen-3-il)vinil)piperidina.....	42
4.8.8. Sinteza 1-(prop-2-in-1-il)-4-(2-(tiofen-3-il)etil)piperidina	43
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	44
5.1. SINTEZNI DEL.....	44
5.1.1. Uvajanje Boc zaščitne skupine.....	44
5.1.2. Sinteza aldehida preko Weinrebovega amida	44
5.1.3. Sinteza Wittigovih reagentov	45
5.1.4. Wittigova reakcija	46
5.1.5. Komentar neuspešnih sintez z uporabo Wittigove reakcije	47
5.1.6. Redukcija dvojne vezi	48
5.1.7. Odstranitev Boc zaščitne skupine	48
5.1.8. Alkiliranje piperidinskega dušika.....	49
5.2. BIOLOŠKI DEL	50
5.2.1. Rezultati biološkega testiranja	50
5.2.2. Komentar rezultatov biološkega testiranja.....	52
6. ZAKLJUČEK	54
7. LITERATURA	55

KAZALO SLIK

Slika 1: Pretvorba MPTP do MPP ⁺ z encimom MAO-B.....	2
Slika 2: Shematski prikaz mehanizmov, ki so vključeni v proces pretvorbe molekule MPTP do kationskega metabolita MPP ⁺ in njegove toksičnosti.	3
Slika 3: Shema delovanja učinkovin pri PB.	4
Slika 4: Pretvorba primarnega amina preko imina do aldehida, s prostetično skupino FAD encima MAO.	5
Slika 5: Shematski prikaz MAO-B v kompleksu z molekulo trans,trans-farnezoila.	7
Slika 6: Prikaz sproščanja monoaminov pri zdravi osebi ob normalnem delovanju MAO-A (A) ter vpliv povečane gostote MAO-A pri bolnikih z depresijo (B, C, D).	8
Slika 7: Struktura moklobemida, edinega predstavnika RIMA za zdravljenje depresije.	9
Slika 8: Razgradnja selegilina in razagilina z encimskimi sistemi.	11
Slika 9: Shema načrtovanja naših spojin na osnovi 4-(4-fluorostiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina z ohranjenim piperidinskim jedrom, propargilno skupino in dvojno vezjo... ..	13
Slika 10: Strukture različnih substituentov, ki jih bomo pripeli preko trifenilfosfonijevih soli na <i>terc</i> -butil-4-formilpiperidin-1-karboksilat s pomočjo Wittigove reakcije.	14
Slika 11: Mehanizem uvedbe Boc zaščitne skupine.	44
Slika 12: Splošen mehanizem tvorbe trifenilfosfonijeve soli.	45
Slika 13: Nastanek trifenilfosfonijevega ilida iz trifenilfosfonijeve soli.	46
Slika 14: Mehanizem Wittigove reakcije.....	47

KAZALO PREGLEDNIC

Rezultati biološkega testiranja, podani v obliki rezidualne aktivnosti (RA) encima pri 100 μ M ali vrednosti IC ₅₀ (krepko tiskani rezultati).	50
--	----

POVZETEK

Nevrodegenerativne bolezni, med katere uvrščamo tudi Parkinsonovo bolezen (PB), predstavljajo perečo zdravstveno problematiko, ki je povezana s starostjo. Zaradi relativno slabega poznavanja vzrokov te bolezni, se trenutno v terapiji PB uporabljajo zdravila, ki preprečujejo napredovanje bolezni in blažijo spremljajoče znake. Zdravljenje z najučinkovitejšim antiparkinsonikom, prekursorjem dopamina L-DOPA (levodopa), postaja vse manj učinkovito. Pri ljudeh se dopamin večinoma presnavlja z monoamin oksidazo tipa B (MAO-B), čeprav je lahko tudi substrat za monoamin oksidazo tipa A (MAO-A), ki presnavlja živčne prenašalce v noradrenergičnih nevronih in serotonin. Trenutno je velik interes za razvoj selektivnih zaviralcev MAO-B, ki bi hkrati delovali tudi na druge tarče, ki so vpletene v razvoj nevrodegenerativnih bolezni.

Pri eksperimentalnem delu magistrske naloge smo sintetizirali derivate *N*-propargilpiperidina na osnovi 4-(4-fluorostiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina kot zaviralca MAO-B. Pripravili smo različne aril in vinil 1,4-disubstituirane piperidinske analoge, pri tem pa ohranili propargilni fragment, ki tvori kovalentno vez z atomom N(5) izoaloksazinskega ostanka FAD v aktivnem mestu encima MAO-B. Ključen korak pri sintezi je predstavljala Wittigova reakcija, s katero smo pripravili *cis* (Z)- in *trans* (E)-alkene. Konfiguracija alkena pomembno vpliva na selektivnost MAO-A in MAO-B. Ugotovili smo, da Wittigova reakcija med aldehydom in nasičenimi sistemi ne poteče. Sedmim sintetiziranim končnim spojinam smo določili zaviralno aktivnost na encimih MAO-A in MAO-B. Kot najmočnejši zaviralec encima MAO-A se je izkazala spojina **29b** s srednjo zaviralno koncentracijo (IC₅₀) 251 nM. Spojina **29b** je *cis* izomer 1,4-disubstituiranega piperidinskega analoga, kateremu smo uvedli tiofen, kot bioizosterno zamenjavo za benzenov obroč. Spojina **26a** (IC₅₀=10 nM) pa je izmed testiranih spojin izkazovala najmočnejšo zaviralno aktivnost na MAO-B in predstavlja najmočnejši sintetiziran zaviralec našega dela. S podaljševanjem distančnika med piperidinom in fenilnim obročem smo zelo doprinesli k zaviralni aktivnosti spojine **26a** na encimu MAO-B. Čeprav smo uspeli sintetizirati učinkovita *cis* (spojina **29b**) in *trans* (spojina **26a**) 1,4-disubstituirana piperidinskega analoga, je potrebno pridobiti še kristalni strukturi in ovrednotiti delovanje te spojine »*in vivo*«.

Ključne besede: Parkinsonova bolezen • Wittigova reakcija • monoamin oksidaza • propargilna skupina • zaviralci

ABSTRACT

Neurodegenerative diseases, which also include Parkinson's disease (PD), represent the most common age-related health problems. Due to the relatively poor knowledge of the causes of this disease, registered drugs just delay progress of neurodegeneration and relieve the symptoms of PD. Treatment with the most effective anti-Parkinsonian drug, dopamine precursor L-DOPA (levodopa), is becoming less and less effective. In humans, monoamine oxidase type B (MAO-B) catalyzes the oxidative deamination of dopamine, although it can also be a substrate for monoamine oxidase type A (MAO-A), which catalyzes the oxidative deamination of neurotransmitters in noradrenergic neurons and serotonin. There is currently great interest in development of selective MAO-B inhibitors, which could also act on other targets, involved in the development of neurodegenerative diseases.

In the experimental part of the Master's thesis we synthesized derivatives of *N*-propargylpiperidine, based on the 4-(4-fluorostyryl)-1-(prop-2-yn-1-yl)piperidine as an inhibitor of MAO-B. We prepared a variety of aryl and vinyl 1,4-disubstituted piperidines analogs with propargyl fragment that forms a covalent bond to the N(5) position of the isoalloxazine moiety of FAD in the active site of the MAO-B. A key step in the synthesis is Wittig reaction, which was used to prepare *cis* (Z)- and *trans* (E)-alkenes. *Cis/trans* configuration has a significant impact on the selectivity of MAO-A and MAO-B. We found out that the Wittig reaction between the aldehyde and saturated systems does not occur. Seven synthesized final compounds were tested for their inhibitory activity on the enzyme MAO-A and MAO-B. Compound **29b**, the *cis* isomer of 1,4-disubstituted piperidine analog, where thiophene was introduced as a bioisosteric replacement of the benzene ring, showed the most potent inhibitory activity on MAO-A with half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value of 251 nM. Compound **26a** (IC₅₀=10 nM) is the most potent inhibitor of MAO-B. The extension of the linker between piperidine and phenyl ring contributed to the inhibitory potency of the compound **26a**. Although we succeeded to synthesize potent *cis* (compound **29b**) and *trans* (compound **26a**) 1,4-disubstituted piperidine analogues, it is necessary to obtain crystal structures and evaluate their activity »*in vivo*«.

Keywords: *Parkinson's disease • Wittig reaction • monoamine oxidase • propargyl group • inhibitors*

SEZNAM OKRAJŠAV

•OH	hidroksilni radikal
AB	Alzheimerjeva bolezen
anh. THF	brezvodni tetrahidrofuran
Ar	aril
ATP	adenozin -5`-trifosfat
Bad/Bax	regulatorji apoptotičnih beljakovin
Bcl-2/Bcl-x	regulatorji antiapoptotičnih beljakovin
Boc	<i>tert</i> -butoksikarbonil
cDNA	komplementrna deoksiribonukleinska kislina
COMT	katehol-O-metil transferaza
CŽS	centralni živčni sistem
DOPAC	dihidroksifenilacetna kislina
EMA	evropska agencija za zdravila (<i>ang. The European Medicines Agency</i>)
FAD	flavin-adenin-dinukleotid
FDA	ameriška vladna ustanova za nadzorovanje zdravil in hrane (<i>ang. Food and Drug Administration</i>)
GAPDH	glicerilaldehid-3-fosfat-dehidrogenaza
hMAO	humana monoamin oksidaza
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (<i>ang. high performance liquid chromatography</i>)
HVA	homovanilinska kislina
Hz	hertz
IC ₅₀	srednja zaviralna koncentracija
IR	infrardeča spektroskopija
<i>J</i>	sklopitvena konstanta
L-DOPA	levodopa
LiAlH ₄	litijev aluminijev hidrid
MAO-A	monoamin oksidaza tipa A

MAO-B	monoamin oksidaza tipa B
MF	mobilna faza
MPDP ⁺	1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridin
MPP ⁺	1-metil-4-fenilpiridin
M _r	molekulska masa
MS	masna spektrometrija
MTPT	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
NaHMDS	natrijev heksametildisilazan
NMR	jedrska magnetna resonanca (<i>ang. nuclear magnetic resonance</i>)
PARP-1	poli(ADP-riboza)polimeraza-1
PB	Parkinsonova bolezen
ppm	en del na milijon delov (10 ⁻⁶)
RA	rezidualna aktivnost
Rf	retencijski faktor
RIMA	reverzibilen zaviralec monoamin oksidaze tipa A
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
TBTU	<i>O</i> -(benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametilamonijev tetrafluoroborat
TLC	tankoplastna kromatografija (<i>ang. thin-layer chromatography</i>)
t _R	retencijski čas
T _{tal}	temperatura tališča

1. UVOD

Parkinsonova bolezen (PB) je druga najpomembnejša od starosti odvisna neurodegenerativna bolezen v razvitih državah, takoj za Alzheimerjevo boleznijo (AB), ki je najpogostejša oblika demence. Omenjeni bolezni predstavljata perečo zdravstveno problematiko, ki je povezana s starostjo. Svetovna zdravstvena organizacija ocenjuje, da bo do leta 2030 živelo 12 % ljudi z izraženimi motnjami značilnimi za PB ali AB. Zaradi relativno slabega poznavanja vzrokov obeh bolezni, nam zdravila, ki so na voljo, dopuščajo samo blažnje spremljajočih znakov in imajo tako velik vpliv na kvaliteto življenja starostnikov (1-3).

1.1. PARKINSONOVA BOLEZEN

1.1.1. Opredelitev

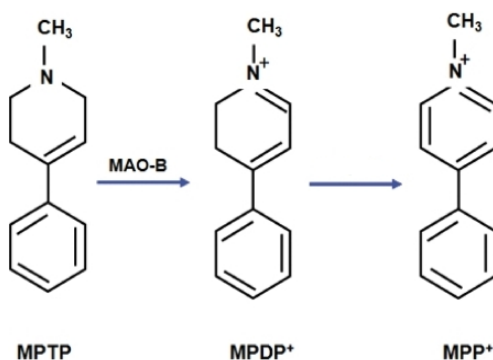
PB je kronična, napredujoča neurodegenerativna bolezen nepoznane etiologije, ki prizadene predvsem telesno gibanje (motoriko), s čimer bolnika postopoma onesposobi za samostojno življenje. Znanstveniki danes pripisujejo velik vpliv dedne nagnjenosti na pojavnost bolezni. Je razmeroma pogosta bolezen, saj zanjo oboleva 1-2 % ljudi vseh narodnosti po 50. letu starosti, predvsem moški. Poznamo tudi juvenilno obliko PB, ki se začne že pred 40. letom starosti in ima slabšo prognozo ter jo srečamo v redkejših primerih (4). Za PB je značilno propadanje nevronov substance nigre, ki so odgovorni za proizvodnjo živčnega prenašalca dopamina. Obledela substanca nigra v možganskem deblu je posledica propada živčnih celic (5). Pomanjkanje dopamina povzroči porušeno ravnovesje med živčno-prenašalnimi sistemi, saj dopaminergični nevroni igrajo pomembno vlogo pri nadzoru številnih možganskih funkcij vključno s prostovoljnim gibanjem in široko paleto vedenjskih funkcij (6).

1.1.2. Etiologija in patogenza

Najpogosteje vzroka za PB ne poznamo, v redkih primerih pa je vzrok prekinjenega dopaminergičnega prenosa v striatumu, subkortikalnem možganskem jedru, ki ga uvrščamo med bazalne ganglije, dedne narave. V določenih družinah se PB pojavlja pogosteje, čeprav so zanjo značilni neklasični principi dedovanja. Poznanih je že več kot deset genov, ki privedejo do PB (4,5). Na razvoj bolezni ima velik vpliv tudi okolje. V eni izmed študij, so raziskovalci ugotovili, da izpostavljenost pesticidom, zastrupitev z ogljikovim monoksidom ter vdihavanje mangana povzroči večje tveganje za kasnejši

razvoj PB. Presenetljiv rezultat študije pa je ugoden vpliv in zaščitni učinek negativnih dejavnikov, kot so uživanje nikotina, pitje kave, uživanje ibuprofena pred razvojem PB (7). V teku življenja dopaminski nevroni propadajo hitreje kot drugi nevroni, saj že v fizioloških razmerah prihaja do oksidativnega stresa. Reaktivne kisikove zvrsti (ROS) pospešeno nastajajo pri encimski razgradnji dopamina, zato so dopaminski nevroni dovzетnejši za okvaro z mitohondrijskimi nevrotoksini. Primer takšnega nevrotoksina je 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP), ki povzroča trajne znake PB. MPTP se danes uporablja za pridobivanje živalskih modelov PB za testiranja novih terapij (4).

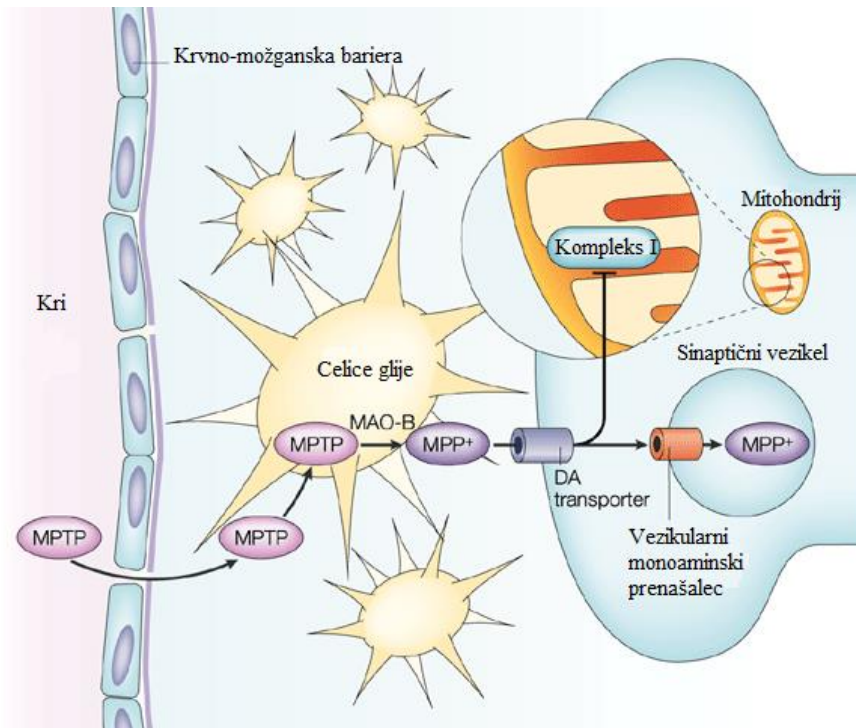
Molekula MPTP je topna v lipidih, zato zlahka prehaja krvno-možgansko bariero in vstopi v možganske celice, kjer jo encim monoamin oksidaza tipa B (MAO-B) pretvori v 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridin (MPDP⁺), nato pa verjetno zaradi spontane oksidacije nastane aktivna toksična snov 1-metil-4-fenilpiridin (MPP⁺) (Slika 1).



Slika 1: Pretvorba MPTP do MPP⁺ z encimom MAO-B. Prirejeno po (8).

MPTP sam po sebi ni toksičen, njegov kationski metabolit MPP⁺ pa je strupen in ima visoko afiniteto za dopaminergične nevrone, v katere vstopi s pomočjo dopaminskega transporterja. Čeprav natančen mehanizem, na katerem temelji toksičnost molekule MPP⁺, še ni znan, predvidevamo, da je toksičnost odvisna od selektivnega prehoda v mitohondrij, saj samo dovolj velika koncentracija toksina moti metabolizem v njem. Mesto, na katerem MPP⁺ deluje, je kompleks I, ki predstavlja pomembno komponento elektronske transportne verige metabolizma v mitohondriju. Blokada mitohondrijskega dihanja oslabi nastajanje adenzin-5'-trifosfata (ATP), zaradi česar pride do zaviranja energetsko odvisnih procesov, med katere spada ionski transport. Motnja v homeostazi kalcijevih ionov (Ca²⁺) igra ključno vlogo pri toksičnosti MPP⁺. Zaradi zvišanja znotrajceličnega Ca²⁺, pride do

aktivacije protein kinaz, ki motijo delovanje normalne celice in vodijo v celično smrt. Zaviranje kompleksa I ovira pretok elektronov, kar ima za posledico povečano nastajanje radikalov, predvsem hidroksilnega ($\bullet\text{OH}$), ki povzročajo oksidativni stres in programirano celično smrt (Slika 2) (8-10).

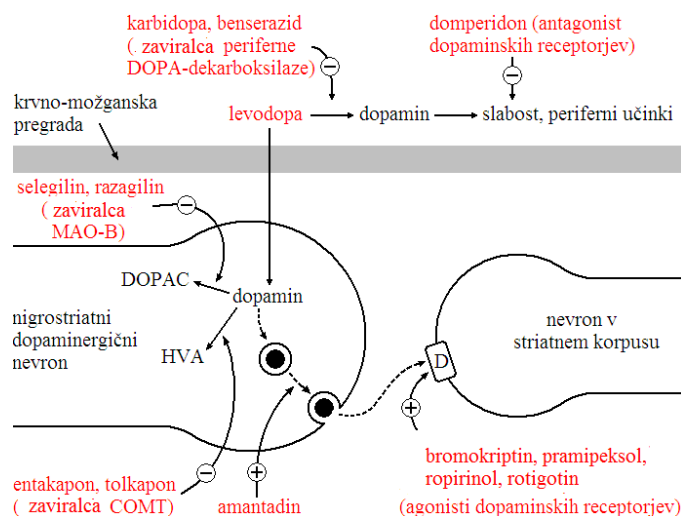


Slika 2: Shematski prikaz mehanizmov, ki so vključeni v proces pretvorbe molekule MPTP do kationskega metabolita MPP⁺ in njegove toksičnosti. Prirejeno po (10).

Patogeneza PB je povezana predvsem s selektivnim propadanjem dopaminskih nigro-striatnih nevronov, ki povezujejo dve bazalni jedri – substanco nigro in korpus striatum ter s posledičnim pomanjkanjem dopamina v striatumu. Za PB je značilno, da se simptomi pojavijo šele pri zelo hudem pomanjkanju dopamina, zaradi prilagoditvenih sprememb v striatumu, ki omogočajo povečano odzivnost striatnih nevronov na preostali dopamin (1). Postopna degeneracija dopaminskih nevronov je zelo dinamičen proces, pri katerem preostali dopaminski nevroni delujejo tako, da se v njih poveča sinteza in sproščanje dopamina. V presinaptičnih prilagoditvah lahko najdemo odgovor, zakaj je PB večinoma pogostejša pri starejših ljudeh (4). Pri ljudeh, ki so zboleli za PB, so v substanci nigri odkrili številne patološke procese, najbolj izstopa kopičenje železa in sprememba v koncentraciji proteinov, ki vežejo železo (9).

1.1.3. Zdravljenje

PB ni ozdravljiva, vendar lahko simptome in znake bolezni ublažimo z zdravili, ki tako ali drugače nadomestijo primanjkljaj dopamina v striatumu. Zdravljenje z najučinkovitejšim antiparkinsonikom, prekursorjem dopamina L-DOPA (levodopa), postaja vse manj učinkovito, saj se po nekaj letih zdravljenja začnejo pojavljati stranski učinki, ki se izražajo kot nehoteni gibi (diskinezije) in motorična nihanja. L-DOPA je predstopnja dopamina, ki prehaja skozi krvno-možganske pregrade in se v reakciji, ki jo katalizira encim DOPA-dekarboksilaza, spreminja v dopamin. Zaradi neželenih učinkov DOPA-dekarboksilaze na periferiji, je smiselno v terapijo uvesti tudi zaviralec dekarboksilacije (karbidopa ter hidrazid benserazid). Karbidopa na periferiji povzroča gastrointestinalne motnje, ki jih lahko ublažimo z uporabo antagonistov dopaminskih receptorjev (domperidon). Skupaj z L-DOPO se uporablja tudi amantadin, ki sprošča endogeni dopamin iz živčnih končičev. Za bolnike, ki so mlajši od 65 let, so zdravila prvega izbora za zdravljenje PB dopaminski agonisti, čeprav niso tako učinkoviti, pa imajo manj stranskih učinkov pri dolgotrajni uporabi. Apomorfina je dopaminski agonist, ki se aplicira intravensko, saj pride pri peroralni aplikaciji do močnega emetičnega delovanja. Med dopaminske agoniste spadajo tudi ergot alkaloidi (bromokriptin), ki imajo podobno strukturo kot apomorfina ter nealkaloidni dopaminski agonisti (pramipeksol, ropirinol, rotigotin). Entakapon in tolkapon sta glavna predstavnika zaviralcev encima katehol-O-metil transferaze (COMT), ki razgradi dopamin do homovanilinske kisline (HVA). Kot zaviralca MAO-B pa se uporabljata selegilin in razagilin, ki preprečujeta razgradnjo dopamina do dihidroksifenilacetne kisline (DOPAC) (1, 3, 4).



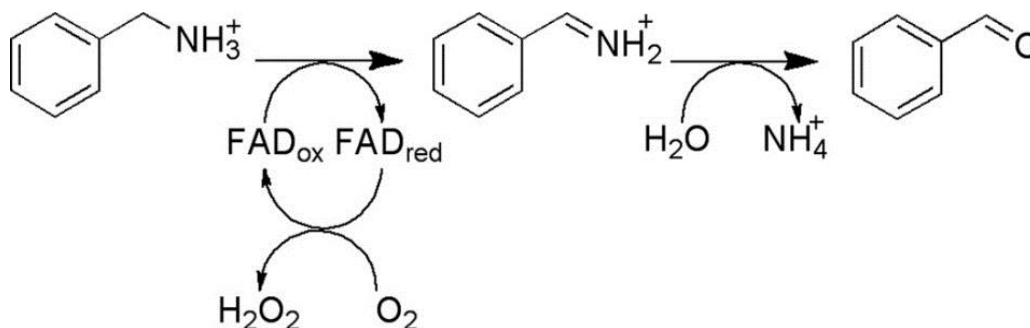
Slika 3: Shema delovanja učinkovin pri PB. Prirejeno po (11).

1.2. MONOAMIN OKSIDAZA

Monoamin oksidaza (MAO) je zelo razširjen encim, ki se nahaja v lipidnem dvosloju zunanje strani mitohondrijske membrane, z visoko stopnjo izražanja v gastrointestinalnem traktu, jetih in v nevronskih tkivih. Humani izoobliki monoamin oksidaze tipa A (MAO-A) in B (MAO-B) sta eni izmed najbolj raziskanih encimov. Zaradi svoje vloge pri nadzoru ravni živčnih prenašalcev in oksidativnega metabolizma predstavljata MAO-A in MAO-B pomembni tarči za zdravljenje psihiatričnih in nevroloških motenj. Zaviralce MAO-A uporabljamo za zdravljenje depresije, zaviralce MAO-B pa v terapiji PB in AB (12,13).

1.2.1. Biokemijsko ozadje

Encim MAO je oksidoreduktaza, ki vsebuje kovalentno vezan kofaktor flavin-adenin-dinukleotid (FAD), zato ga uvrščamo med flavoencime (14). Za to družino encimov je značilno, da katalizirajo oksidativno deaminacijo primarnih, sekundarnih ali terciarnih biogenih aminov ter ksenobiotikov do ustreznih iminov, ki hidrolizirajo do aldehida in NH_4^+ . Aldehidi, ki nastanejo pri razgradnji z MAO, se metabolizirajo z aldehyd dehidrogenazo do karboksilne kisline ali z aldehyd reduktazo do glikolov. Zaradi sposobnosti flavinskega dela FAD, da sprejme en ali dva elektrona, pride do oksidacije amina v imin, pri tem pa FAD preide v reducirano obliko, ki reagira s kisikom. Na ta način pride do regeneracije oksidirane oblike FAD in nastanka stranskega produkta H_2O_2 (Slika 4). MAO-A prednostno oksidirajo serotonin, adrenalin in noradrenalin; MAO-B pa benzilamin ter feniletilamin. Dopamin, tiramin in triptamin so substrati tako za MAO-A kot za MAO-B (15, 16).



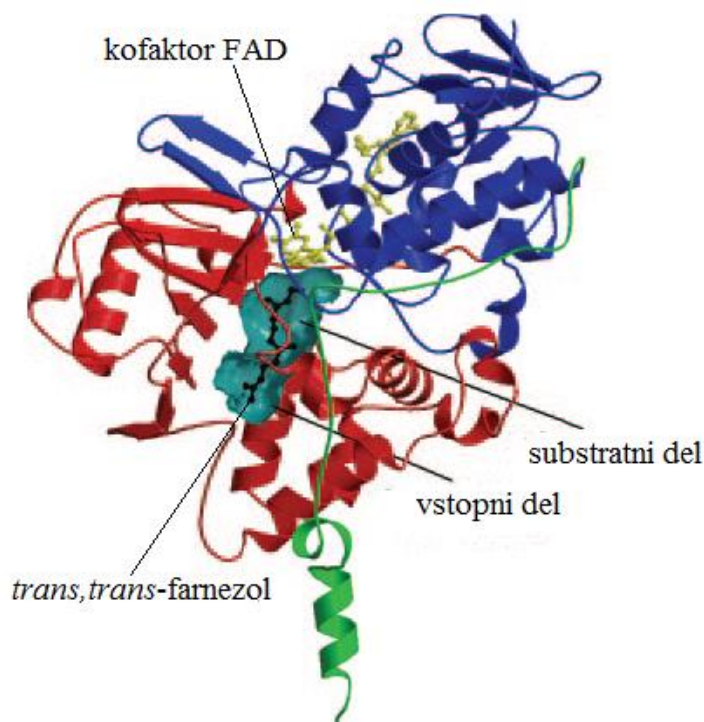
Slika 4: Pretvorba primarnega amina preko imina do aldehida, s prostetično skupino FAD encima MAO. Prirejeno po (16).

Čeprav si humana MAO-A in MAO-B delita visoko identičnost v aminokislinskem zaporedju, vidimo, da imata različno zaviralno aktivnost na substrate. MAO-A kaže večjo afiniteto za hidrosilirane amine, MAO-B pa za nehidrosilirane endogeneaminske živčne prenašalce. Natančna lokalizacija obeh izooblik v možganih še ni pojasnjena, vendar znanstveniki domnevajo, da prevladuje izoencim MAO-B. V določenih raziskavah so ugotovili, da se v centralnem živčnem sistemu (CŽS) MAO-A nahaja predvsem v kateholaminergičnih nevronih, MAO-B pa v glia celicah in v serotoninergičnih nevronih (13). Zanimivo je, da se izoobliki encima MAO nahajata ravno v nasprotnih nevronih kot pa njuni substrati. To bi lahko razložili z zaščitno vlogo MAO, ker se s tem ohrani koncentracija lastnega živčnega prenašalca in prepreči porast koncentracije živčnih prenašalcev, ki lahko vderejo iz sosednjih nevronov. Vsekakor pa predstavlja MAO-B, ki se nahaja v endotelijskih celicah sluznice cerebralnih krvnih žil, pomembno zaščitno vlogo v krvno-možganski pregradi (15).

Na dejansko stanje zaviralne aktivnosti MAO v CŽS pa ima velik vpliv starost posameznika. Med razvojem se spreminja delež MAO zaradi celične diferenciacije v različnih tkivih. V večini tkiv ljudi je ob rojstvu MAO-A prisotna v možganih na tako visoki ravni kot pri odraslem človeku, medtem ko se MAO-B začne pojavljati šele po rojstvu. V odrasli dobi ostajata obe obliki izoencimov relativno stabilni, v približno 6. desetletju pa se lahko aktivnost MAO-A malenkost poveča, pri MAO-B pa pride do izrazitega ter postopnega povečanja. Povečanje aktivnosti MAO-B pripisujejo celični delitvi glia celic, kar povzroči izgubo nevronov, čeprav lahko na povečano delovanje MAO-B vplivajo tudi drugi dejavniki (genetski, hormonski, okoljski vplivi) (17,18). Pomembno pa je tudi, da se aktivnost MAO v možganskih regijah lahko spreminja. Največje starostno povečanje MAO-B se kaže v nigrostriatnem in limbičnem sistemu, manjše spremembe pa so vidne v frontalnem in čelnem korteksu (16).

Raziskovalci so potrebovali več let, da so uspeli pojasniti selektivno zaviralno delovanje MAO-A in MAO-B na različne substrate. S pomočjo študij so ugotovili, da se obe humani obliki izoencima v raztopini pojavljata v obliki dimerov, medtem ko humana MAO-A kristalizira kot monomer. Aktivno mesto MAO-A je krajše in širše od aktivnega mesta MAO-B, ki je razdeljeno na vstopni in substratni del, ki se ob vezavi liganda zlije v eno votlino ter konča s koencimom FAD. Aminokislinski ostanek Ile 199 z delitvijo na vstopni in substratni del omogoča vstop manjšim hidrofobnim molekulam (Slika 5). S tem je

dosežena specifičnost delovanja zaviralcev MAO-B. Medtem pa večji hidroksilirani amini predstavljajo selektivni substrat za MAO-A. Selektivni zaviralci MAO-A povečajo koncentracijo živčnih prenašalcev v adrenergičnih nevronih in serotonina, zato imajo izraženo antidepresivno delovanje, medtem ko zaviranje MAO-B vodi do povečane ravni dopamina pri bolnikih s PB (16, 19, 20).



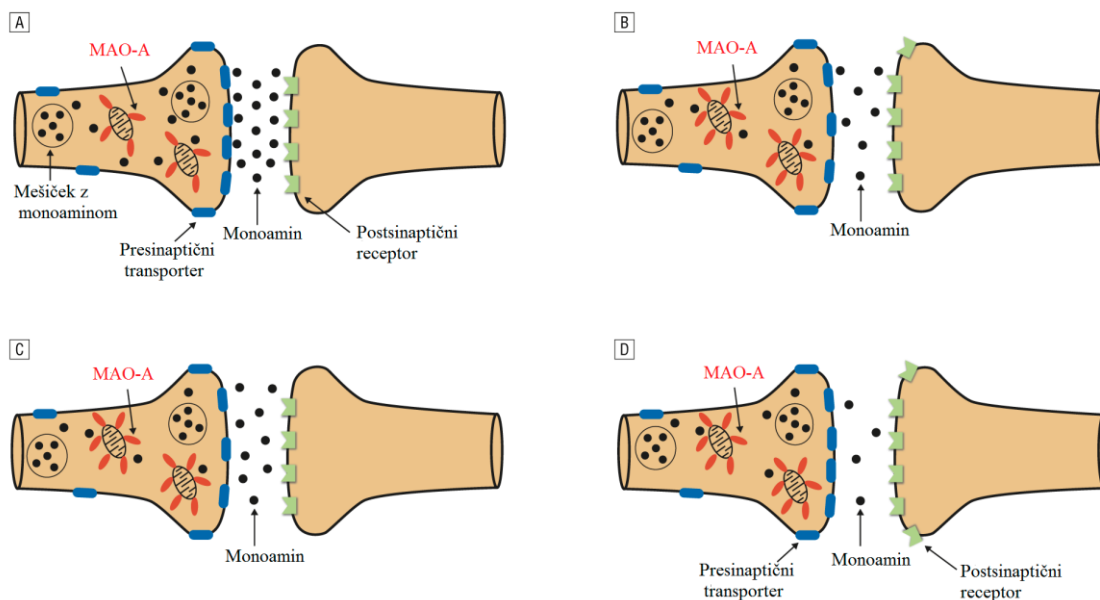
Slika 5: Shematski prikaz MAO-B v kompleksu z molekulo *trans,trans*-farnezoila, ki ga najdemo v cigaretnem dimu in deluje kot močan, reverzibilni zaviralec MAO-B. Z modro barvo je označena domena FAD, z rdečo barvo pa je označena domena substrata. Zelena barva predstavlja območje zunanje membrane mitohondrija, v kateri se s C-terminalnim delom nahaja encim MAO-B.

Prirejeno po (20).

1.2.2. MAO-A in depresija

MAO-A predstavlja logičen encim za raziskovanja na področju depresije, saj uravnava nivo treh pomembnih monoaminov v možganih, ki vplivajo na razpoloženje posameznika. Antidepresivno delovanje zaviralcev MAO-A so odkrili po naključju, ko so bolnike s tuberkulozo zdravili z iproniazidom, derivatom hidrazina. Po tem odkritju so znanstveniki postavili hipotezo, da pomanjkanje kateholaminov, predvsem noradrenalina in dopamina ter po možnosti še indolnega derivata serotonina, lahko povzroči depresijo. Hipotezo so potrdili s povezavo med zaviranjem MAO-A in izboljšanjem razpoloženja depresivnih

bolnikov. Čeprav je ta hipoteza zelo poenostavljena, je podprta z velikim številom študij, v katerih so preučevali mehanizem delovanja antidepresivov z merjenjem gostote MAO-A v možganih (13,21). Pri depresiji pride do povečane gostote MAO-A in posledično do povečane presnove monoaminov, ki vodi v njihovo zmanjšano koncentracijo (B, Slika 6). Novejše raziskave kažejo, da lahko zmanjšana gostota presinaptičnega transporterja za določen monoamin povzroči sicer manjšo aktivnost MAO-A, vendar pride do oslabiljenega delovanja monoamina, ki lahko vodi v trajno izgubo tega (C, Slika 6). Če pa gostota presinaptičnega transporterja ni zmanjšana, potem ni zaščite pred vplivom povišane ravni MAO-A. Koncentracija monoamina v sinaptični špranji se močno zmanjša, na dolgi rok pa lahko tudi popolnoma izgine. Kadar pride do zmanjšane izločanja monoaminov, se lahko poveča gostota postsinaptičnih receptorjev (D, Slika 6) (22).



Slika 6: Prikaz sproščanja monoaminov pri zdravi osebi ob normalnem delovanju MAO-A (A) ter vpliv povečane gostote MAO-A pri bolnikih z depresijo (B, C, D). Prirejeno po (22).

1.2.3. Zaviralci MAO-A

Zaviralci MAO-A zmanjšajo aktivnost encima, s čimer preprečijo razgradnjo dopamina, serotonina in noradrenalina ter s tem povečajo njihov čas zadrževanja v sinaptični špranji. Uporabljamo jih za zdravljenje depresije (21). Novejše študije nakazujejo, da zaviralci MAO-A zaščitijo nevrone pred celično smrtjo, ker spodbujajo izločanje antiapoptičnega

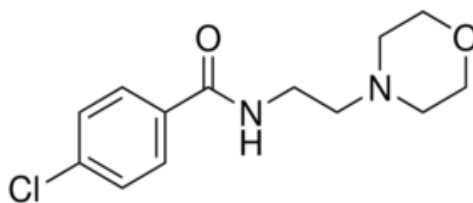
ptoteina Bcl-2 in možganskega nevrotrofičnega faktorja (BDNF), katerega pri bolnikih z depresijo primanjkuje (23).

1.2.3.1. Ireverzibilni zaviralci MAO-A

V klinični uporabi so bili najprej ireverzibilni zaviralci MAO-A, ki pa se danes zaradi kopičenja tiramina in povečanih učinkov na kardiovaskularni sistem ne uporabljajo več (13). Ireverzibilno zaviranje MAO-A sicer povzroči, da se tiramin začne presnavljati z MAO-B, ker predstavlja tiramin substrat tako za MAO-A kot za MAO-B. Kljub temu lahko vseeno pride do kopičenja in izplavljanja tiramina v krvni obtok, ki doseže periferne adrenergične nevrone in povzroči sproščanje noradrenalina, kar lahko privede do hipertenzivne krize. Do enakih težav lahko pride ob sočasnem uživanju hrane bogate s tiraminom in ireverzibilnim zaviralcem MAO-A (24).

1.2.3.2. Reverzibilni zaviralci MAO-A

Povezava med ireverzibilnim zaviralcem MAO-A in kopičenjem tiramina je pomembno vplivala na razvoj reverzibilnih zaviralcev MAO-A (RIMA). Tiramin lahko izpodrine RIMA iz aktivnega mesta MAO-B. Amin se presnovi in ne more vstopiti v krvni obtok. Tiramin ne prehaja krvno-možganske pregrade, zato ne more izničiti zaviralne aktivnosti MAO-A v možganih, ki ima za posledico zvišano koncentracijo noradrenalina in serotonina v možganih (24). Moklobemid je edini RIMA, ki se uporablja kot antidepresiv. Spada v novo generacijo kratko delujočih RIMA. Deluje tako, da zavira delovanje MAO-A v možganih ter obeh izoencimov MAO v jetrih, tankem črevesu in ledvicah (25). Moklobemid v ekstracerebralnem tkivu podgan spodbuja izrazito zaviranje MAO-B, zaradi hitrega metabolizma morfolinskega obroča (25). Tudi pri ljudeh poteka presnova moklobemida večinoma preko oksidativnih reakcij na morfolinskem delu molekule (27).



Slika 7: Struktura moklobemida, edinega predstavnika RIMA za zdravljenje depresije. Prirejeno po (28).

1.2.4. MAO-B in Parkinsonova bolezen

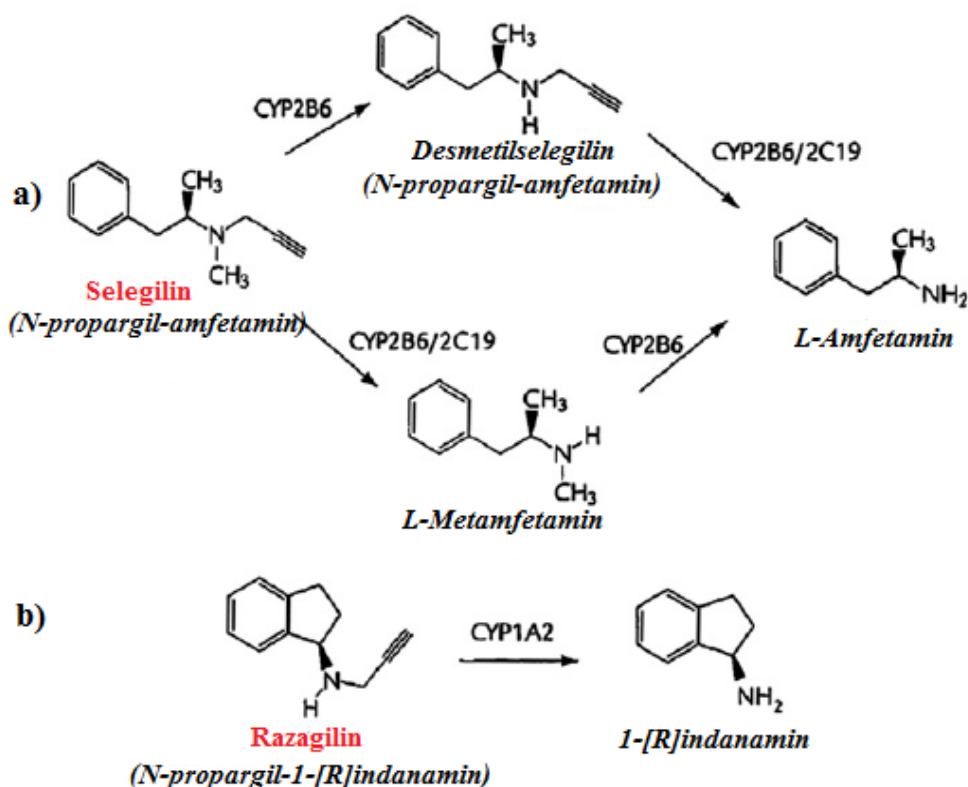
Ko so odkrili, da lahko molekula MPTP preko svojega toksičnega presnovka MPP⁺ povzroči PB, so se začela raziskovanja o uporabi selektivnih zaviralcev MAO-B pri zdravljenju te bolezni (3). Čeprav vzrok celične smrti pri PB še vedno ni popolnoma jasen, vemo, da spremembe v delovanju mitohondrijev vplivajo na izgubo dopaminergičnih nevronov v substanci nigri. Na izgubo dopaminergičnih nevronov vpliva tudi več patogenih mehanizmov. Predvsem je razlog oksidativni stres, ki ga povzroči čezmerno kopičenje H₂O₂, kar ima za posledico nastanek ROS. Pri ljudeh se dopamin večinoma presnavlja z MAO-B, čeprav je običajno lahko tudi substrat za MAO-A. V normalnih fizioloških pogojih se dopamin sprošča v sinapse preko dopaminskega transporterja, ki uravnava tudi njegovo skladiščenje s ponovnim privzemom nazaj v citosol. Pri PB je število presinaptičnih nevronov v striatumu močno zmanjšano, zato igra MAO-B v preostalih celicah glije ključno vlogo v presnovi dopamina. To omogoča ciljno zdravljenje PB s selektivni zaviralci MAO-B, ki preprečijo razgradnjo dopamina (29, 30).

1.2.5. Zaviralci MAO-B

1.2.5.1. Ireverzibilni zaviralci MAO-B

Selegilin in razagilin, edina predstavnika odobrena s strani FDA, sta selektivna zaviralca MAO-B, ki ireverzibilno zavirata delovanje tega encima. Delujeta tako, da tvorita kovalentno vez med propargilno skupino in atomom N(5) izoaloksazinskega ostanka FAD v aktivnem mestu encima MAO-B, ki je vsidran v zunanjo mitohondrijsko membrano. Dolgotrajno zaviranje MAO-B je odgovorno za simptomatsko izboljšanje motoričnih simptomov, ki se pojavijo ob uporabi zaviralca MAO-B, v začetni fazi PB ali kot dodatna terapija k L-DOPI ali dopaminskemu agonistu v srednji ali že pozni fazi PB. Razagilin spada v 2. generacijo zaviralcev MAO-B in ima izraženo 12-kratno močnejše zaviralno delovanje v primerjavi s selegilinom. Večja učinkovitost razagilina se odraža v nižjem odmerku, ki je potreben za zaščito dopaminergičnih nevronov. Deluje tako, da prepreči celično smrt, ki jo povzroči apoptoza ter vzdržuje mitohondrijski membranski potencial. *In vitro* testi na podganah so pokazali, da selegilin, ne pa tudi razagilin, vpliva na sproščanje adrenalina in noradrenalina ter povišano srčno frekvenco. Raziskovalci menijo, da je razlog za to v različni kemijski strukturi selegilina in razagilina, ki vpliva na nastanek različnih metabolitov z različnimi farmakološkimi lastnostmi. Selegilin se pretvori preko desmetilselegilina in metamfetamina v L-amfetamin, ki bi lahko deloval nevrotoksično.

Medtem pa razagilin, ki je derivat indanamina, ne daje amfetaminskih metabolitov. Njegov edini metabolit je 1-R-indanamin, ki ima izraženo nevroprotektivno delovanje (Slika 8). Ali ta razlika v kemijski strukturi pomembno vpliva na nastanek srčno žilnih dogodkov amfetaminskih metabolitov ni znano, saj je odvisno v kolikšni koncentraciji se ti metaboliti pojavijo v krvi posameznika (31-33).



Slika 8: Razgradnja selegilina in razagilina z encimskimi sistemi. a) Metabolizem selegilina s CYP2B6 do desmetilselegilina ali L-metamfetamina do L-amfetamina. b) Metabolizem razagilina s CYP1A2 do 1-R-indanamina. Prirejeno po (33).

1.2.5.2. Reverzibilni zaviralci MAO-B

Leta 2015 je Evropska agencija za zdravila (EMA) odobrila uporabo safinamida v terapiji PB (34). Safinamid, derivat 3-benzoiloksi- β -nitrostirena, deluje kot močan, visoko selektiven in reverzibilen zaviralec MAO-B, ki zviša zunajcelične ravni dopamina v striatumu. Deluje v dopaminergičnem in nedopaminergičnem sistemu, tako da zmanjšuje ponovni privzem dopamina z zaviranjem napetostno odvisnih natrijevih (Na^+) kanalčkov, moduliranjem kalcijevih (Ca^{2+}) kanalčkov N-tipa in zmanjšanim sproščanjem glutamata (35).

1.3. RAZISKAVE NA PODROČJU ZAVIRALCEV MAO-B

Dejstvo, da je propargilaminska skupina ključen dejavnik za nevroprotektivno delovanje zaviralcev MAO-B, usmerja razvoj novejših učinkovin za zdravljenje PB in drugih nevrodegenerativnih bolezni. Razagilin predstavlja odlično iztočnico, iz katere je razvidno, kako propargilaminska skupina prispeva k zaščiti živčnih celic. Dokazano je, da vpliva na korake apoptotične kaskade, saj:

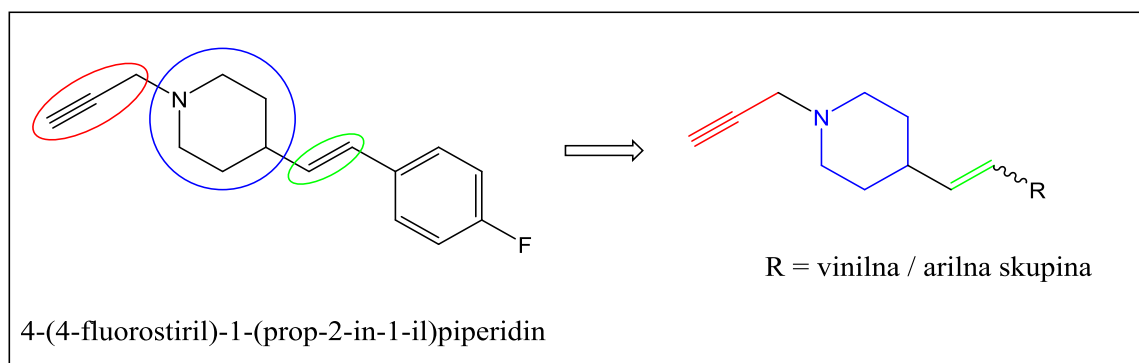
- prepreči aktivacijo kaspaze 3 in poli(ADP-riboza)polimeraze-1 (PARP-1);
- z vezanjem na vezavno mesto glicerilaldehid-3-fosfat-dehidrogenaze (GAPDH) preprečuje premestitev genov v jedru ter
- zmanjšuje fragmentacijo jedrne DNA.

Prav tako pa je propargilaminska skupina sposobna spodbujati izločanje antiapoptotičnih proteinov Bcl-2 in Bcl-X ter zavirati izločanje proapoptotičnih proteinov Bad in Bax. Iz neke študije je razvidno, da so celice, zastrupljene z nevrotoksinom rotenonom, ob dodatku izbranih derivatov *N*-propargilamina izkazovale izrazito povečano preživetje v primerjavi z okuženimi celicami brez dodatka derivatov *N*-propargilamina, zato ta skupina predstavlja zelo pomemben substituent. Z ustrezno izbiro osnovnega skeleta in drugih substituenov, ki so še vezani nanj, pa pomembno vplivamo na selektivnost in jakost delovanja zaviralcev MAO-B (36).

Vedno večje zanimanje na področju zaviralcev MAO-B izhaja iz biološke aktivnosti tega izoencima tudi v drugih tkivih. V novejših študijah so odkrili razmerje med hMAO-B in alkoholizmom tipa II, depresijo, migreno, virusnimi okužbami, vnetjem, mišično distrofijo, diabetesom, demenco in PB, zato predstavlja MAO-B pomembno tarčo za zdravljenje številnih bolezni v prihodnosti. Trenutno je velik interes za razvoj selektivnih zaviralcev MAO-B, ki bi hkrati delovali tudi na druge tarče, ki so vpletene v razvoj zgoraj omenjenih bolezni, s sprejemljivim farmakološkim profilom. Razvoj učinkovin z delovanjem na več tarč (multiplih ligandov) bi omogočil celovito obravnavo kompleksnih bolezni, zmanjšal stranske učinke in izboljšal sodelovanje bolnikov pri zdravljenju (37).

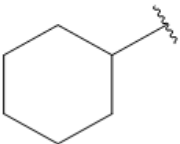
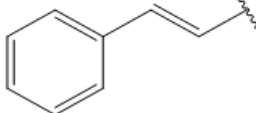
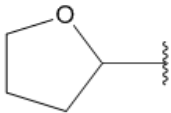
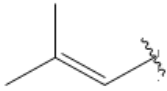
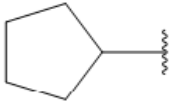
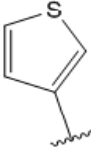
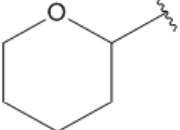
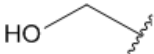

2. NAMEN DELA

Encima MAO-A in MAO-B igrata ključno vlogo pri metabolizmu živčnih prenašalcev v človeških možganih, zato sta vpletena pri različnih tipih depresij in številnih neurodegenerativnih boleznih, kot sta na primer PB in AB. Cilj našega dela bo sinteza derivatov *N*-propargilpiperidina na osnovi 4-(4-fluorostiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina kot potencialnega zaviralca MAO-B (Slika 9).



Slika 9: Shema načrtovanja naših spojin na osnovi 4-(4-fluorostiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina z ohranjenim piperidinskim jedrom, propargilno skupino in dvojno vezjo.

Sintetizirali bomo različne aril in vinil 1,4-disubstituirane piperidinske analoge, pri tem pa ohranili propargilni fragment, ki je ključen za delovanje. Najprej bomo pripravili spojine, ki vstopajo skupaj z aldehydom v Wittigovo reakcijo. Sintetizirali bomo trifenilfosfonijeve soli različnih cikloalkanov (**A**), aromatskih sistemov (**B**), cikličnih spojin, ki vsebujejo kisik (**C**), nenasičenega ogljikovodika (**D**), primarnega alkohola (**E**) ter halogeniranega ogljikovodika (**F**) (Slika 10). Na ta način bomo preverili selektivnost delovanja izomerov na MAO-A in MAO-B. V naslednji stopnji bomo izvedli Wittigovo reakcijo med pripravljenimi fosfonijevimi solmi in Boc zaščitnim 4-formilpiperidinom, ki ga bomo predhodno sintetizirali iz piperidin-4-karboksilne kisline. Zmesi *cis* in *trans* izomera bomo ločili in po odstranitvi Boc zaščitne skupine alkilirali s propargilnim fragmentom. Končnim sintetiziranim spojinam bomo ovrednotili zaviralno delovanje na encimih hMAO-A in hMAO-B s pomočjo spektrofotometričnega testa na osnovi merjenja fluorescence.

A	B	C		
			D	
			E	
			F	

Slika 10: Strukture različnih substituentov, ki jih bomo pripeli preko trifenilfosfonijevih soli na *tert*-butil-4-formilpiperidin-1-karboksilat s pomočjo Wittigove reakcije.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. REAGENTI IN TOPILA

Pri eksperimentalnem delu magistrske naloge smo uporabljali reagente in topila proizvajalcev Acros Organics, Carlo Erba, Fluka, Merck in Sigma-Aldrich. Brezvodni tetrahidrofuran smo pripravili z destilacijo v argonovi atmosferi tik pred uporabo topila.

3.2. KROMATOGRFSKE METODE

3.2.1. Tankoplastna kromatografija (TLC)

Tankoplastno kromatografijo smo uporabljali za spremljanje poteka reakcij, pri izolaciji produktov ter za izbiro najustreznejše mobilne faze pri kolonski kromatografiji. Kot stacionarno fazo smo uporabljali plošče Silica Gel 60 F₂₅₄ proizvajalca Merck z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu, kot mobilno fazo pa smo uporabljali etilacetat in heksan ali dietileter in petroleter v različnih razmerjih. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabljali UV svetlobo ($\lambda = 254$ nm) in orositveni reagent ninhidrin.

3.2.2. Kolonska kromatografija

Kolonsko kromatografijo smo uporabljali za čiščenje spojin in za ločitev *cis* in *trans* izomerov spojin. Izvajali smo jo v steklenih kolonah različnih velikosti, odvisno od mase vzorca. Kot stacionarno fazo smo uporabljali Silica Gel 60 proizvajalca Merck z velikostjo delcev 0,040-0,063 mm, kot mobilno fazo pa smo uporabljali etilacetat in heksan ali dietileter in petroleter v različnih razmerjih.

3.2.3. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti smo uporabili za določevanje čistote končnih produktov. HPLC kromatograme smo posneli na instrumentu Agilent Technologies 1100 z UV-VIS detektorjem G1365B, termostatom G1316A in vzorčnikom G1313A. Uporabili smo kolono Agilent Eclipse Plus C18 column (5 μ m, 4.6 \times 150 mm. Volumen injiciranja je bil 15 μ L in pretok 1.0 mL/min. Kot mobilno fazo smo uporabili mešanico 0,1% TFA v vodi (A) in acetonitrila (B). Gradient (za B): 0–12 min, 10%–90%; 12–14 min, 90%; 14–15 min, 90%–10%.

3.3. SPEKTROSKOPSKE METODE

3.3.1. Jedrska magnetna resonanca (NMR)

Za potrditev struktur spojin smo posneli ^1H NMR spektre. Spektri so bili posneti s pomočjo spektrometra Bruker Avance III 400 MHz na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Kot topila smo uporabljali $\text{DMSO-}d_6$ in CDCl_3 , za interni standard pa TMS, glede na katerega smo določili kemijske premike v enotah ppm. Spektre smo analizirali s programom MestRe-C proizvajalca Mestrelab Research. Sklopitvene konstante (J) so podane v hertzih (Hz), za oblike vrhov pa smo uporabili naslednje oznake: s za singlet, rs za razširjen singlet, d za dublet, dd za dublet dubleta, t za triplet in m za multiplet.

3.3.2. Infrardeča spektroskopija (IR)

IR spektre smo posneli končnim spojinam na spektrometru Nicolet Nexus 470 FT-IR z uporabo ATR tehnike na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

3.3.3. Masna spektroskopija (MS)

Masni spektri so bili posneti na masnem spektrometru VG-Analytical AutoSpec Q z ESI tehniko v centru za masno spektrometrijo Inštituta Jožef Stefan v Ljubljani.

3.4. DOLOČANJE TEMPERATURE TALIŠČA

S pomočjo talilnega mikroskopa Leica z ogrevalno mizico smo določali tališča spojin. Tališča niso korigirana.

3.5. RISANJE SPOJIN IN NOMENKLATURA

Za risanje struktur in poimenovanje spojin po IUPAC nomenklaturi smo uporabili računalniški program ChemBioDraw Ultra 16.0 proizvajalca CambridgeSoft.

3.6. BIOLOŠKO TESTIRANJE

Končnim sintetiziranim spojinam smo ovrednotili zaviralno delovanje na encimih MAO-A in MAO-B s pomočjo spektrofotometričnega testa na osnovi merjenja fluorescence na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Rezultati so podani v obliki rezidualne aktivnosti encima (RA) v odstotkih ali vrednosti IC_{50} .

Pri metodi določevanja zaviralne aktivnosti MAO smo uporabili membranske izooblike MAO iz celic žuželk, okuženih z rekombinantnim bakulovirusom, ki vsebuje cDNA za

izražanje humane MAO-A ali MAO-B (Sigma Aldrich). Iz fosfatnega pufra (0,05 M, pH 7,4) smo pripravili raztopine spojin. Čisti encim MAO-A ali MAO-B potreben za oksidacijo 165 pmol *p*-tiramina/min in pripravljene raztopine spojin smo inkubirali 15 minut pri 37 °C. Po inkubaciji smo dodali 200 µM reagenta Amplex® Red, 2 U/ml hrenove peroksidaze in 1 mM *p*-tiramina kot skupnega substrata za MAO-A in MAO-B. Nastajanje H₂O₂, kataliziranega z izooblikami MAO, smo detektirali s pomočjo reagenta Amplex® Red z visoko občutljivostjo, ki reagira s H₂O₂ v prisotnosti hrenove peroksidaze in pri tem sorazmerno nastane fluorescentni produkt resorufin. Slednjemu smo 15 minut merili fluorescenco pri valovni dolžini 590 nm, in sicer v obdobju, ko je fluorescenca naraščala linearno.

Določitev vrednosti RA smo merili pri koncentraciji 100 µM in jih izračunali s pomočjo naslednje enačbe:

$$RA (\%) = \frac{v_1 - b}{v_0 - b} \times 100$$

v_1 – hitrost naraščanja fluorescence ob prisotnosti zaviralca,

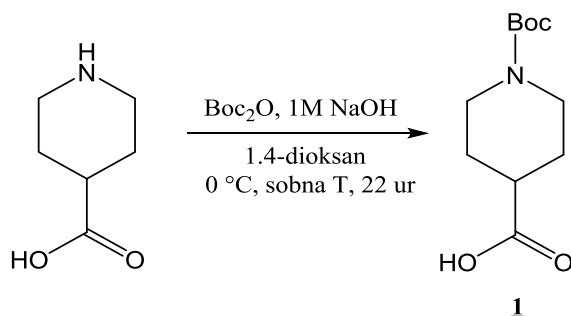
v_0 – hitrost naraščanja fluorescence ob odsotnosti zaviralca,

b – slepa vrednost (hitrost naraščanja fluorescence ob odsotnosti encima).

Spojinam, ki so imele izmerjeno vrednost RA nižjo od 50 %, torej je bilo delovanje encima zavrto več kot 50 %, smo nadalje izračunali vrednost IC₅₀. Pri spojinah, ki so šibkejši zaviralci (RA > 50 %), bi se pojavile težave s topnostjo pri višjih koncentracijah, zato tem ni smiselno izračunati vrednosti IC₅₀. Za izračun vrednosti IC₅₀ smo uporabili 7 različnih koncentracij zaviralca, ki smo jih določili na podlagi predhodno določene RA. Pomembno je, da so koncentracije spojine takšne, da je RA znotraj linearnega območja (od 5 % do vsaj 85 %). IC₅₀ vrednosti smo izračunali s prileganjem krivulje tem eksperimentalnim podatkom.

4. EKSPERIMENTALNO DELO

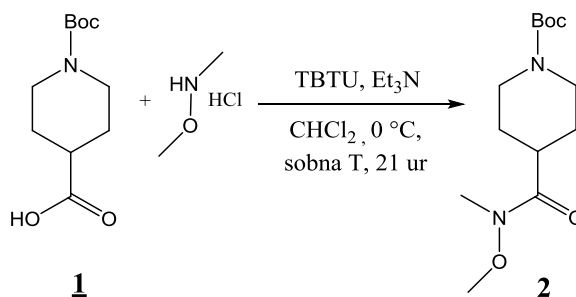
4.1. Sinteza 1-(*tert*-butoksikarbonil)piperidin-4-karboksilne kisline



Piperidin-4-karboksilno kislino (15,015 g; 116,1 mmol; 1,0 ekv.) smo raztopili v zmesi 1,4-dioksana (75 mL) in 1 M NaOH (116,1 mL; 116,1 mmol; 1,0 ekv.) ter ohladili na ledu (0 °C). Med mešanjem na magnetnem mešalu smo reakcijski zmesi po kapljicah v intervalu 30 minut dodali raztopino Boc₂O (31,50 g; 139,3 mmol; 1,2 ekv.) v 1,4-dioksanu (80 mL). Nastalo suspenzijo smo pustili mešati pri sobni temperaturi 22 ur. Spojino smo izolirali tako, da smo 1,4-dioksan uparili pod znižanim tlakom, vodni preostanek prenesli v lij ločnik ter ekstrahirali z Et₂O (2x100 mL). Vodno fazo smo nakisali z 2 M HCl do pH 2-3. Nastale kristale smo odfiltrirali pod znižanim tlakom, sprali s hladno prečiščeno vodo (80 mL) in jih posušili čez noč v sušilniku pri 50 °C. Masa posušenih kristalov je bila 19,783 (spojina **1**).

<i>1</i>-(<i>tert</i>-butoksikarbonil-piperidin-4-karboksilna kislina (1))	
Molekulska formula: C ₁₁ H ₁₉ NO ₄	M _r : 229,28 g/mol
Izgled: beli kristali	T _{tal} : 158-160 °C
Izkoristek: 74,2 %	Rf: 0,68 (EtOAc/heksan = 2/1, v/v)
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃):	δ [ppm] = 1,46 (s, 9H, (CH ₃) ₃); 1,62-1,69 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 1,88-1,94 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 2,48 (tt, 1H, J ₁ = 10,9 Hz, J ₂ = 3,9 Hz, piperidin- <i>H</i>); 2,82-2,89 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 4,04 (td, 2H, J ₁ = 13,6 Hz, J ₂ = 3,7 Hz, 2x piperidin- <i>H</i>); 9,13 (rs, 1H, COOH)

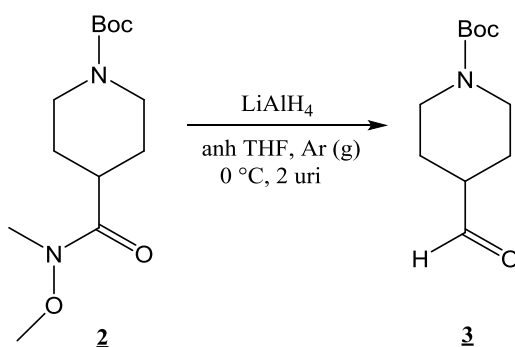
4.2. Sinteza *tert*-butil 4-(metoksi(metil)karbamoil)piperidin-1-karboksilata



Spojino **1** (15,00 g; 65,43 mmol; 1,0 ekv.) smo raztopili v 200 mL CH₂Cl₂ ter ohladili na 0 °C. Med mešanjem smo dodali Et₃N (22,665 mL; 163,58 mmol; 2,5 ekv.) in TBTU (22,05 g; 68,71 mmol; 1,05 ekv.). Po 30 minutnem mešanju na ledeni kopeli smo reakcijski zmesi dodali *N,O*-dimetilhidroksilaminijev klorid (7,65 g; 78,52 mmol; 1,2 ekv.) ter nastalo raztopino pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Sledila je izolacija; raztopino smo prenesli v lij ločnik in spirali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2x100 mL), 1 M HCl (1x100 mL) ter nasičeno raztopino NaCl (1x100 mL). Organsko fazo smo posušili nad brezvodnim NaSO₄, prefiltrirali ter uparili CH₂Cl₂ pod znižanim tlakom. Dobili smo 17.021 g spojine **2**.

<i>Tert</i>-butil 4-(metoksi(metil)karbamoil)piperidin-1-karboksilat (2)	
Molekulska formula: C ₁₃ H ₂₄ N ₂ O ₄	M _r : 272,35 g/mol
Izgled: prozorno olje	T _{tal} : / (olje)
Izkoristek: 95,6 %	Rf: 0,65 (EtOAc/heksan = 1/2, v/v)
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃):	δ [ppm] = 1,46 (s, 9H, (CH ₃) ₃); 1,57-1.68 (m, 4H, 4x piperidin- <i>H</i>); 2,73-2,84 (m, 3H, 3x piperidin- <i>H</i>); 3,16 (s, 3H, N-CH ₃); 3,69 (s, 3H, O-CH ₃); 4,15 (td, 2H, J ₁ = 13,4 Hz, J ₂ = 2,9 Hz, 2x piperidin- <i>H</i>)

4.3. Sinteza *tert*-butil-4-formilpiperidin-1-karboksilata



Spojino **2** (15,00 g; 55,0 mmol; 1,0 ekv.) smo raztopili v brezvodnem THF (120 mL) in ohladili na 0 °C. Po 10 minutah mešanja pod argonovo atmosfero smo dodali LiAlH₄ (3,154 g; 49,73 mmol; 1,5 ekv.) v manjših obrokih v obdobju 15 minut. Reakcijsko zmes smo pustili mešati na ledeni kopeli 2 uri. Reakcijo smo ustavili z dodatkom nasičene vodne raztopine NaHCO₃ (30 mL) po kapljicah. Nastalo suspenzijo smo prenesli v lij ločnik in ekstrahirali z EtOAc (3x100 mL). Združene organske faze smo spirali z nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (1x100 mL), 1 M HCl (1x100 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1x80 mL). Nato smo organsko fazo posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali ter topilo uparili pod znižanim tlakom. Nastalo olje smo posušili z vakuumsko črpalko (20 minut) in tako dobili 8.827 g spojine **3**.

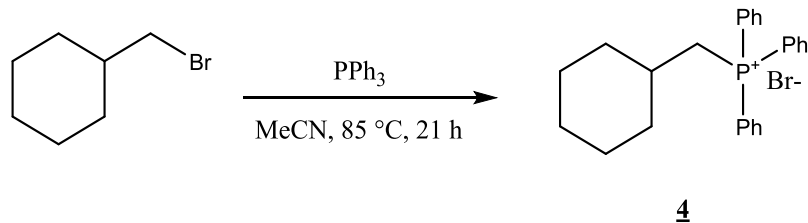
<i>Tert</i> -butil-4-formilpiperidin-1-karboksilat (3)	
Molekulska formula: C ₁₁ H ₁₉ NO ₃	M _r : 213,14 g/mol
Izgled: prozorno olje	T _{tal} : / (olje)
Izkoristek: 79,4 %	Rf: 0,68 (EtOAc/heksan = 2/1, v/v)
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃):	δ [ppm] = 1,29 (qd, J ₁ = 10,0, J ₂ = 4,0 Hz, 1H); 1,46 (s, 9H); 1,57-1,68 (m, 1H, piperidin-H); 1,78-1,93 (m, 3H); 2,94-3,07 (m, 2H); 3,14-3,23 (m, 2H); 4,07-4,17 (m, 2H); 4,82 (t, J = 6,4 Hz, 1H)

4.4. SINTEZNI POSTOPEK A: Sinteza Wittigovih reagentov

Izhodni halogenid (1,0 ekv.) smo raztopili v MeCN (25 mL) ter pri sobni temperaturi dodali PPh₃ (1,0 ekv.). Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč na oljni kopeli pri 85 °C. Spojino smo izolirali tako, da smo topilo odparili pod znižanim tlakom, preostanku dodali CH₂Cl₂ (~20 mL) in Et₂O (~35 mL) ter oborino filtrirali pod znižanim tlakom.

Produkt smo sušili čez noč pri sobni T in ga brez dodatnega čiščenja uporabili v naslednji stopnji reakcije.

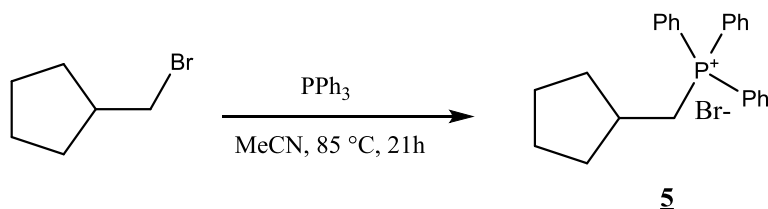
4.4.1. Sinteza (1-metilcikloheksil)trifenilfosfonijevega bromida



Raztopini (*bromometil*)cikloheksana (2,075 mL; 15,0 mmol; 1,0 ekv.) smo dodali PPh₃ (3,934 g; 15,0 mmol; 1,0 ekv.) ter po postopku A dobili 3,334 g spojine **4**.

(1-metilcikloheksil)trifenilfosfonijev bromid (4)	
Molekulska formula: C ₂₅ H ₂₈ BrP	M _r : 439,38 g/mol
Izgled: bela amorfna snov	T _{tal} : 185-187 °C
Izkoristek: 65,7 %	MS (ESI): 439,25 M ⁺

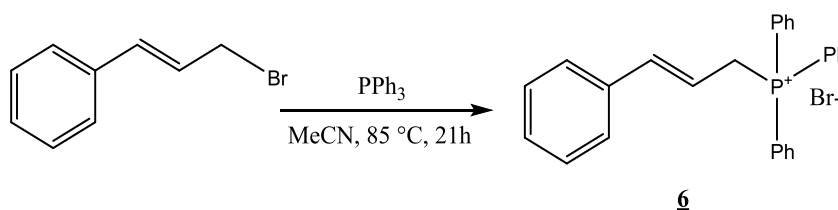
4.4.2. Sinteza (1-metilciklopentil)trifenilfosfonijevega bromida



Raztopini (*bromometil*)ciklopentana (0,466 mL; 3,0 mmol; 1,0 ekv.) smo dodali PPh₃ (0,750 g; 3,0 mmol; 1,0 ekv.) ter po postopku A dobili 0,750 g spojine **5**.

(1-metilciklopentil)trifenilfosfonijev bromid (5)	
Molekulska formula: C ₂₄ H ₂₆ BrP	M _r : 425,35 g/mol
Izgled: bela amorfna snov	T _{tal} : 184-187 °C
Izkoristek: 63,2 %	MS (ESI): 425,25 M ⁺

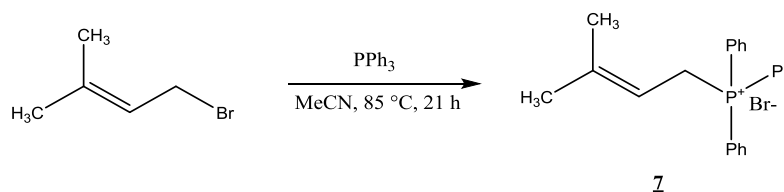
4.4.3. Sinteza (fenil-1-propen)trifenilfosfonijevega bromida



Raztopini 3-bromo-1-fenil-propena (2,956 mL; 15,0 mmol; 1,0 ekv.) smo dodali PPh₃ (3,934 g; 15,0 mmol; 1,0 ekv.) ter po postopku A dobili 5,474 g spojine **6**.

<i>(fenil-1-propen)trifenilfosfonijev bromid (6)</i>	
Molekulska formula: C ₂₇ H ₂₄ BrP	M _r : 459,37 g/mol
Izgled: bela amorfna snov	T _{tal} : 226-229 °C
Izkoristek: 80,5%	MS (ESI): 459,31 M ⁺

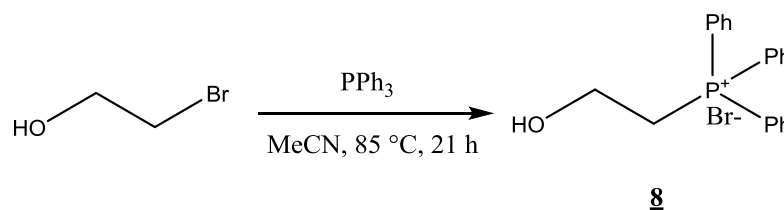
4.4.4. Sinteza (3,3-dimetilalil)trifenilfosfonijevega bromida



Raztopini 3,3-dimetilalilbromida (1,35 mL; 11,6 mmol; 1,0 ekv.) smo dodali PPh₃ (3,043 g; 11,6 mmol; 1,0 ekv.) ter po postopku A dobili 4,330 g spojine **7**.

<i>(3,3-dimetilalil)trifenilfosfonijev bromid (7)</i>	
Molekulska formula: C ₂₃ H ₂₄ BrP	M _r : 411,32 g/mol
Izgled: bela amorfna snov	T _{tal} : 220-224 °C
Izkoristek: 88,0 %	MS (ESI): 411,17 M ⁺

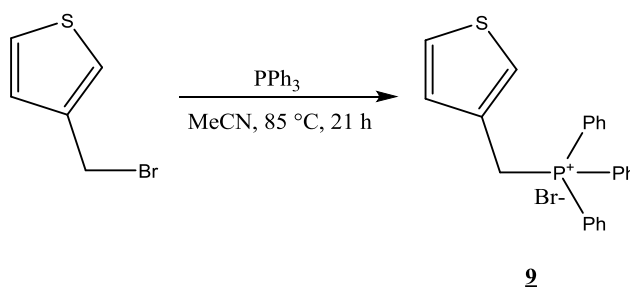
4.4.5. Sinteza (2-hidroksietil)trifenilfosfonijevega bromida



Raztopini 2-bromoetanol (1,42 mL; 20,0 mmol; 1,0 ekv.) smo dodali PPh₃ (5,246 g; 20,0 mmol; 1,0 ekv.) ter po postopku A dobili 5,799 g spojine **8**.

<i>(2-hidroksietil)trifenilfosfonijev bromid (8)</i>	
Molekulska formula: C ₂₀ H ₂₀ BrOP	M _r : 387,26 g/mol
Izgled: bela amorfna snov	T _{tal} : 195-200 °C
Izkoristek: 41,1 %	MS (ESI): 387,06 M ⁺

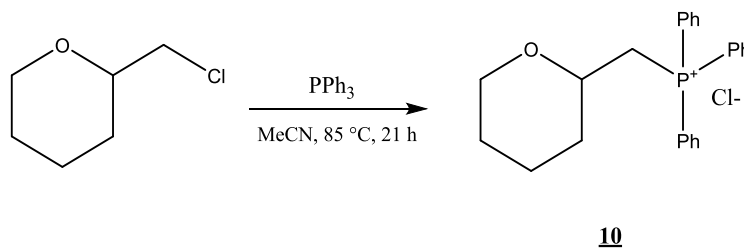
4.4.6. Sinteza trifenil(3-metiltiofen)fosfonijevega bromida



3-(bromometil)tiofenu (1,0 g; 5,65 mmol; 1,0 ekv.) smo dodali PPh₃ (1,482 g; 5,65 mmol; 1,0 ekv.) ter po postopku A dobili 2,221 g spojine **9**.

<i>trifenil(tiofen-3-il-metil)fosfonijev bromid (9)</i>	
Molekulska formula: C ₂₃ H ₂₀ BrPS	M _r : 439,35 g/mol
Izgled: bela amorfna snov	T _{tal} : 195-200 °C
Izkoristek: 41,1 %	MS (ESI): 439,14 M ⁺

4.4.7. Sinteza trifenil((tetrahidro-2H-piran-2-il)metil)fosfonijevega klorida

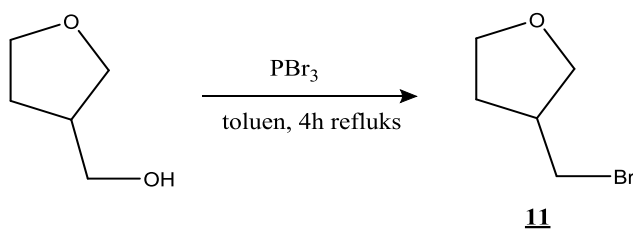


Raztopino 2-(klorometil)tetrahidro-2H-pirana (2,686 mL; 20,0 mmol; 1,0 ekv.) smo raztopili v 40 mL acetonitrila ter pri sobni T dodali PPh₃ (5,246 g; 20,0 mmol; 1,0 ekv.).

Reakcijsko zmes smo mešali pri 85 °C 21 ur. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom ter produkt sušili čez noč pri sobni T (ker se je zelo slabo raztapljal v CH₂Cl₂ in Et₂O). Dobili smo 6,500 g spojine **10**.

<i>trifenil((tetrahidro-2H-piran-2-il)metil)fosfonijev klorid (10)</i>	
Molekulska formula: C ₂₄ H ₂₆ ClOP	M _r : 396,89 g/mol
Izgled: svetlo rumeni kristali	T _{tal} : /
Izkoristek: 82,2 %	MS (ESI): 396,18 M ⁺

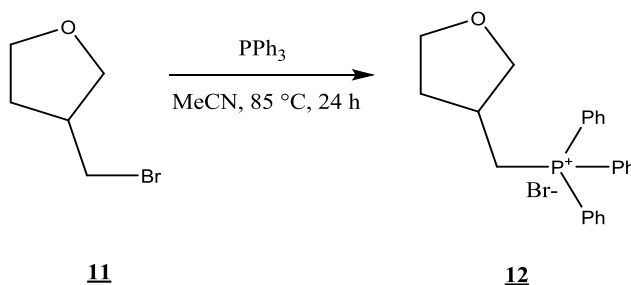
4.4.8. Sinteza 3-(bromometil)tetrahydrofurana



V 50 mL bučko smo odmerili 20 mL toluena ter dodali *tetrahidro-3-furanilmetanol* (1,0 mL; 10,0 mmol; 1,0 ekv.) in PBr₃ (1,5 mL; 15,0 mmol; 1,5 ekv.). Reakcijsko zmes smo pustili mešati pod refluxom 4 ure. Potem smo počakali, da se je reakcijska zmes ohladila na sobno temperaturo, odparili toluen pod znižanim tlakom ter dodali 40 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃. Dobljeno raztopino smo prenesli v lij ločnik ter ekstrahirali z CH₂Cl₂ (2x60 mL). Združene organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl (1x80 mL), jih posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali ter uparili CH₂Cl₂ pod znižanim tlakom. Dobili smo 0,740 g spojine **11**.

<i>3-(bromometil)tetrahydrofuran (11)</i>	
Molekulska formula: C ₅ H ₉ BrO	M _r : 165,03 g/mol
Izgled: prozorno olje	T _{tal} : / (olje)
Izkoristek: 45,0 %	Rf: 0,68 (EtOAc/n-heksan = 2/1 v/v)

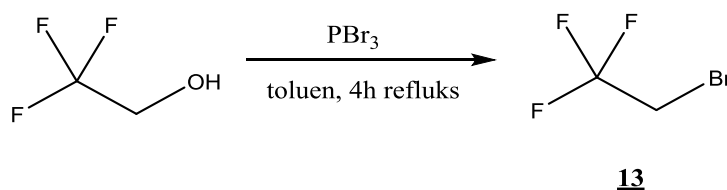
4.4.9. Sinteza trifenil((tetrahidrofuran-3-il)metil)fosfonijevega bromida



Spojini **11** (0,740 g; 4,5 mmol; 1,0 ekv.) smo dodali PPh₃ (1,176 g; 4,5 mmol; 1,0 ekv.) ter po postopku A dobili 1,7 g spojine **12**.

<i>trifenil((tetrahidrofuran-3-il)metil)fosfonijev bromid (12)</i>	
Molekulska formula: C ₂₃ H ₂₄ BrOP	M _r : 427,32 g/mol
Izgled: bela amorfna snov	T _{tal} : 210-215 °C
Izkoristek: 63,2 %	MS (ESI): 427,15 M ⁺

4.4.10. Sinteza 2-bromo-1,1,1-trifluoroetana



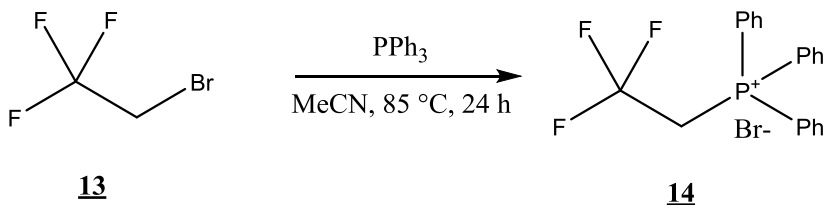
V 100 mL bučko smo odmerili 40 mL toluena ter dodali 2,2,2-trifluoroetanol (4,3 mL; 60,0 mmol, 1,0 ekv.) in PBr₃ (8,4 mL; 90,0 mmol; 1,5 ekv.). Reakcijsko zmes smo pustili mešati pod refluksom 4 ure. Potem smo počakali, da se je reakcijska zmes ohladila na sobno T, odparili toluen pod znižanim tlakom ter dodali 50 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃. Dobljeno raztopino smo prenesli v lij ločnik ter ekstrahirali z CH₂Cl₂ (2x80 mL). Združene organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl (1x100 mL), ter jih posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali ter uparili CH₂Cl₂ pod znižanim tlakom. Dobili smo 2,2 g spojine **13**.

<i>2-bromo-1,1,1-trifluoroetan (13)</i>	
Molekulska formula: C ₂ H ₂ BrF ₃	M _r : 162,94 g/mol
Izgled: bela amorfna snov	T _{tal} : 80-84 °C

Izkoristek: 61,4 %

Rf: 0,60 (EtOAc/heksan = 1/ 2)

4.4.11. Sinteza trifenil(2,2,2-trifluoroetil)fosfonijevega bromida



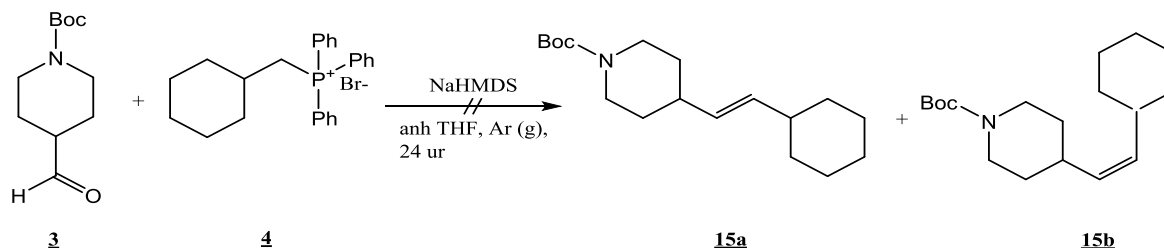
Spojini **13** (1,952 g; 12,0 mmol; 1,0 ekv.) smo dodali PPh₃ (3,148 g; 12,0 mmol; 1,0 ekv.) ter po postopku A dobili 4,014 g spojine **14**.

<i>trifenil(2,2,2-trifluoroetil)fosfonijev bromid (14)</i>	
Molekulska formula: C ₂₀ H ₁₇ BrF ₃ P	M _r : 425,23 g/mol
Izgled: bela amorfna snov	T _{tal} : 80-84 °C
Izkoristek: 79,1 %	MS (ESI): 425,08 M ⁺

4.5. SINTEZNI POSTOPEK B: Wittigova reakcija

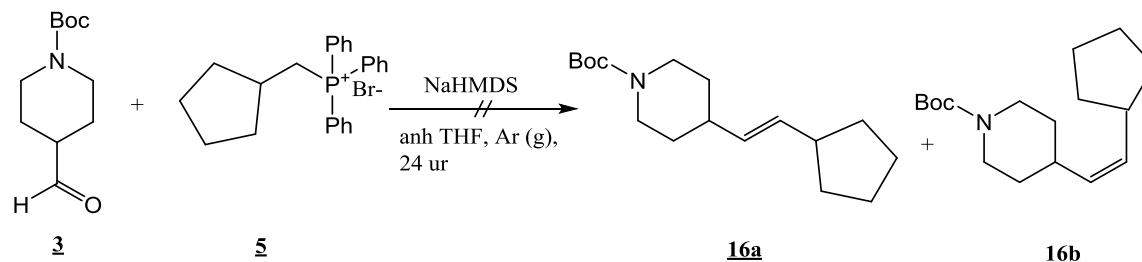
Ustrezen Wittigov reagent, ki smo ga sintetizirali po postopku A (1,1 ekv.), smo raztopili v brezvodnem THF (30 mL) pod argonovo atmosfero. Nastali suspenziji smo pri sobni temperaturi dodali NaHMDS (1,2 ekv., 2M raztopina v THF). Reakcijska zmes se je obarvala rdečeoranžno. Po 30 minutah mešanja v argonovi atmosferi smo po kapljicah dodali raztopino Boc zaščitene 4-formilpiperidina (1,0 ekv.) v brezvodnem THF (10 mL). Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Reakcijo smo ustavili z dodatkom nasičene vodne raztopine NaHCO₃ po kapljicah (10- 15 mL). Topilo smo uparili pod znižanim tlakom, beli preostanek raztopili v EtOAc (50 mL) in nasičeni vodni raztopini NaHCO₃ (50 mL) ter prenesli v lij ločnik. Fazi sta se ločili, nato pa smo organsko fazo spirali z nasičeno raztopino NaCl (2x50 mL). Združene organske faze smo posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali ter odparili EtOAc pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo ter tako dobili *cis* in *trans* izomera.

4.5.1. Sinteza *tert*-butil (*E*)-4-(2-cikloheksilvinil)piperidin-1-karboksilata in *tert*-butil (*Z*)-4-(2-cikloheksilvinil)piperidin-1-karboksilata



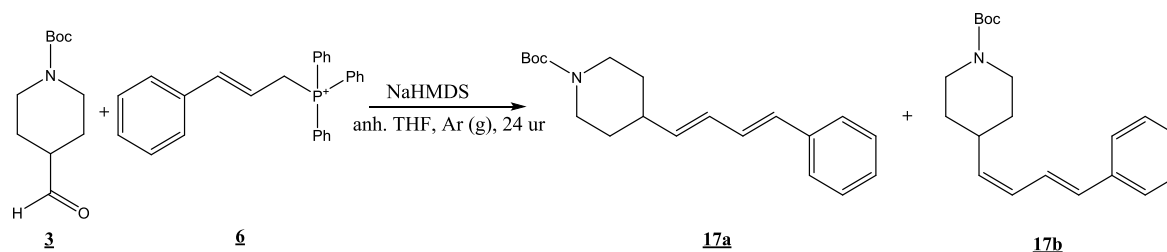
Iz spojine **3** (1,46 g; 7,0 mmol; 1,0 ekv.), **4** (3,3 g; 7,7 mmol; 1,0 ekv.) in NaHMDS (2M raztopina v THF; 4,2 mL; 8,4 mmol; 1,2 ekv.) nam po splošnem postopku B ni uspelo sintetizirati spojin **15a** in **15b**.

4.5.2. Sinteza *tert*-butil (*E*)-4-(2-ciklopentilvinil)piperidin-1-karboksilata in *tert*-butil (*Z*)-4-(2-ciklopentilvinil)piperidin-1-karboksilata



Iz spojine **3** (0,32 g; 1,5 mmol; 1,0 ekv.), **5** (0,7 g; 1,65 mmol; 1,1 ekv.) in NaHMDS (2M raztopina v THF; 1,0 mL; 1,8 mmol; 1,2 ekv.) nam po splošnem postopku B ni uspelo sintetizirati spojin **16a** in **16b**.

4.5.3. Sinteza *tert*-butil 4-((1*E*,3*E*)-4-fenilbut-1,3-dien-1-il)piperidin-1-karboksilata in *tert*-butil 4-((1*Z*,3*E*)-4-fenilbut-1,3-dien-1-il)piperidin-1-karboksilata



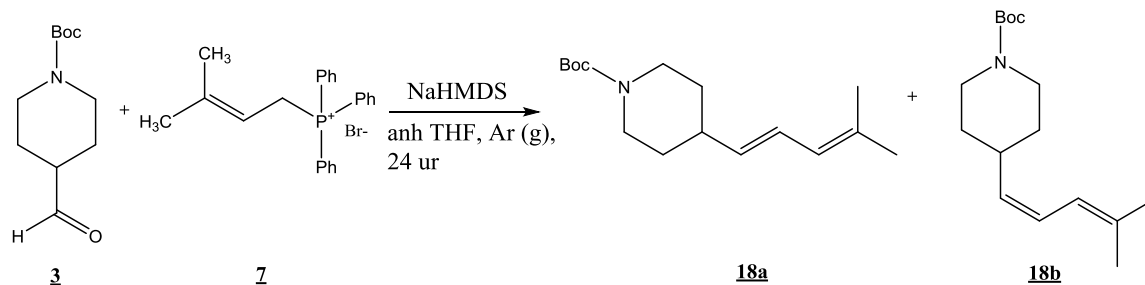
Iz spojine **3** (2,2 g; 10,8 mmol; 1,0 ekv.), **6** (5,0 g; 11,88 mmol; 1,1 ekv.) in NaHMDS (2M raztopina v THF; 6,0 mL; 13,0 mmol; 1,2 ekv.) smo po splošnem postopku B dobili zmes

cis in *trans* izomera. Izomera smo ločili s pomočjo kolonske kromatografije (MF: Et₂O/petroleter = 1/8, v/v).

<i>Terc-butil 4-((1E, 3E)-4-fenilbut-1,3-dien-1-il)piperidin-1-karboksilat (17a)</i>	
Molekulska formula: C ₂₀ H ₂₇ NO ₂	M _r : 313,20 g/mol
Izgled: svetlo rumeno olje	T _{tal} : / (olje)
Izkoristek: 29,4 %	Rf: 0,20 (Et ₂ O/petroleter = 1/8, v/v)
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃):	δ [ppm] = 1,31 (dt, 1H, J ₁ = 12,3 Hz, J ₂ = 4,5 Hz, piperidin-H); 1,34 (dt, 1H, J ₁ = 12,3 Hz, J ₂ = 4,5 Hz, piperidin-H); 1,47 (s, 9H, (CH ₃) ₃); 1,69-1,74 (m, 2H, 2x piperidin-H); 2,17-2,27 (m, 1H, piperidin-H); 2,76 (t, 2H, J = 11,6 Hz, 2x piperidin-H); 4,05-4,18 (m, 2H, 2x piperidin-H); 5,76 (dd, 1H, J ₁ = 15,3 Hz, J ₂ = 6,9 Hz, CH=CH); 6,21 (dd, 1H, J ₁ = 15,3 Hz, J ₂ = 10,4 Hz, CH=CH); 6,48 (d, 1H, J = 15,7 Hz, Ar-CH=CH); 6,7 (dd, 1H, J ₁ = 15,3 Hz, J ₂ = 10,7 Hz, Ar-CH=CH); 7,18-7,22 (m, 1H, ArH); 7,28-7,33 (m, 2H, ArH); 7,36-7,39 (m, 2H, J ₁ = 8,4 Hz, J ₂ = 1,2 Hz, ArH)
MS (ESI):	314,29 [M+H] ⁺

<i>Terc-butil 4-((1Z, 3E)-4-fenilbut-1,3-dien-1-il)piperidin-1-karboksilat (17b)</i>	
Molekulska formula: C ₂₀ H ₂₇ NO ₂	M _r : 313,20 g/mol
Izgled: svetlo rumeno olje	T _{tal} : / (olje)
Izkoristek: 19,5 %	Rf: 0,30 (Et ₂ O/petroleter = 1/8, v/v)
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃):	δ [ppm] = 1,32 (dt, 2H, J ₁ = 12,8 Hz, J ₂ = 4,2 Hz, 2x piperidin-H); 1,47 (s, 9H, (CH ₃) ₃); 1,66 (d, 2H, J = 12,6 Hz, 2x piperidin-H); 2,66-2,76 (m, 1H, piperidin-H); 2,82 (t, 2H, J = 11,9 Hz, 2x piperidin-H); 4,05-4,19 (m, 2H, 2x piperidin-H); 5,33 (t, 1H, J = 10,1 Hz, CH=CH); 6,12 (t, 1H, J = 11,0 Hz, CH=CH); 6,56 (d, 1H, J = 15,6 Hz, Ph-CH=CH); 7,03 (dd, 1H, J ₁ = 15,6 Hz, J ₂ = 11,4 Hz, Ph-CH=CH); 7,19-7,25 (m, 1H, ArH); 7,33 (t, 2H, J = 7,6 Hz, ArH); 7,41-7,44 (m, 2H, ArH)
MS (ESI):	314,20 [M+H] ⁺

4.5.4. Sinteza *tert*-butil (*E*)-4-(4-metilpent-1,3-dien-1-il)piperidin-1-karboksilata in *tert*-butil (*Z*)-4-(4-metilpent-1,3-dien-1-il)piperidin-1-karboksilata



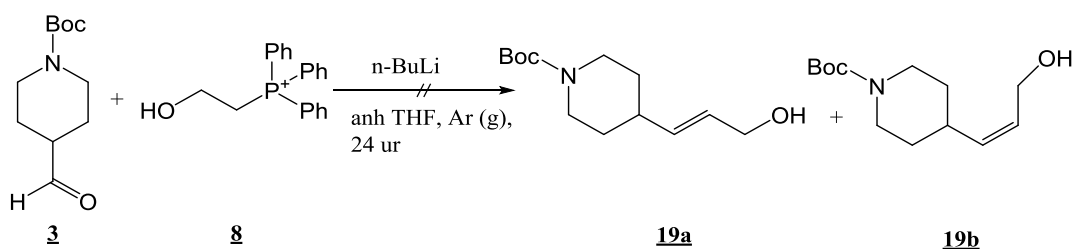
Iz spojine **3** (1,9 g; 10,2 mmol; 1,0 ekv.), **7** (4,0 g; 11,23 mmol; 1,1 ekv.) in NaHMDS (2M raztopina v THF; 5,4 mL; 12,24 mmol; 1,2 ekv.) smo po splošnem postopku B dobili zmes *cis* in *trans* izomera. Izomera smo ločili s pomočjo kolonske kromatografije (MF: CH₂Cl₂/izopropil eter/petroleter = 1/1/30, v/v).

<i>Tert</i>-butil (<i>E</i>)-4-(4-metilpent-1,3-dien-1-il)piperidin-1-karboksilat (18a)	
Molekulska formula: C ₁₆ H ₂₇ NO ₂	M _r : 265,20 g/mol
Izgled: rumeno olje	T _{tal} : / (olje)
Izkoristek: 31,0 %	Rf: 0,45 (Et ₂ O/petroleter = 1/10, v/v)
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃):	δ [ppm] = 1,27 (dt, 1H, J ₁ = 12,3 Hz, J ₂ = 4,5 Hz, piperidin- <i>H</i>); 1,30 (dt, 1H, J ₁ = 12,5 Hz, J ₂ = 4,3 Hz, piperidin- <i>H</i>); 1,45 (s, 9H, (CH ₃) ₃); 1,64-1,70 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 1,74 (s, 3H, -CH ₃); 1,76 (s, 3H, -CH ₃); 2,11-2,20 (m, 1H, piperidin- <i>H</i>); 2,74 (t, 2H, J = 11,8 Hz, 2x piperidin- <i>H</i>); 3,99-4,18 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 5,49 (dd, 1H, J ₁ = 15,2 Hz, J ₂ = 7,0 Hz, -CH=CH); 5,78 (dd, 1H, J ₁ = 10,8 Hz, J ₂ = 2,1 Hz, -CH=CH-CH=); 6,23 (ddd, 1H, J ₁ = 15,2 Hz, J ₂ = 10,8 Hz, J ₃ = 1,1 Hz, -CH=CH-CH=)
MS (ESI):	288,31 [M+Na] ⁺

<i>Tert</i>-butil (<i>Z</i>)-4-(4-metilpent-1,3-dien-1-il)piperidin-1-karboksilat (18b)	
Molekulska formula: C ₁₆ H ₂₇ NO ₂	M _r : 265,20 g/mol
Izgled: rumeno olje	T _{tal} : / (olje)
Izkoristek: 15,5 %	Rf: 0,50 (Et ₂ O/petroleter = 1/10, v/v)
¹ H NMR	δ [ppm] = 1,21-1,32 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 1,45 (s, 9H, (CH ₃) ₃);

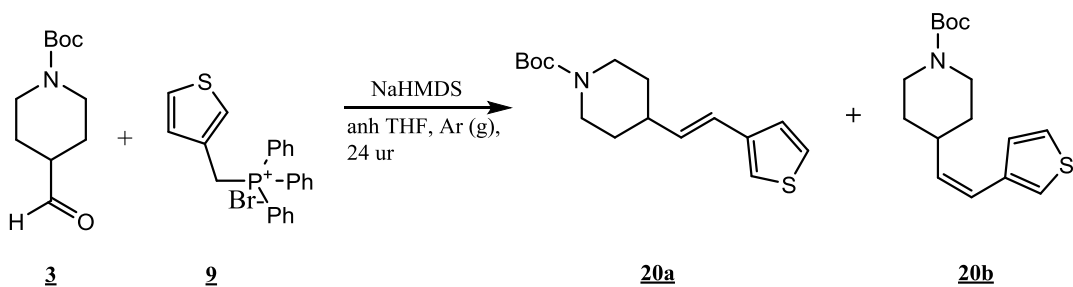
(400 MHz, CDCl ₃):	1,56-1,62 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 1,75 (s, 3H, -CH ₃); 1,81 (s, 3H, -CH ₃); 2,52-2,62 (m, 1H, piperidin- <i>H</i>); 2,72-2,82 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 3,99-4,13 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 5,13 (t, 1H, <i>J</i> ₂ = 9,9 Hz, -CH=CH-CH=); 6,05-6,18 (m, 2H, -CH=CH-CH=)
MS (ESI):	288,30 [M+Na] ⁺

4.5.5. Sinteza *tert* butil (*E*)-4-(3-hidroksiprop-1-en1-il)piperidin-1-karboksilata in *tert* butil (*Z*)-4-(3-hidroksiprop-1-en1-il)piperidin-1-karboksilata



Iz spojine **3** (2,915 g; 7,55 mmol; 1,0 ekv.), **8** (3,204 g; 8,3 mmol; 1,1 ekv.) in n-BuLi (6,16 mL; 9,1 mmol; 1,2 ekv.) nam po splošnem postopku B ni uspelo sintetizirati spojin **19a** in **19b**.

4.5.6. Sinteza *tert* butil (*E*)-4-(2-(tiofen-3-il)vinil)piperidin-1-karboksilata in *tert* butil (*Z*)-4-(2-(tiofen-3-il)vinil)piperidin-1-karboksilata



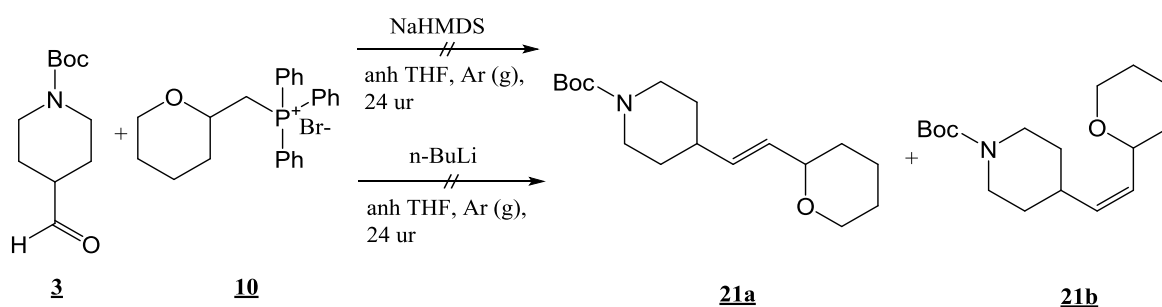
Iz spojine **3** (0,982 g; 4,5 mmol; 1,0 ekv.), **9** (2,2 g; 5,0 mmol; 1,1 ekv.) in NaHMDS (2M raztopina v THF; 2,85 mL; 5,8 mmol; 1,2 ekv.) smo po splošnem postopku B dobili produkt zmesi *cis* in *trans* izomera, ki smo ju ločili s kolonsko kromatografijo (MF: Et₂O/petroleter = 1/10, v/v).

<i>Tert</i> butil (<i>E</i>)-4-(2-(tiofen-3-il)vinil)piperidin-1-karboksilat (20a)	
Molekulska formula: C ₁₆ H ₂₃ NO ₂ S	M _r : 293,14 g/mol

Izgled: rumeni kristali	T _{tal} : >300 °C
Izkoristek: 18,2 %	Rf: 0,15 (Et ₂ O/petroleter = 1/10, v/v)
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃):	δ [ppm] = 1,29-1,43 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 1,47 (s, 9H, (CH ₃) ₃); 1,70-1,78 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 2,18-2,30 (m, 1H, piperidin- <i>H</i>); 2,17-2,85 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 4,04-4,22 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 6,00 (dd, 1H, J ₁ = 16,0 Hz, J ₂ = 6,9 Hz, CH=CH); 6,40 (d, 1H, J = 15,9 Hz, CH=CH), 7,06-7,11 (m, 1H, tiofen- <i>H</i>); 7,17-7,22 (m, 1H, tiofen- <i>H</i>); 7,24-7,28 (m, 1H, tiofen- <i>H</i>)
¹³ C NMR (100 MHz, CDCl ₃):	δ [ppm] = 28,44; 31,78; 39,22; 43,58; 46,60; 79,34; 120,93; 122,70; 124,78; 125,92; 134,28; 140,05; 154,83
MS (ESI):	316,34 [M+Na] ⁺

<i>Terc butil (Z)-4-(2-(tiofen-3-il)vinil)piperidin-1-karboksilat (20b)</i>	
Molekulska formula: C ₁₆ H ₂₃ NO ₂ S	M _r : 293,14 g/mol
Izgled: rumeno olje	T _{tal} : / (olje)
Izkoristek: 11,4 %	Rf: 0,20 (Et ₂ O/petroleter = 1/10, v/v)
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃):	δ [ppm] = 1,30-1,42 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 1,47 (s, 9H, (CH ₃) ₃); 1,66-1,74 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 2,70-2,83 (m, 3H, 3x piperidin- <i>H</i>); 4,10-4,17 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 5,41 (dd, 1H, J ₁ = 11,5 Hz, J ₂ = 9,7 Hz, CH=CH); 6,32 (d, 1H, J = 11,6 Hz, CH=CH); 7,06 (dd, 1H, J ₁ = 5,0 Hz, J ₂ = 1,2 Hz, tiofen- <i>H</i>); 7,11-7,13 (m, 1H, tiofen- <i>H</i>); 7,25-7,31 (dd, 1H, J ₁ = 4,9 Hz, J ₂ = 2,9 Hz, tiofen- <i>H</i>)
¹³ C NMR (100 MHz, CDCl ₃):	δ [ppm] = 28,41; 31,78; 35,59; 43,44; 79,30; 122,31; 122,63; 125,28; 128,26; 135,55; 138,29; 154,78
MS (ESI):	316,34 [M+Na] ⁺

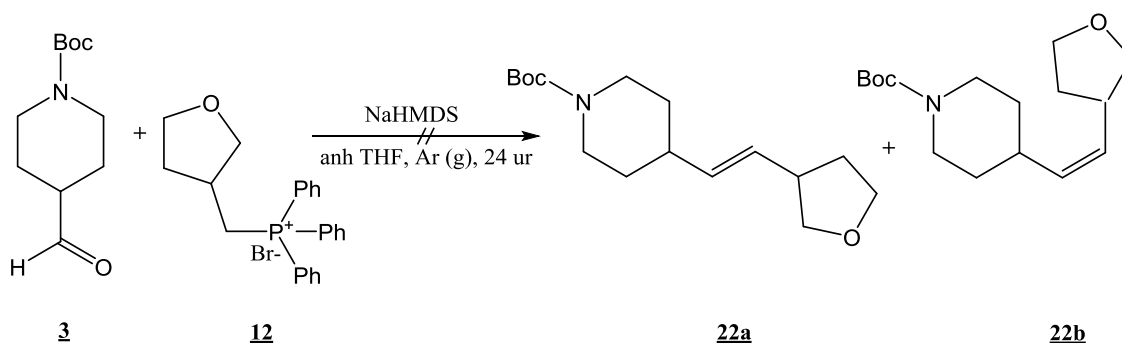
4.5.7. Sinteza *tert*-butil (*E*)-4-(2-(tetrahidro-2H-piran-2-il)vinil)piperidin-1-karboksilata in *tert*-butil (*Z*)-4-(2-(tetrahidro-2H-piran-2-il)vinil)piperidin-1-karboksilata



a) Iz spojine **3** (1,1 g; 5,5 mmol; 1,0 ekv.), **10** (2,364 g; 6,0 mmol; 1,1 ekv.) in NaHMDS (2M raztopina v THF; 3,25 mL; 6,5 mmol; 1,2 ekv.) nam po splošnem postopku B ni uspelo sintetizirati spojin **21a** in **21b**.

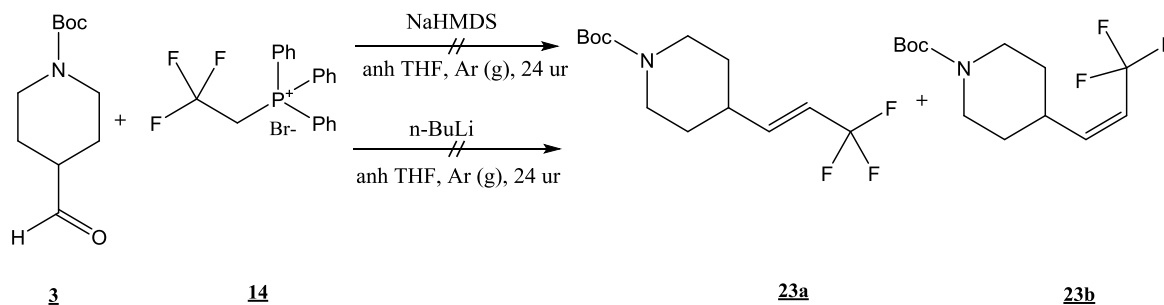
b) Iz spojine **3** (2,5 g; 12,3 mmol; 1,0 ekv.), **10** (5,373 g; 13,5 mmol; 11 ekv.) in n-BuLi (8,0 mL; 14,8 mmol; 1,2 ekv.) nam po splošnem postopku B ni uspelo sintetizirati spojin **21a** in **21b**.

4.5.8. Sinteza *tert*-butil (*E*)-4-(2-(tetrahidrofuran-3-il)vinil)piperidin-1-karboksilata in *tert*-butil (*Z*)-4-(2-(tetrahidrofuran-3-il)vinil)piperidin-1-karboksilata



Iz spojine **3** (0,75 g; 3,7 mmol; 1,0 ekv.), **12** (1,7 g; 4,0 mmol; 1,1 ekv.) in NaHMDS (2M raztopina v THF; 2,2 mL; 4,4 mmol; 1,2 ekv.) nam po splošnem postopku B ni uspelo sintetizirati spojin **22a** in **22b**.

4.5.9. Sinteza *tert*-butil (*E*)-4-(3,3,3-trifluoroprop-1-en-1-il)piperidin-1-karboksilata in *tert*-butil (*Z*)-4-(3,3,3-trifluoroprop-1-en-1-il)piperidin-1-karboksilata



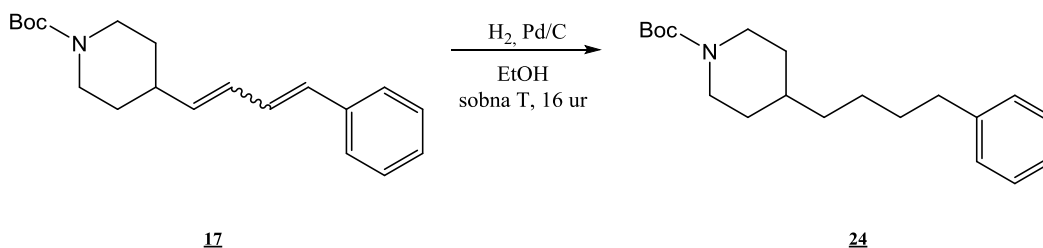
a) Iz spojine 3 (1,14 g; 5,3 mmol; 1,0 ekv.), 14 (2,508 g; 5,9 mmol; 1,1 ekv.) in NaHMDS (2M raztopina v THF; 3,5 mL; 6,4 mmol; 1,2 ekv.) nam po splošnem postopku B ni uspelo sintetizirati spojin 23a in 23b.

b) Iz spojine 3 (1,408g; 6,4 mmol; 1,0 ekv.), 14 (1,850 g; 7,0 mmol; 1,1 ekv.) in n-BuLi (3,1 mL; 7,7 mmol; 1,2 ekv.) nam po splošnem postopku B ni uspelo sintetizirati spojin 23a in 23b.

4.6. SINTEZNI POSTOPEK C: redukcija dvojne vezi

Zmes *cis* in *trans* izomera, ki smo jo dobili pri Wittigovi reakciji (1,0 ekv.), smo raztopili v brezvodnem EtOH (20 mL) in 10 minut prepihovali z argonom. Nato smo dodali 60 mg paladija na ogljiku, prepihali z vodikom ter nastalo suspenzijo mešali čez noč pri sobni temperaturi v vodikovi atmosferi. Reakcijo smo spremljali s TLC. Po 16-ih urah mešanja smo produkt filtrirali skozi celit, brezvodni EtOH pa smo odstranili pri znižanem tlaku.

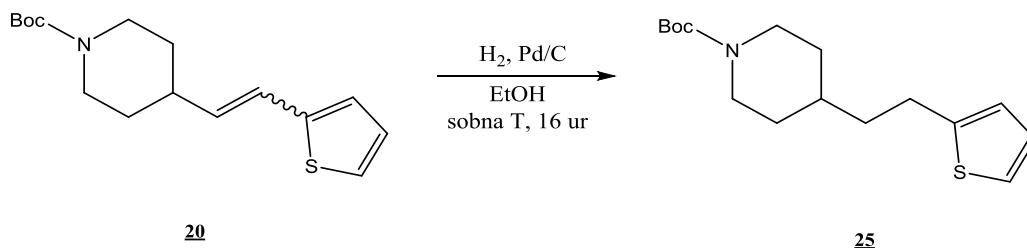
4.6.1. Sinteza *tert*-butil 4-(4-fenilbutil)piperidin-1-karboksilata



Iz spojine **17** (135 mg; 0,43 mmol; 1,0 ekv.) smo po splošnem postopku C dobili 110 mg spojine **24**.

<i>Terc-butyl 4-(4-fenilbutil)piperidin-1-karboksilat (24)</i>	
Molekulska formula: C ₂₀ H ₃₁ NO ₂	M _r : 317,24 g/mol
Izgled: svetlo rumeno olje	T _{tal} : / (olje)
Izkoristek: 81,5 %	Rf: 0,71 (EtOAc/heksan = 1/2, v/v)
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃):	δ [ppm] = 1,04 (dt, 1H, J ₁ = 12,3 Hz, J ₂ = 4,0 Hz, piperidin-H); 1,07 (dt, 1H, J ₁ = 12,3 Hz, J ₂ = 4,0 Hz, piperidin-H); 1,21-1,29 (m, 2H, CH ₂ -); 1,30-1,39 (m, 3H, 3x piperidin-H); 1,45 (s, 9H, (CH ₃) ₃); 1,56-1,64 (m, 4H, 2x CH ₂); 2,60 (t, 2H, J = 7,6 Hz, Ph- CH ₂); 2,65(t, 2H, J = 11,6 Hz, 2x piperidin-H); 3,89-4,21 (m, 2H, 2x piperidin-H); 7,15-7,19 (m, 3H, ArH); 7,25-7,30 (m, 2H, ArH)
¹³ C NMR (100 MHz, CDCl ₃):	δ [ppm] = 26,22; 28,44; 31,60; 32,14; 32,17; 35,89; 36,34; 43,82; 79,10; 125,58; 128,21; 128,33; 142,64; 154,88
MS (ESI):	340,44 [M+Na] ⁺

4.6.2. Sinteza *terc*-butil 4-(2-(tiofen-3-il)etil)piperidin-1karboksilata



Iz spojine **20** (130 mg; 0,44 mmol; 1,0 ekv.) smo po splošnem postopku C dobili 105 mg spojine **25**.

<i>Terc-butyl 4-(2-(tiofen-3-il)etil)piperidin-1karboksilat (25)</i>	
Molekulska formula: C ₁₆ H ₂₅ NO ₂ S	M _r : 295,16 g/mol
Izgled: svetlo rumeno olje	T _{tal} : / (olje)
Izkoristek: 81,6 %	Rf: 0,60 (EtOAc/heksan = 1/2, v/v)
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃):	δ [ppm] = 1,11 (dt, 1H, J ₁ = 12,4 Hz, J ₂ = 4,1 Hz, piperidin-H); 1,14 (dt, 1H, J ₁ = 12,3 Hz, J ₂ = 4,1 Hz, piperidin-H); 1,36-1,47 (m,

	1H, piperidin- <i>H</i>); 1,46 (s, 9H, (CH ₃) ₃); 1,55-1,61 (m, 2H, CH ₂ -); 1,65-1,72 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 2,63-2,71 (m, 4H, CH ₂ in 2x piperidin- <i>H</i>); 3,98-4,20 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 6,91-6,94 (m, 2H, tiofen- <i>H</i>); 7,23-7,26 (m, 1H, tiofen- <i>H</i>)
¹³ C NMR (100 MHz, CDCl ₃):	δ [ppm] = 27,25; 28,43; 32,05; 35,47; 37,21; 43,89; 79,16; 119,81; 125,26; 128,09; 142,69; 154.85
MS (ESI):	318,36 [M+Na] ⁺

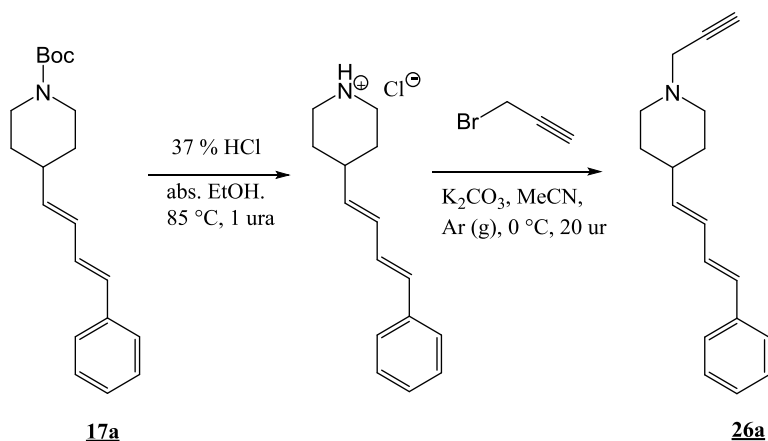
4.7. SINTEZNI POSTOPEK D: *odstranitev Boc zaščitne skupine*

Boc zaščiten derivat (1,0 ekv.) smo raztopili v brezvodnem EtOH (15 ml) ter pri sobni temperaturi dodali koncentrirano HCl (10,0 ekv.). Reakcijsko zmes smo mešali eno uro pri 85 °C. Nato smo odparili topilo pod znižanim tlakom, preostanku dodali Et₂O (2x10 mL) in ga odparili pod znižanim tlakom. Produkt, ki smo ga dobili, smo uporabili brez dodatnega čiščenja v naslednji stopnji reakcije.

4.8. SINTEZNI POSTOPEK E: *Alkiliranje piperidinskega dušika*

Piperidinskemu intermediatu v obliki soli s HCl smo dodali K₂CO₃ (5,0 ekv.) ter zmes na ledeni kopeli raztopili v MeCN (20 mL) pod argonovo atmosfero. Po 30-ih minutah mešanja smo po kapljicah dodali propargil bromid (1,2 ekv., 80 % raztopina v toluenu). Nastalo suspenzijo smo mešali 20 ur v argonovi atmosferi pri sobni temperaturi. Nato smo MeCN odparili pod znižanim tlakom, preostanku dodali EtOAc (50 mL) ter spirali z nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (2x30 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1x50 mL). Organsko fazo smo sušili nad brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali ter topilo odparili pod znižanim tlakom. Produkt, ki smo ga dobili, smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc/heksan = 1/2, v/v).

4.8.1. Sinteza 4-((1E,3E)-4-fenilbut-1,3-dien-1-il)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina

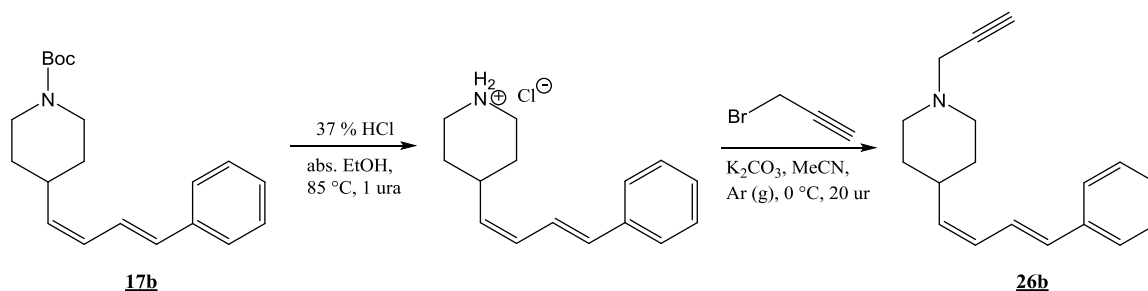


Iz spojine **17a** (90 mg; 0,280 mmol; 1,0 ekv.), 37 % HCl (0,234 mL; 2,8 mmol; 10,0 ekv.), K₂CO₃ (0,134 g; 0,840 mmol; 3,0 ekv) in propargil bromida (36,1 μL; 0,389 mmol; 1,2 ekv.) smo po splošnih postopkih D in E sintetizirali 15 mg spojine **26a**.

4-((1E,3E)-4-fenilbut-1,3-dien-1-il)-1-(prop-2-in-1-il)piperidin (26a)	
Molekulska formula: C ₁₈ H ₂₁ N	M _r : 251,17 g/mol
Izgled: rumeni kristali	T _{tal} : 55-57 °C
Izkoristek: 19,2 %	R _f : 0,24 (EtOAc/heksan = 1/2, v/v)
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃):	δ [ppm] = 1,49-1,58 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 1,73-1,80 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 2,02-2,12 (m, 1H, piperidin- <i>H</i>); 2,23-2,32 (m, 3H, 2x piperidin- <i>H</i> in C≡CH); 2,89-2,94 (m, 1H, piperidin- <i>H</i>); 3,31 (d, 2H, <i>J</i> = 2,4 Hz, NCH ₂ C); 5,78 (ddd, 1H, <i>J</i> ₁ = 15,3 Hz, <i>J</i> ₂ = 7,0 Hz, CH=CH-); 6,21 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 15,6 Hz, <i>J</i> ₂ = 10,4 Hz, CH=CH-); 6,47 (d, 1H, <i>J</i> = 15,7 Hz, Ph-CH=CH); 6,75 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 15,6 Hz, <i>J</i> ₂ = 10,3 Hz, Ph-CH=CH); 7,17-7,23 (m, 1H, Ar <i>H</i>); 7,28-7,34 (m, 2H, Ar <i>H</i>); 7,35-7,43 (m, 2H, Ar <i>H</i>)
¹³ C NMR (100 MHz, CDCl ₃):	δ [ppm] = 31,91; 38,54; 47,22; 52,19; 72,93; 79,06; 126,11; 127,14; 128,52; 128,82; 129,28; 130,58; 137,48; 139,58
IR (ATR):	ν [cm ⁻¹] = 3290, 3280, 3063, 3014, 2934, 2919, 2798, 2745, 1759, 1596, 1489, 1467, 1446, 1425, 1385, 1328, 1313, 1292, 1221, 1180, 1136, 1098, 1028, 978, 900, 869, 813, 763, 745, 693, 680, 667, 656, 641, 620, 584, 514

ESI-HRMS:	izračunana masa: 252,1752 [M+H] ⁺ ; izmerjena masa: 252,1755
HPLC:	t _R = 7,747 min (čistost 98,0 %)

4.8.2. Sinteza 4-((1Z,3E)-4-fenilbut-1,3-dien-1-il)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina

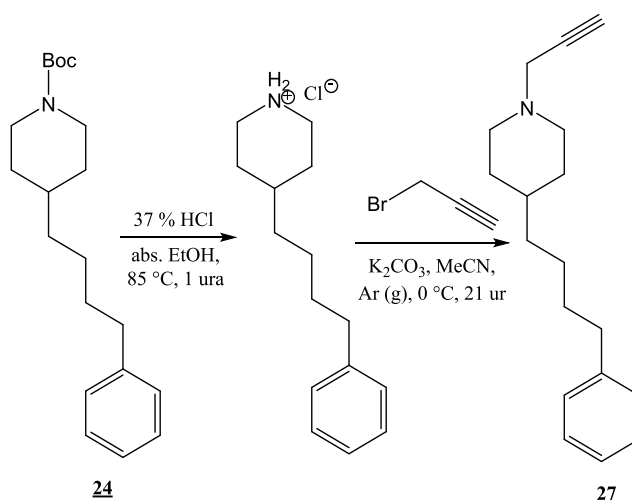


Iz spojine **17b** (35 mg; 0,100 mmol; 1,0 ekv.), 37 % HCl (83,6 μ L; 1,0 mmol; 10,0 ekv.), K₂CO₃ (0,047 g; 0,300 mmol; 1,2 ekv.) in propargil bromida (13,0 μ L; 0,120 mmol; 1,2 ekv.) smo po splošnih postopkih D in E sintetizirali 19 mg spojine **26b**.

4-((1Z,3E)-4-fenilbut-1,3-dien-1-il)-1-(prop-2-in-1-il)piperidin (26b)	
Molekulska formula: C ₁₈ H ₂₁ N	M _r : 251,17 g/mol
Izgled: rumeno olje	T _{tal} : / (olje)
Izkoristek: 69,1 %	Rf: 0,30 (EtOAc/heksan = 1/2, v/v)
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃):	δ [ppm] = 1,45-1,57 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 1,69-1,76 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 2,04-2,10 (m, 1H, piperidin- <i>H</i>); 2,27 (t, 1H, <i>J</i> = 2,4 Hz, C \equiv CH); 2,30 (dt, 2H, <i>J</i> ₁ = 11,7 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,5 Hz, 2x piperidin- <i>H</i>); 2,51-2,61 (m, 1H, piperidin- <i>H</i>); 2,88-2,93 (m, 2H, piperidin- <i>H</i>); 3,34 (d, 2H, <i>J</i> = 2,4 Hz, NCH ₂ C); 5,38 (t, 1H, <i>J</i> = 10,2 Hz, CH=CH-); 6,11 (t, 1H, <i>J</i> = 11,0 Hz, CH=CH-); 6,54 (d, 1H, <i>J</i> = 15,5 Hz, Ph-CH=CH); 7,04 (ddd, 1H, <i>J</i> ₁ = 15,5 Hz, <i>J</i> ₂ = 11,1 Hz, <i>J</i> ₃ = 1,0 Hz, Ph-CH); 7,20-7,25 (m, 1H, Ar <i>H</i>); 7,29-7,35 (m, 2H, Ar <i>H</i>); 7,41-7,44 (m, 2H, Ar <i>H</i>)
¹³ C NMR (100 MHz, CDCl ₃):	δ [ppm] = 32,33; 47,29; 52,03; 73,03; 79,02; 124,19; 126,33; 127,45; 127,84; 128,57; 132,59; 137,21; 137,43
IR (ATR):	ν [cm ⁻¹] = 3297, 3024, 2931, 2847, 2801, 2753, 1688, 1595, 1574, 1493, 1465, 1446, 1426, 1386, 1364, 1334, 1331, 1264, 1229,

	1135, 1114, 1073, 1047, 984, 966, 945, 899, 857, 784, 762, 736, 690, 675, 580, 539, 513
ESI-HRMS:	izračunana masa: 252,1752 [M+H] ⁺ ; izmerjena masa: 252,1757
HPLC:	t _R = 7,830 min (čistost 95,1 %)

4.8.3. Sinteza 4-(4-fenilbutil)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina

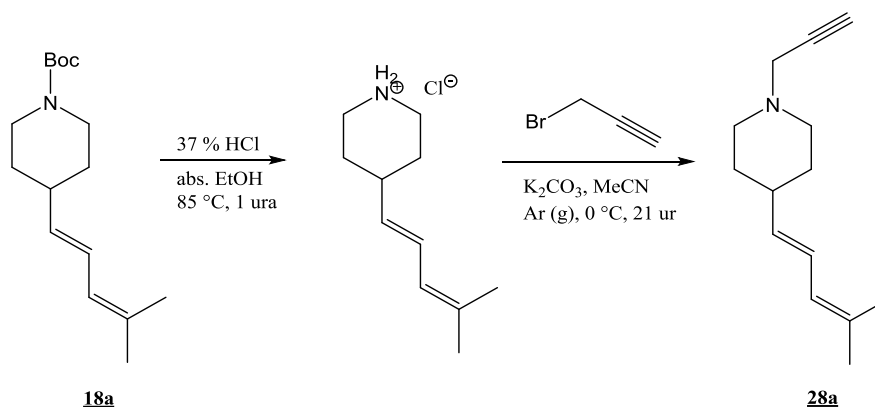


Iz spojine **24** (110 mg; 0,363 mmol; 1,0 ekv.), 37 % HCl (0,303 ml; 3,630 mmol; 10,0 ekv.), K₂CO₃ (0,180 g; 1,299 mmol; 3,0 ekv.) in propargil bromida (57,8 μL; 0,520 mmol; 1,2 ekv.) smo po splošnih postopkih D in E sintetizirali 25 mg spojine **27**.

4-(4-fenilbutil)-1-(prop-2-in-1-il)piperidin (27)	
Molekulska formula: C ₁₈ H ₂₅ N	M _r : 255,20 g/mol
Izgled: svetlo rumeno olje	T _{tal} : / (olje)
Izkoristek: 23,0 %	Rf: 0,29 (EtOAc/heksan = 1/2, v/v)
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃):	δ [ppm] = 1,21-1,39 (m, 7H, 3x piperidin- <i>H</i> in 2x CH ₂); 1,56-1,63 (m, 2H, CH ₂); 1,66-1,71 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 2,11-2,19 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 2,21 (t, 1H, <i>J</i> = 2,4 Hz, C≡CH); 2,60 (t, 2H, <i>J</i> = 7,6 Hz, Ph-CH ₂); 2,84-2,88 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 3,28 (d, 2H, <i>J</i> = 2,4 Hz, NCH ₂ C); 7,15-7,19 (m, 3H, Ar <i>H</i>); 7,24-7,29 (m, 2H, Ar <i>H</i>)
¹³ C NMR	δ [ppm] = 26,37; 31,63; 32,26; 35,09; 35,90; 36,29; 47,18; 52,61;

(100 MHz, CDCl ₃):	72,80; 79,17; 125,53; 128,18; 128,33; 142,71
IR (ATR):	ν [cm ⁻¹] = 3305, 3026, 2924, 2853, 2801, 2753, 1604, 1496, 1453, 1425, 1387, 1365, 1336, 1312, 1273, 1139, 1109, 1088, 1039, 981, 899, 784, 746, 679, 645, 622, 574, 541, 524
ESI-HRMS:	izračunana masa: 256,2065 [M+H] ⁺ ; izmerjena masa: 256,2062
HPLC:	t _R = 8,173 min (čistost 96,0 %)

4.8.4. Sinteza (*E*)-4-(-4-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina

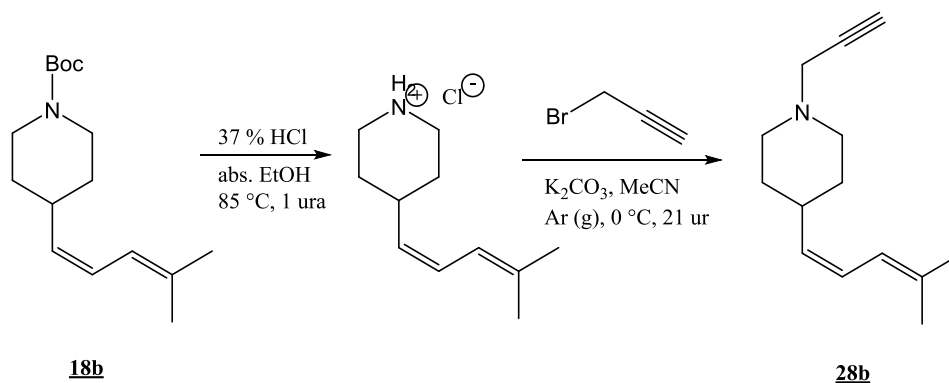


Iz spojine **18a** (10,0 mg; 0,032 mmol; 1,0 ekv), 37 % HCl (29 μ L; 0,320 mmol; 10,0 ekv.), K₂CO₃ (0,021 g; 0,149 mmol; 3,0 ekv.) in propargil bromida (6 μ L; 0,059 mmol; 1,2 ekv.) smo po splošnih postopkih D in E sintetizirali 3,8 mg spojine **28a**.

<i>(E)</i> -4-(-4-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1-(prop-2-in-1-il)piperidin (28a)	
Molekulska formula: C ₁₄ H ₂₁ N	M _r : 203,17 g/mol
Izgled: prozorno olje	T _{tal} : / (olje)
Izkoristek: 32,4 %	Rf: 0,26 (EtOAc/heksan = 1/2, v/v)
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃):	δ [ppm] = 1,42-1,52 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 11,69-1,72 (m, 1H, piperidin- <i>H</i>); 1,73 (rs, 3H, CH ₃); 1,74-1,76 (m, 4H, piperidin- <i>H</i> in CH ₃); 1,96-2,05 (m, 1H, piperidin- <i>H</i>); 2,24 (t, 1H, <i>J</i> = 2,4 Hz, C≡CH); 2,20-2,26 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 2,86-2,92 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 3,30 (d, 2H, <i>J</i> = 2,4 Hz, NCH ₂ C); 5,50 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 15,2 Hz, <i>J</i> ₂ = 7,1 Hz, -CH=CH-CH=); 5,76-5,80 (m, 1H, -

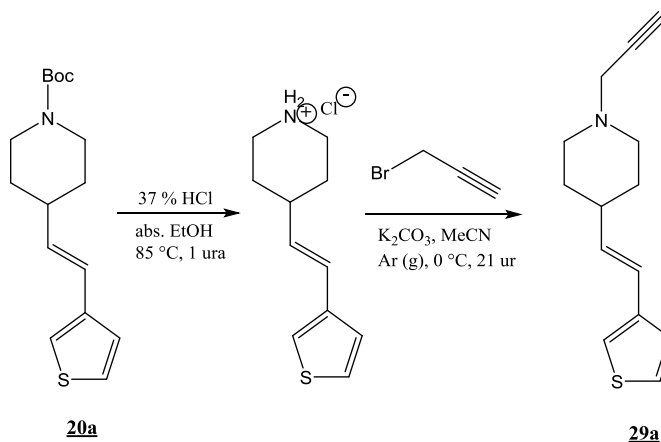
	CH=CH-CH=); 6,23 (ddd, 1H, $J_1 = 15,2$ Hz, $J_2 = 10,8$ Hz, $J_3 = 1,1$ Hz, -CH=CH-CH=)
^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3):	δ [ppm] = 18,22; 25,92; 32,20; 38,63; 47,24; 52,2; 57,91; 79,11; 124,94; 125,00; 133,64; 135,93
ESI-HRMS:	izračunana masa: 204,1705 $[\text{M}+\text{H}]^+$; izmerjena masa: 204,1708
HPLC:	$t_{\text{R}} = 9,697$ min

4.8.5. Sinteza (Z)-4-(4-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina



Iz spojine **18b** (6,0 mg; 0,002 mmol; 1,0 ekv.), 37 % HCl (18 μL ; 0,02 mmol; 10,0 ekv.), K_2CO_3 (0,012 g; 0,036 mmol; 3,0 ekv.) in propargil bromida (4 μL ; 0,036 mmol; 1,2 ekv.) nam po splošnih postopkih D in E ni uspelo sintetizirati spojine **28b**.

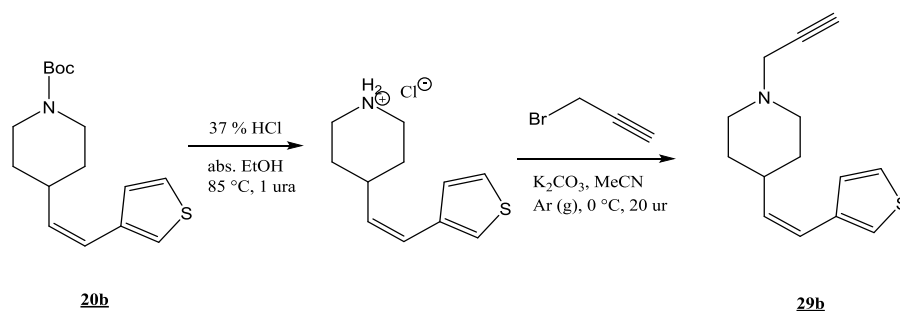
4.8.6. Sinteza (E)-1-(prop-2-in-1-il)-4-(2-(tiofen-3-il)vinil)piperidina



Iz spojine **20a** (110 mg; 0,341 mmol, 1,0 ekv.), 37 % HCl (0,285 mL; 3,270 mmol; 10,0 ekv.), K₂CO₃ (0,136 g; 0,981 mmol; 3,0 ekv.) in propargil bromida (43,6 µL; 0,392 mmol; 1,2 ekv.) smo po splošnih postopkih D in E sintetizirali 30 mg spojine **29a**.

(E)-1-(prop-2-in-1-il)-4-(2-(tiofen-3-il)vinil)piperidin (29a)	
Molekulska formula: C ₁₄ H ₁₇ NS	M _r : 231,11 g/mol
Izgled: beli kristali	T _{tal} : 50-53 °C
Izkoristek: 40,0 %	R _f : 0,25 (EtOAc/heksan = 1/2, v/v)
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃):	δ [ppm] = 1,52 (dt, 1H, <i>J</i> ₁ = 12,1 Hz, <i>J</i> ₂ = 3,7 Hz, piperidin- <i>H</i>); 1,55 (dt, 1H, <i>J</i> ₁ = 12,4 Hz, <i>J</i> ₂ = 3,7 Hz, piperidin- <i>H</i>); 1,75-1,82 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 2,04-2,14 (m, 1H, piperidin- <i>H</i>); 2,22-2,30 (m, 3H, 2x piperidin- <i>H</i> in C≡CH); 2,90-2,95 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 3,32 (d, 2H, <i>J</i> = 2,4 Hz, NCH ₂ C); 6,02 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 15,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 7,0 Hz, CH=CH); 6,39 (d, 1H, <i>J</i> ₁ = 16,0 Hz, CH=CH-); 7,12 (d, 1H, <i>J</i> = 2,5 Hz, tiofen- <i>H</i>); 7,17-7,19 (m, 1H, tiofen- <i>H</i>); 7,24-7,26 (m, 1H, tiofen- <i>H</i>)
¹³ C NMR (100 MHz, CDCl ₃):	δ [ppm] = 31,97; 38,65; 47,21; 52,22; 72,94; 79,05; 120,72; 122,64; 124,82; 125,81; 134,82; 140,18
IR (ATR):	ν [cm ⁻¹] = 3288, 3273, 3103, 3003, 2950, 2907, 2871, 2842, 2818, 2752, 1571, 1464, 1442, 1425, 1387, 1358, 1328, 1311, 1290, 1265, 1250, 1222, 1158, 1135, 1100, 1022, 975, 763, 939, 899, 862, 840, 826, 770, 684, 654, 621, 545
ESI-HRMS:	izračunana masa: 232,1160 [M+H] ⁺ ; izmerjena masa: 232,1162
HPLC:	t _R = 6,393 min (čistost 98,1 %)

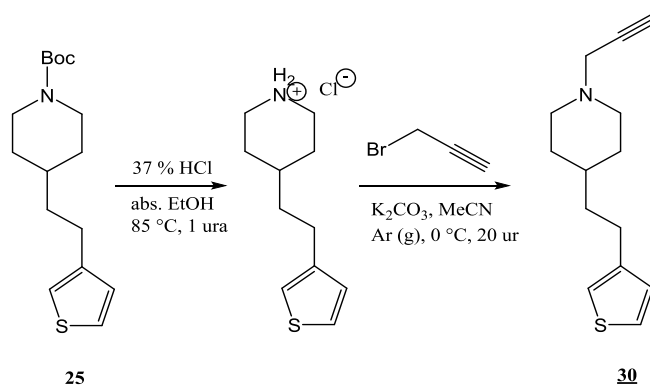
4.8.7. Sinteza (Z)-1-(prop-2-in-1-il)-4-(2-(tiofen-3-il)vinil)piperidina



Iz spojine **20b** (55 mg; 0,88 mmol; 1,0 ekv.), 37 % HCl (0,175 mL; 1,880 mmol; 10,0 ekv.), K₂CO₃ (0,073 g; 0,525 mmol; 3,0 ekv.) in propargil bromida (23,4 μL; 0,211 mmol; 1,2 ekv.) smo po splošnih postopkih D in E sintetizirali 11 mg spojine **29b**.

(Z)-1-(prop-2-in-1-il)-4-(2-(tiofen-3-il)vinil)piperidin (29b)	
Molekulska formula: C ₁₄ H ₁₇ NS	M _r : 231,11 g/mol
Izgled: brezbarvno olje	T _{tal} : / (olje)
Izkoristek: 20,5 %	Rf: 0,30 (EtOAc/heksan = 1/2, v/v)
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃):	δ [ppm] = 1,50-1,60 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 1,74-1,81 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 2,25 (t, 1H, <i>J</i> = 2,4 Hz, C≡CH); 2,29 (dt, 2H, <i>J</i> ₁ = 11,7 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,4 Hz, 2x piperidin- <i>H</i>); 2,56-2,66 (m, 1H, piperidin- <i>H</i>); 2,87-2,93 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 3,32 (d, 2H, <i>J</i> = 2,4 Hz, NCH ₂ C); 5,44 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 11,5 Hz, <i>J</i> ₂ = 9,8 Hz, CH=CH); 6,31 (d, 1H, <i>J</i> = 11,6 Hz, CH=CH); 7,07 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 4,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,0 Hz, tiofen- <i>H</i>); 7,11-7,13 (m, 1H, tiofen- <i>H</i>); 7,29 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 4,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 3,0 Hz, tiofen- <i>H</i>)
¹³ C NMR (100 MHz, CDCl ₃):	δ [ppm] = 32,06; 47,27; 51,97; 73,01; 79,01; 122,11; 122,57; 125,17; 128,39; 136,22; 138,47
IR (ATR):	ν [cm ⁻¹] = 3299, 3003, 2933, 2806, 1446, 1425, 1364, 1335, 1309, 1271, 1136, 1105, 974, 909, 869, 827, 789, 742, 677, 627, 559
ESI-HRMS:	izračunana masa: 232,1160 [M+H] ⁺ ; izmerjena masa: 232,1163
HPLC:	t _R = 6,347 min (čistost 95,6 %)

4.8.8. Sinteza 1-(prop-2-in-1-il)-4-(2-(tiofen-3-il)etil)piperidina



Iz spojine **25** (105 mg; 0,355 mmol; 1,0 ekv.) 37 % HCl (0,296 mL; 3,550 mmol; 10;0 ekv.), K₂CO₃ (0,180 g; 1,065 mmol; 3,0 ekv.) in propargil bromida (57,8 μL; 0,426 mmol; 1,2 ekv.) smo po splošnih postopkih D in E sintetizirali 26 mg spojine **30**.

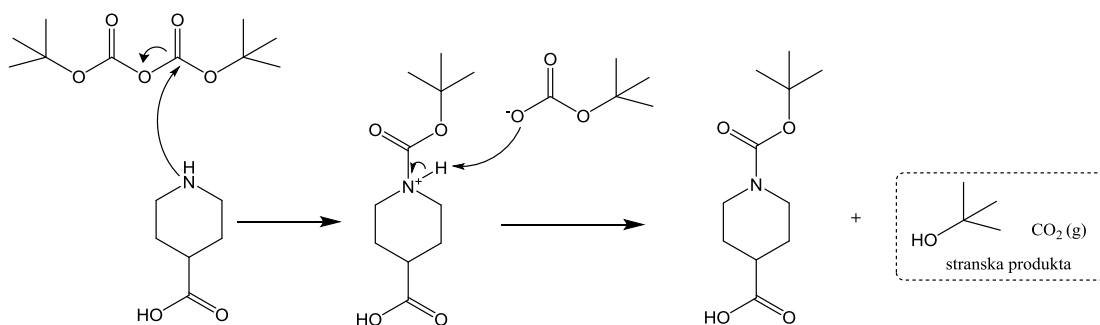
1-(prop-2-in-1-il)-4-(2-(tiofen-3-il)etil)piperidin (30)	
Molekulska formula: C ₁₄ H ₁₉ NS	M _r : 233,37 g/mol
Izgled: svetlo rumeno olje	T _{tal} : / (olje)
Izkoristek: 24,8 %	Rf: 0,20 (EtOAc/heksan = 1/2, v/v)
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃):	δ [ppm] = 1,25-1,36 (m, 3H, 3x piperidin-H); 1,55-1,61 (m, 2H, Ar-CH ₂ -CH ₂); 1,73-1,78 (m, 2H, 2x piperidin-H); 2,14-2,20 (m, 2H, 2x piperidin-H); 2,23 (t, 1H, J ₁ = 2,4 Hz, J ₂ = 2,4 Hz, C≡CH), 2,63-2,67 (m, 2H, Ar-CH ₂ -CH ₂); 2,86-2,90 (d, 2H, 2x piperidin-H); 3,29 (d, 2H, J = 2,4 Hz, NCH ₂ C); 6,91-6,94 (m, 2H, tiofen-H); 7,23-7,26 (m, 1H, tiofen-H)
¹³ C NMR (100 MHz, CDCl ₃):	δ [ppm] = 27,40; 32,12; 34,70; 37,18; 47,17; 52,50; 72,85; 79,15; 119,73; 125,16; 128,31; 142,86
IR (ATR):	ν [cm ⁻¹] = 3193, 2934, 2913, 2848, 2796, 2754, 2115, 1536, 1466, 1390, 1333, 1309, 1290, 1270, 1203, 1145, 1122, 1102, 1081, 1044, 1013, 975, 948, 917, 862, 845, 833, 776, 760, 742, 685, 683, 595, 581, 531, 518
ESI-HRMS:	izračunana masa: 234,1316 [M+H] ⁺ ; izmerjena masa: 234,1321
HPLC:	t _R = 6,510 min (čistost 97,0 %)

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. SINTEZNI DEL

5.1.1. Uvajanje Boc zaščitne skupine

Kot izhodno spojino za pripravo aldehida, ki vstopa v Wittigovo reakcijo, smo uporabili piperidin-4-karboksilno kislino, kateri smo morali zaradi večje selektivnosti v naslednjih stopnjah reakcije zaščititi aminske skupine. Uporabili smo *tert*-butiloksikarbamatno (Boc) zaščitno skupino, ki smo jo uvedli z di-*tert*-butil dikarbonatom (Boc_2O). Za Boc zaščitno skupino je značilno enostavno uvajanje, obstojnost v širokem območju pH (4-12) ter pri katalitskem hidrogeniranju, odstrani pa se enostavno v kislih pogojih (38).



Slika 11: Mehanizem uvedbe Boc zaščitne skupine. Prirejeno po (39).

Sintezo spojine **1** smo izvedli v zmesi 1,4-dioksana in 1 M NaOH. 1,4-dioksan je polarno topilo, ki se meša z vodo v vseh razmerjih, 1 M NaOH pa smo uporabili kot bazičen medij. S tem smo amino skupino iona dvojčka pretvorili v neionizirano obliko, karboksilna skupina pa je ostala ionizirana. Tako je lahko potekla nukleofilna adicija amina na elektrofilno karbonylni skupino Boc_2O . Pri izolaciji smo po uparitvi 1,4-dioksana vodno fazo nakisali z 2 M HCl, prišlo je do protonacije karboksilata. Topnost produkta v vodi se je zato zmanjšala, oborjene kristale smo odfiltrirali z odsesavanjem pod znižanim tlakom.

5.1.2. Sinteza aldehida preko Weinrebovega amida

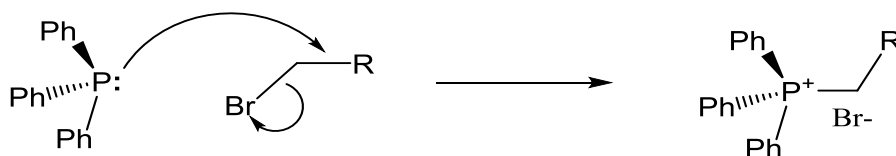
V naslednji stopnji reakcije smo iz aktivirane karboksilne kisline pripravili Weinrebov amid (spojina **2**) z *N,O*-dimetilhidroksilaminijevim kloridom. *N*-metoksi-*N*-metilamin se uporablja pri sintezi aldehydov in ketonov z zelo visokim izkoristkom reakcije. Pri reakciji ne pride do nastanka alkoholov (40). Za karboksilne kisline je značilno, da pri običajnih

pogojih ne reagirajo kot elektrofilni, saj je OH skupina slabo izstopajoča skupina, zato jih je potrebno aktivirati (povečati elektrofilnost). Za aktivacijo Boc zaščitene piperidin-4-karboksilne kisline smo uporabili sklopitveni reagent TBTU (*O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametilamonijev tetrafluoroborat). Reakcijo smo izvajali v bazičnem mediju, z uporabo trietilamina. Le ta je povzročil ionizacijo karboksilne kisline. Čez 30 minut smo v reakcijsko zmes dodali *N,O*-dimetilhidroksilaminijev klorid. Izkoristek naše reakcije je bil zelo visok (95,6 %).

V naslednji stopnji reakcije smo iz Weinrebovega amida pripravili aldehyd (spojina **3**) z LiAlH_4 . Potekla je reakcija redukcije v brezvodnem THF in v argonovi atmosferi, saj LiAlH_4 zelo burno reagira z vodo. Reakcijo smo ustavili z dodatkom nasičene vodne raztopine NaHCO_3 po kapljicah.

5.1.3. Sinteza Wittigovih reagentov

Medtem ko smo imeli aldehyd že pripravljen, smo morali iz različnih halogenidov sintetizirati še alkil trifenilfosfonijeve halide, ki nam služijo kot Wittigovi reagenti in vstopajo skupaj z aldehydom v Wittigovo reakcijo. Pretvorba halogenidov v ustrezne fosfonijeve soli je potekla po mehanizmu nukleofilne substitucije (Slika 12). Reakcijo smo izvajali pod refluksom in je pri vsakem derivatu potekala 20 – 24 ur.



Slika 12: Splošen mehanizem tvorbe trifenilfosfonijeve soli. Prirejeno po (41).

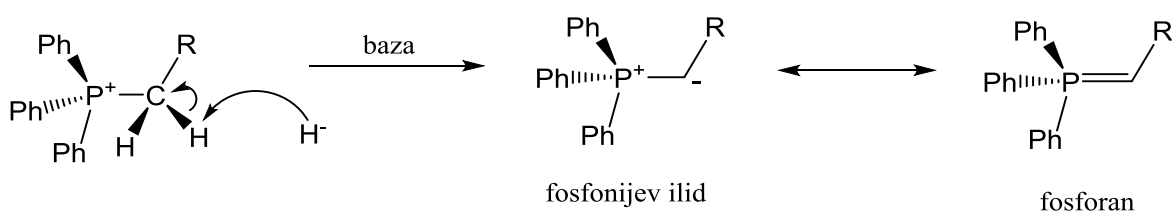
Pri sintezi spojin **12** in **14** smo iz izhodnih reagentov (alkoholov) morali najprej pripraviti alkilbromida, tako da smo hidroksilno skupino zamenjali z bromom. Uporabili smo PBr_3 ter mešali pod refluksom 4 ure. Reakcija je potekla po mehanizmu nukleofilne substitucije (S_2N).

Reakcije so pri vseh produktih (spojine **4**, **5**, **6**, **7**, **10**, **12**, **14**) potekle skoraj kvantitativno, izkoristki reakcij so bili približno 80 %, razen pri spojinah **8** in **9** je bil izkoristek okoli 40 %. Izolacija nastalih soli je bila enostavna. Najprej smo uparili topilo pod znižanim tlakom, preostanku smo dodali diklorometan, v katerem so se produkt in nečistoče raztopile, potem

pa smo na ledu dodajali dietileter, da je prišlo do nastanka kristalov, ki smo jih odfiltrirali z odsesavanjem pod znižanim tlakom in posušili čez noč pri sobni temperaturi. Pri spojini **10** smo imeli težave z raztapljanjem, zato smo samo uparili topilo pod znižanim tlakom in preostanek v bučki čez noč posušili pri sobni temperaturi.

5.1.4. Wittigova reakcija

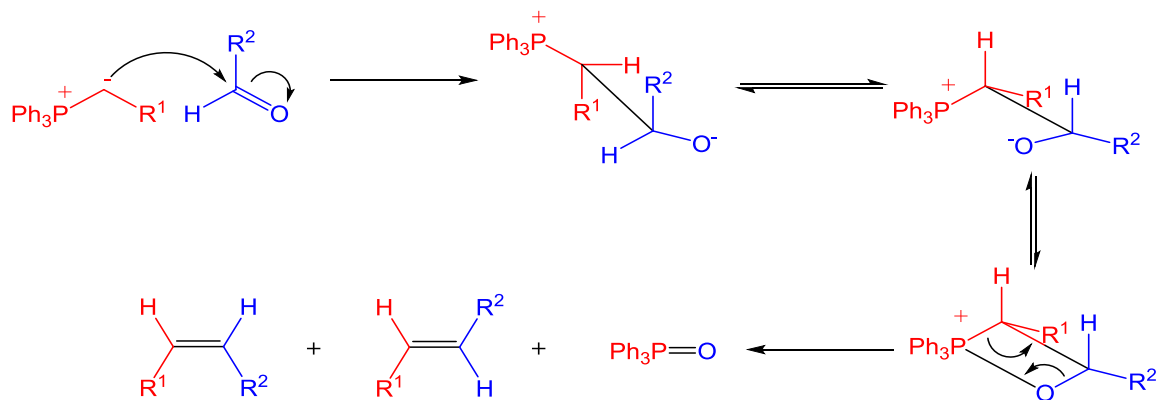
Wittigova reakcija je ena izmed najpogosteje uporabljenih metod pri pretvorbi karbonilne skupine aldehidov in ketonov v alken z visoko stopnjo geometrijskega nadzora. Ustrezna izbira reagenta s fosforjem in reakcijskih pogojev pomembno vpliva na *Z* (*cis*) in *E* (*trans*) stereoselektivnost ter na prednostno nastajanje enega od dveh stereoizomerov (42). Za potek reakcije potrebujemo bazo, ki odcepi proton metilenske skupine trifenilfosfonijeve soli, pri čemer nastane fosfonijev ilid (Slika 13). Reaktivnost ilida ima zelo velik vpliv na geometrijo nastalega alkena. Močno bazo (NaHMDS) uporabimo v primeru nastanka nestabilnega ilida, pri katerem dobimo zmes *cis* in *trans* alkena. Za nestabilne ilide je značilno, da vsebujejo elektrondonorsko skupino (npr. alkilna skupina) (43).



Slika 13: Nastanek trifenilfosfonijevega ilida iz trifenilfosfonijeve soli. Prirejeno po (41).

Mehanizem Wittigove reakcije je sestavljen iz dveh korakov:

- 1) nukleofilni napad fosfonijevega ilida na karbonilno skupino aldehida, pri čemer nastane betain, ki ciklizira v štiričlenski oksafosfetan;
- 2) ireverzibilna razgradnja betaina do *cis* in *trans* izomera alkena ter trifenilfosfin oksida (44).



Slika 14: Mehanizem Wittigove reakcije, pri kateri med aldehydom in fosfonijevim ilidom nastanejo *cis* in *trans* alken ter trifenilfosfin oksid. Prirejeno po (44).

Za potek Wittigove reakcije smo spojinam **4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9**, **10**, **12**, **14** dodali NaHMDS, ki je odcepil proton metilenske skupine trifenilfosfonije soli, zato so se spojine obarvale rdečeoranžno. Po 30 minutnem mešanju smo v reakcijsko zmes dodali aldehyd, raztopljen v brezvodnem THF. Reakcije smo izvajali v brezvodnem THF in pod inertno argonovo atmosfero pri sobni temperaturi. Za potek reakcije so nujni brezvodni pogoji, ker se ilidi ob prisotnosti vode protonirajo in razpadejo do ogljikovodikov in fosfin oksidov. Reakcijo smo ustavili z dodatkom nasičene vodne raztopine NaHCO₃, ki je reagirala s preostalo trifenilfosfonijevo soljo in razgradila prebitno bazo. Spojine, ki smo jih dobili po ekstrakciji, smo očistili s kolonsko kromatografijo. Poleg tega pa smo s kolonsko kromatografijo na podlagi različnih retencijskih faktorjev ločili *cis* in *trans* izomera nastalih spojin. Pri vseh naših spojinah so imeli *cis* izomeri malenkost višji R_f v primerjavi s *trans* izomeri. Nastanek *cis* in *trans* stereoizomerov smo potrdili s pomočjo NMR spektroskopije in izračuna sklopitvenih konstant za protona, ki ležita ob dvojni vezi. Za *cis* analoge je bila značilna nižja vrednost sklopitvene konstante kot pri *trans* analogih. Z Wittigovo reakcijo nam je uspelo sintetizirati le spojine **17a**, **17b**, **18a**, **18b**, **20a** in **20b**.

5.1.5. Komentar neuspešnih sintez z uporabo Wittigove reakcije

Za uporabo Wittigove reakcije pri tvorbi dvojne vezi med aldehydom in trifenilfosfonijevim ilidom smo se odločili zaradi izvajanja reakcije pri milih pogojih. Za ilide je značilno, da jih lahko pripravimo iz različnih funkcionalnih skupin, kar nam omogoča široko uporabnost Wittigove reakcije (45). Pri našem delu smo pripravili različno

substituirane alkil trifenilfosfonijeve soli. Wittigova reakcija ni potekla med solmi cikličnih nasičenih ogljikovodikov s trifenilfosfinom (spojini **15** in **16**) in aldehidom. Cikloalkana, ki smo ju vgradili pri pripravi ilidov, sta onemogočila potek Wittigove reakcije. To bi lahko razložili z enakomerno razporejeno elektronsko gostoto v molekuli, ki je vzrok za kemijsko nereaktivnost alkanov. Wittigova reakcija je bila neuspešna tudi med solema cikličnih nasičenih spojin, ki vsebujeta kisik (spojini **10** in **12**), med soljo primarnega alkohola (spojina **8**) ter med soljo halogeniranega ogljikovodika (spojina **14**) in aldehidom. Pri sintezi spojin **21** in **23** smo za odcepitev protona metilenske skupine trifenilfosfonijeve soli spojin **10** in **14** uporabili še močnejšo bazo (*n*-butil-litij), vendar tudi tokrat Wittigova reakcija ni potekla. Glede na število in položaj lis na TLC ploščicah po končanih reakcijah, bi lahko sklepali, da je Wittigova reakcija potekla, vendar smo po pregledu NMR spektrov ugotovili ravno nasprotno. Iz NMR spektrov je bilo razvidno, da je bil v reakcijski zmesi še vedno prisoten aldehid in trifenilfosfonijeva sol izhodne spojine, ki je v nekaterih primerih celo razpadla na manjše fragmente.

5.1.6. Redukcija dvojne vezi

V reakciji redukcije dvojne vezi alkena do alkana smo uporabili zmesi *cis* in *trans* izomerov spojin **17** in **20**. Redukcijo smo izvedli s postopkom katalitskega hidrogeniranja, pri katerem smo kot katalizator uporabili paladij na ogljiku. Pri reakciji smo uporabili brezvodni EtOH, saj bi prisotnost vode zmanjšala reaktivnost katalizatorja. Potek reakcije smo spremljali s tankoplastno kromatografijo. Spojini **24** in **25** sta v primerjavi z izhodnima spojinama **17** in **20** imeli višji R_f in z orositvenim reagentom ninhidrinom sta se obarvali malenkost svetleje. Produkt smo filtrirali preko celita in matičnici uparili topilo pod znižanim tlakom. Reakcija redukcije je pri obeh spojinam potekla z zelo visokim izkoristkom.

5.1.7. Odstranitev Boc zaščitne skupine

Preden smo izvedli zadnjo stopnjo reakcije, smo morali odstraniti Boc zaščitno skupino piperidinskih intermediatov, katera se selektivno odstrani z reakcijo acidolize. Uporabili smo koncentrirano HCl, katero smo dodali k raztopini spojine v brezvodnem EtOH. Reakcijo pa smo izvedli pod refluksom. Po 1 uri smo potek reakcije preverili s tankoplastno kromatografijo (produkt v obliki soli s HCl ni potoval po TLC ploščici) in v vseh primerih je reakcija selektivno potekla. Izolacija nam ni predstavljala posebnih težav. Najprej smo odparili topilo pod znižanim tlakom, potem pa smo produkt dvakrat zapored

prelili z dietiletrom, ki smo ga prav tako odstranili pod znižanim tlakom. Na ta način smo se znebili prebitne HCl. Produkta izhodnih spojin **18a** in **18b** smo uporabili brez dodatnega sušenja v naslednji stopnji reakcije, medtem ko smo produkta izhodnih spojin **17a**, **17b**, **20a**, **20b**, **24** in **25** čez noč posušili v sušilniku pri 50 °C. S sušenjem smo se še dodatno znebili morebitne zaostale kisline. Odščitene spojine smo brez potrditve z NMR spektri uporabili v naslednji stopnji reakcije.

5.1.8. Alkiliranje piperidinskega dušika

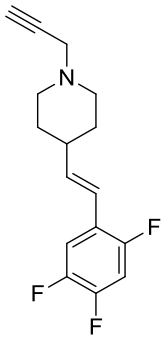
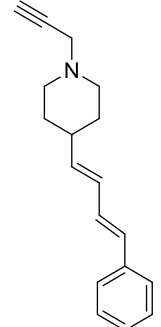
V zadnji stopnji sinteze smo v argonovi atmosferi izvedli reakcijo *N*-alkiliranja, pri kateri je nastala kovalentna vez med atomom dušika in alkilno skupino substrata, v našem primeru je bila to propargilna skupina iz propargil bromida. Za izvedbo reakcije smo uporabili organsko bazo K₂CO₃, reakcija pa je potekla po mehanizmu nukleofilne substitucije. Potek reakcije smo spremljali s tankoplastno kromatografijo, *N*-alkiliran produkt je v primerjavi z izhodno spojino potoval po TLC ploščici. Pri sintezi spojine **28b** je potekla reakcija z zelo slabim izkoristkom, tudi ob ponovnem dodatku reagentov in 24-urnem mešanju, zato te spojine nismo mogli uporabiti pri biološkem testiranju. Z NMR spektrom smo s pomočjo določitve sklopitvenih konstant ugotovili, da je pri sintezi spojine **28b** prišlo do izomerizacije *cis* v *trans* izomer. Čeprav smo reakcije *N*-alkiliranja *cis* analogov izvajali zaščiteno pred svetlobo in nastale produkte hranili v hladilniku, je očitno omenjena spojina zelo občutljiva na svetlobo. Izkoristki reakcij so bili pri spojinah **26a**, **27**, **28a**, **28b**, **29a** in **30** zelo nizki (< 30 %), kar smo lahko razbrali že iz TLC ploščice ob spremljanju reakcij, saj je ostalo veliko nezreagirane izhodne spojine na mestu nanosa. Potek reakcije bi lahko izboljšali z uporabo drugega karbonata (npr. Cs₂CO₃) in uporabo katalizatorja, ki se ga tokrat nismo posluževali.

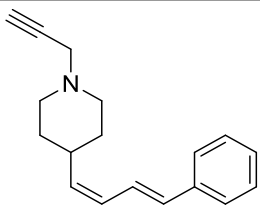
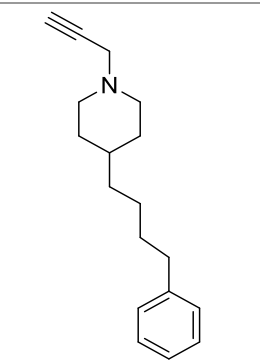
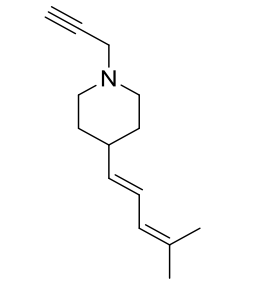
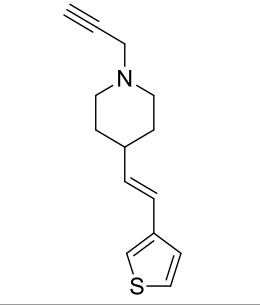
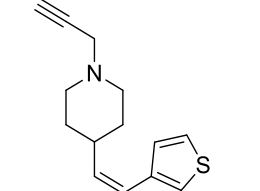
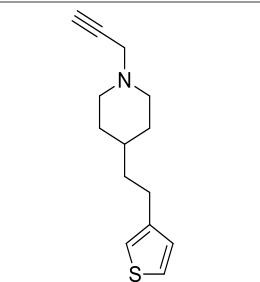
5.2. BIOLOŠKI DEL

5.2.1. Rezultati biološkega testiranja

Na encimih hMAO-A in hMAO-B je bilo testiranih 7 končnih sintetiziranih spojin, in sicer spojine **26a**, **26b**, **27**, **28a**, **29a**, **29b** in **30**. Vsem testiranim spojinam smo najprej določili rezidualno aktivnost (RA) encima pri 100 μM . Rezidualna aktivnost nam pove, kolikšna je izguba aktivnosti encima ob prisotnosti zaviralca. Nižja vrednost RA pomeni, da je spojina močnejši zaviralec. Spojinam, katerim smo določili $RA < 50\%$, smo nadalje določili srednjo zaviralno koncentracijo (IC_{50}). Vrednost IC_{50} nam pove vrednost koncentracije zaviralca, pri kateri aktivnost encima pade na polovico. Rezultati biološkega testiranja na encimih MAO-A in MAO-B so prikazani v Preglednici I. Ker smo pri našem delu izhajali iz 1-(prop-2-in-1-il)-4-(2,4,5-trifluorofenil)piperidina, so v tabelo dodani še rezultate testiranja te spojine (**SDH-26**), ki so bili izvedeni v okviru drugega magistrskega dela.

Preglednica I: Rezultati biološkega testiranja, podani v obliki rezidualne aktivnosti (RA) encima pri 100 μM ali vrednosti IC_{50} (krepko tiskani rezultati).

Oznaka spojine	Struktura spojine	<i>hMAO-A</i> IC_{50} [μM] oz. RA pri 100 μM [%]	<i>hMAO-B</i> IC_{50} [μM] oz. RA pri 100 μM [%]
SDH-26		60,2 % \pm 1,6 %	0,216 \pm 0,014
26a		58,2 \pm 1,4%	0,010 \pm 0,001

<u>26b</u>		$75,1 \pm 0,1\%$	$0,172 \pm 0,021$
<u>27</u>		$87,457 \pm 14,307$	$0,067 \pm 0,009$
<u>28a</u>		$72,182 \pm 17,127$	$2,009 \pm 0,111$
<u>29a</u>		$61,327 \pm 10,052$	$3,930 \pm 0,523$
<u>29b</u>		$0,251 \pm 0,007$	$4,483 \pm 0,218$
<u>30</u>		$13,952 \pm 1,607$	$5,073 \pm 0,193$

5.2.2. Komentar rezultatov biološkega testiranja

S pomočjo encimskih testov smo lahko preučili vpliv različnih *cis/trans* aril in vinil 1,4-disubstituiranih piperidinskih analogov na jakost delovanja in selektivnost zaviranja izooblik MAO. Pri vseh spojinah smo ohranili piperidinski obroč ter propargilni fragment, ki ima ključno vlogo pri zaviranju MAO.

Predpostavko, da so *cis* stereoisomeri močnejši zaviralci MAO-A, *trans* stereoisomeri pa močnejši zaviralci MAO-B, lahko z našimi rezultati testiranja le delno potrdimo. Spojini **26a** in **26b** sta stereoisomera, vendar oba izkazujeta zelo močno zaviralno aktivnost na MAO-B, čeprav bi pričakovali, da bo *cis* izomer deloval na MAO-A. Prav tako ima vrednost IC_{50} na MAO-B v nanomolarnem območju tudi njun nasičen derivat (spojina **27**), ki tudi šibko zavira delovanje MAO-A. V primerjavi s spojino **SDH-26** vsebujejo zgornje spojine nesubstituiran fenilni obroč, ki je pritrjen na piperidin z še enim dodatnim vinilnim fragmentom. Podaljšek distančnika med piperidinom in fenilnim obročem je *trans* izomeru izboljšal zaviranje MAO-B, vendar pa z njim nismo dosegli zaviralne aktivnosti *cis* izomera na MAO-A. Tudi spojini **29a** in **29b** sta stereoisomera, vendar pa pri njiju opazimo močnejšo zaviralno aktivnost *trans* izomera na MAO-B in močnejšo zaviralno aktivnost *cis* derivata na MAO-A. Bioizosterna zamenjava fenilnega obroča s tiofenom je zelo doprinesla k zaviranju MAO-A, saj ima izmed testiranih spojin ravno spojina **29b** najnižjo vrednost IC_{50} na MAO-A. Tudi spojina **28a** močnejše zavira delovanje MAO-B kot pa MAO-A, s čimer lahko potrdimo našo predpostavko o vplivu *cis* in *trans* konfiguracije na selektivnost delovanja. Žal nam ni uspelo sintetizirati *cis* izomera spojine **28**, da bi lahko natančneje komentirali vpliv zamenjave fenilnega obroča z bolj lipofilnim fragmentom. Glede na *trans* derivat, pa lahko ocenimo, da se spojina **28a** bolje prilega vezavnemu mestu MAO-B kot spojina **29a**, vendar bistveno slabše kot spojina **26a**, ki ima najnižjo vrednost IC_{50} na MAO-B izmed testiranih spojin in predstavlja najmočnejši testiran zaviralec te oblike izoencima.

Iz rezultatov testiranja lahko opredelimo vpliv nenasičenosti oziroma nasičenosti aril in vinil 1,4-disubstituiranih piperidinskih analogov. Čeprav smo sintetizirali samo dve nasičeni spojini, smo pri obeh prišli do enakih zaključkov, da nasičenost sintetiziranih spojin ugodno vpliva na zaviralno aktivnost na izoobliko encima MAO-A, medtem ko se zaviralno delovanje nasičenega derivata v primerjavi z nenasičenim na MAO-B poslabša. Nenasičeni spojini **26a** in **29a** imata v primerjavi z njunima nasičenima analogoma (spojini

27 in **30**) višjo vrednost IC_{50} na MAO-A in nižjo vrednost IC_{50} na MAO-B. Pri spojini **26a** vrednosti IC_{50} sploh nismo določili zaradi visoke vrednosti RA (> 50 %). Spojina **30** ima 4-krat močnejšo jakost delovanja na MAO-A v primerjavi z njenim nenasičenim analogom. Jakost delovanja na MAO-B pa se pri obeh nasičenih spojinah zmanjša, pri spojini **27** kar za 6-krat.

6. ZAKLJUČEK

V sklopu magistrske naloge smo sintetizirali derivate *N*-propargilpiperidina kot zaviralce encimov MAO-A in MAO-B. Uspešno smo pripravili 7 končnih aril in vinil 1,4-disubstituiranih piperidinskih analogov, ki smo jih biokemično ovrednotili z encimskimi testi z določitvijo zaviralne aktivnosti na humanih encimih MAO-A in MAO-B.

S pomočjo Wittigove reakcije med aldehydom in trifenilfosfonijevimi solmi različnih arilnih in vinilnih analogov smo pripravili *cis* in *trans* stereoizomere. Wittigova reakcija ni potekla med aldehydom in fosfonijevimi solmi s cikloalkani (spojini **15** in **16**), cikličnimi nasičenimi spojinami, ki vsebujejo kisik (spojini **10** in **12**), ter halogeniranim ogljikovodikom (spojina **14**). Neuspešne Wittigove reakcije med aldehydom in nasičenimi sistemi so nam onemogočile nadaljno sintezo do končnih spojin. Pri ostalih spojinah nismo imeli težav pri sintezi *cis* in *trans* izomerov.

Rezultati testiranja so potrdili, da so *cis* stereoizomeri močnejši zaviralci MAO-A, *trans* stereoizomeri pa močnejši zaviralci MAO-B. Izmed testiranih spojin je imela najmočnejšo zaviralno aktivnost na MAO-A spojina **29b** z vrednostjo IC₅₀ 251 nM. Ugotovili smo, da bioizosterna zamenjava fenilnega obroča s tiofenom ugodno vpliva na zaviralno aktivnost sintetiziranih spojin. Kot najboljši zaviralec MAO-B pa se je izkazala spojina **26a** z vrednostjo IC₅₀ 10 nM. Podaljšek distančnika med piperidinom in fenilnim obročem je zelo pripomogel k zaviralni aktivnosti na MAO-B, vendar z njim izgubimo zaviralno aktivnost *cis* izomera na MAO-A. Iz rezultatov testiranja je tudi razvidno, da nasičenost sintetiziranih spojin ugodno vpliva na zaviralno aktivnost na MAO-A, medtem ko se zaviralno delovanje nasičenega derivata v primerjavi z njegovim nenasičenim analogom na MAO-B poslabša.

Rezultati, ki smo jih pridobili tekom našega dela, predstavljajo pomemben prispevek k razvoju novih zaviralcev encima MAO, predvsem izoencima MAO-B. Ker nam ni uspelo sintetizirati končnih derivatov *N*-propargilpiperidina z nasičenimi sistemi, bi bilo nadalje potrebno poiskati druge alternative sintezne poti za pripravo *cis* in *trans* izomerov tovrstnih spojin.

7. LITERATURA

1. Cacabelos R: Parkinson`s Disease: From pathogenesis to Pharmacogenomics. *International Journal of Molecular Sciences* 2017; 18(3): 1-16.
2. http://www.who.int/mental_health/neurology/neurological_disorders_report_web.pdf (dostopano 15. 3. 2017)
3. Obreza A: Pregled relevantnih zdravilnih učinkovin, ki se izdajajo na recept. *Farmacevtski vestnik* 2008; 59: 68-74.
4. Ribarič S: Temelji patološke fiziologije, 2. izdaja. UL MF Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2011: 306-311.
5. Trošt M: Parkinsonova bolezen. *Farmacevtski vestnik* 2008; 59: 60-63.
6. Chinta S, Andersen J: Dopaminergic neurons. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2005; 37(5): 942-946.
7. Ascherio A, Schwarzschild MA: The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *The Lancet Neurology* 2016; 15(12): 1257-1270.
8. He X, Nakayama H: Neurogenesis in Neurotoxin-induced Animal Models for Parkinson`s Disease-A Review of the Current Status. *Journal of toxicologic pathology* 2009; 22(2): 101-108.
9. Kopin IJ, Burns SR, Chiueh C, Markey SP: MPTP-Induced Parkinsonian Syndromes in Humans and Animals. *Advances in Behavioral Biology* 1986; 29: 519-530.
10. Vila M, Przedborski S: Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience* 2003; 4: 365-375.
11. Dale M, Haylett GD: *Pharmacology Condensed, Second Edition*. Churchill Livingstone, 2009: 55-58.
12. Mattevi A: Monoamine Oxidase. *Encyclopedia of Biological Chemistry* 2013: 185-187.
13. Finberg J, Rabey MJ: Inhibitors of MAO-A and MAO-B in Psychiatry and Neurology. *Frontiers in Pharmacology* 2016; 7: 1-15.
14. Cashman JR, Motika MS: Monoamine Oxidases and Flavin Containing Monooxygenases. *Comprehensive Toxicology (Second Edition)* 2010; 4: 77-110.
15. Floris G, Finazzi Agro A: Amine oksidases. *Encyclopedia of Biological Chemistry* 2004; 85-90.
16. Gaweska H, Fitzpatrick P: Structures and Mechanism of the Monoamine Oxidase Family. *BioMolecular Concepts* 2011; 2(5): 365-377.

17. Gu F, Chauhan V, Chauhan A: Monoamine oxidase-A and B activities in the cerebellum and frontal cortex of children and young adults with autism. *Journal of Neuroscience Research* 2017; 1-5.
18. Shih CJ, Thompson R: Monoamine Oxidase in Neuropsychiatry and Behavior. *The American Journal of Human Genetics* 1999; 65(3): 593-598.
19. Binda C, Newton-Vinson P, Hubálek F, Edmondson D, Mattevi A: Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders. *Nature Structural Biology* 2001; 9: 22-26.
20. Hubalek F, Brinda C, Khalil A, Mattevi A, Castagnoli N, Edmonson D: Demonstration of Isoleucine 199 as a Structural Determinant for the Selective Inhibition of Human Monoamine Oxidase B by Specific Reversible Inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry* 2005; 280 (16): 15761-15766.
21. Fiedorowicz J, Swartz K: The role of monoamine oxidase inhibitors in current psychiatric practice. *Journal of Psychiatric Practice* 2004; 10(4): 239-248.
22. Meyer JH, Ginovart N, Boovariwala A, Segrati S, Hussey D, Garcia A, Young T, Praschak-Rieder N, Wilson AA, Houle S: Elevated monoamine oxidase a levels in the brain: an explanation for the monoamine imbalance of major depression. *Archives of General Psychiatry* 2006; 63(11): 1209-1216.
23. Naoi M, Maruyama W, Shamoto-Nagai M: Type A monoamine oxidase and serotonin are coordinately involved in depressive disorders: from neurotransmitter imbalance to impaired neurogenesis. *Journal of Neural Transmission* 2017: 1-12.
24. Youdim MB, Weinstock M: Therapeutic applications of selective and non-selective inhibitors of monoamine oxidase A and B that do not cause significant tyramine potentiation. *NeuroToxicology* 2004; 25(1-2): 243-250.
25. Korn A, Eichler HG, Fischbach R, Gasic S: Moclobemide, a new reversible MAO inhibitor--interaction with tyramine and tricyclic antidepressants in healthy volunteers and depressive patients. *Psychopharmacology* 1996; 88(2): 153-157.
26. Prada M, Kettler R, Keller H, Burkard WD, Muggli-Maniglio D, Haefely E: Neurochemical profile of moclobemide, a short-acting and reversible inhibitor of monoamine oxidase type A. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1989; 248 (1): 400-414.
27. SmPC moclobemid: <https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/32179> (dostopano 22. 3. 2017)
28. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m3071?lang=en®ion=SI> (dostopano 24. 3. 2017)
29. Youdim BM, Edmondson D, Tipton FK: The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nature Reviews Neuroscience* 2006; 7: 295-309.

30. Jenner P: Mitochondria, monoamine oxidase B and Parkinson`s disease. *Basal Ganglia* 2012; 2 (4): 3-7.
31. Youdim BM, Gross A, Finberg PJ: Rasagiline [N-propargyl-1R(+)-aminoindan], a selective and potent inhibitor of mitochondrial monoamine oxidase B. *British Journal of Pharmacology* 2001; 132: 500-506.
32. Schulz BJ: Effects of selegiline and rasagiline on disease progression in Parkinson`s disease. *Basal Ganglia* 2012: 41-45.
33. Gerlach M, Reichmann H, Riederer P: A critical review of evidence for preclinical differences between rasagiline and selegiline. *Basal Ganglia* 2012: 9-15.
34. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Summary_for_the_public/human/002396/WC500184968.pdf (dostopano 28. 3. 2017)
35. Schapira HA: Monoamine oxidase B inhibitors for the treatment of Parkinson's disease: a review of symptomatic and potential disease-modifying effects. *CNS Drugs* 2011; 25 (12): 1061-1070.
36. Huleatt BP, Khoo LM, Chua Y, Tan WT, Liew SR, Balogh B, Deme R, Goloncser F, Magyar K, Sheela PD, Sperlagh B, Matyus P: Novel Arylalkenylpropargylamines as Neuroprotective, Potent and Selective Monoamine Oxidase B Inhibitors for the Treatment of Parkinson`s Disease. *Journal of Medicinal Chemistry* 2015: 1400-1419.
37. Carradori S, Silvestri R: New Frontiers in Selective Human MAO-B Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 2015: 6717-6732.
38. Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, Pečar S: Farmaceutvska kemija III. Vaje in seminarji: Dodatne vsebine za razumevanje, Metode N- in O- aciliranja, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010.
39. http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_Boc2O_Base_Mech.htm (dostopano 10. 2. 2017)
40. Khlestkin V, Mazhukin D: Recent Advances in the Application of N,O-Dialkylhydroxylamines in Organic Chemistry. *Current Organic Chemistry* 2003;7: 967.
41. <http://www.chemtube3d.com/Nucleophilic%20substitution%20at%20the%20carbonyl%20group%20-%20Wittig%20reaction%20%28Ylid%20formation%29.html> (dostopano 17. 2. 2017)
42. Levačić M: Sinteza, izolacija izomera i spektroskopska karakterizacija 2-I 3-[4-(2-vinilfenil)buta-1,3-dienil]tiofena. Završni rad; Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije; Zagreb 2015.
43. <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/wittig-reaction.shtm> (dostopano 1. 2. 2017)

44. Pascariu A, Ilia G, Bora A, Iliescu S, Popa A, Dehelean G, Pacureanu L: Wittig and Wittig-Horner reactions under phase transfer catalysis conditions. *Central European Science Journals* 2003; 491-503.

45. Byrne AP, Gilheany B, Declan G: The modern interpretation of the Wittig reaction mechanism. *Chemical Society Reviews* 2013; 42(16): 6670-6696.