

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALJA SELIČ

**SINTEZA 4'-HETEROARIL SUBSTITUIRANIH DERIVATOV
PSORALENA KOT ZAVIRALCEV IMUNOPROTEASOMA**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



ALJA SELIČ

**SINTEZA 4'-HETEROARIL SUBSTITUIRANIH DERIVATOV
PSORALENA KOT ZAVIRALCEV IMUNOPROTEASOMA**

**SYNTHESIS OF 4'-HETEROARYL-SUBSTITUTED
PSORALENE DERIVATIVES AS IMMUNOPROTEASOME
INHIBITORS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca.

Spektroskopske meritve in elementne analize so opravili na Fakulteti za farmacijo ter na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani. Biokemijska testiranja so opravili na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Stanislavu Gobcu, mag. farm. in vsem ostalim sodelavcem Katedre za farmacevtsko kemijo za koristne nasvete in prijaznost. Posebna zahvala gre asist. Damijanu Knezu, mag. farm. za pomoč pri delu v laboratoriju ter strokovne napotke pri izdelavi magistrskega dela.

Hvala vsem mojim prijateljem, brez katerih moja študentska leta ne bi bila tako pestra. Zahvaljujem se tudi Žigu za nenehno vzpodbudo in oporo. Največja zahvala pa gre moji družini, predvsem staršema Andreji in Dragu za vso podporo tekom študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm.

Alja Selič

Ljubljana, 2017

VSEBINA

1. UVOD	1
1.1 UBIKVITIN-PROTEASOMSKI SISTEM.....	1
1.2 PROTEASOM.....	2
1.2.1 Zgradba proteasoma	2
1.3 IMUNOPROTEASOM.....	4
1.3.1 Zgradba imunoproteasoma	5
1.3.3 Vpletenost imunoproteasoma v bolezenska stanja.....	8
1.4 ZAVIRALCI PROTEASOMA	10
1.4.1 Neselektivni zaviralci proteasoma	10
1.4.2 Selektivni zaviralci.....	13
2. NAMEN DELA	16
3. MATERIALI IN METODE	18
3.1 MATERIALI.....	18
3.2 METODE	18
4. EKSPERIMENTALNI DEL	20
4.1 Sinteza etil 3-(7-hidroksi-4-metil-2-okso-2 <i>H</i> -kromen-3-il)propanoata (1).....	21
4.2 Bromiranje 3-acetil-heteroarilnih derivatov.....	22
4.3 Sinteza derivatov etil 3-(7-hidroksi-4-metil-2-okso-2 <i>H</i> -kromen-3-il)propanoata	23
4.4 Sinteza derivatov 3-(5-metil-7-okso-7 <i>H</i> -furo[3,2- <i>g</i>]kromen-6-il)propanojske kisline	26
4.5 Splošni sintezni postopek za pripravo cianometil amidov.....	29
4.6 Sinteza derivatov 2,5-dioksopirolidin-1-il 3-(5-metil-7-okso-7 <i>H</i> -furo[3,2- <i>g</i>]kromen-6-il)propanoata	33
4.7 Sinteza <i>N</i> -(cianometil)-3-(7-(2-(2,5-dimetilfuran-3-il)-2-oksoetoksi)-4-metil-2-okso-2 <i>H</i> -kromen-3-il)- <i>N</i> -metilpropanamida	35
4.7.1 Poskus sinteze <i>N</i> -(cianometil)-3-(3-(2,5-dimetilfuran-3-il)-5-metil-7-okso-7 <i>H</i> -furo[3,2- <i>g</i>]kromen-6-il)- <i>N</i> -metilpropanamida.....	36
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	37
5.1 SINTEZA DERIVATOV PSORALENA	37
5.1.1 Sinteza 7-hidroksikumarinskega derivata.....	37

5.1.2 Selektivno monobromiranje izhodnih reagentov	38
5.1.3 Sinteza derivatov 3-(kumarin-7-il)propanoata.....	40
5.1.4 Ciklizacija do psoralenskega skeleta.....	41
5.2 UVAJANJE ELEKTROFILNEGA CENTRA.....	42
5.3 BIOKEMIJSKO VREDNOTENJE SPOJIN	44
6. SKLEP	47
7. LITERATURA	48

SLIKOVNO KAZALO

Slika 1. Ubikvitin-proteasomski sistem	2
Slika 2. Hidroliza peptidne vezi v proteasomu	4
Slika 3. Predstavniki glavnih razredov neselektivnih kovalentnih zaviralcev proteasoma.	12
Slika 4. Predstavnika $\beta 5/\beta 5i$ selektivnih zaviralcev	14
Slika 5. Predstavnika $\beta 1/\beta 1i$ selektivnih zaviralcev	15
Slika 6. Predstavnika $\beta 2/\beta 2i$ selektivnih zaviralcev	15
Slika 7. Spojina vodnica	16
Slika 8. Načrtovana sintezna pot končnih produktov	17
Slika 9. Sinteza shema bromiranja 3-acetil-heteroarilov 2a-c in tabela osnovnih podatkov dobljenih produktov	22
Slika 10. Sinteza shema derivatov etil 3-(6-hidroksi-1-metil-3-okso-3,4-dihidronaftalen-2-il)propanoata 4a-c in tabela osnovnih podatkov dobljenih produktov	23
Slika 11. Sinteza shema derivatov 5a-c in tabela osnovnih podatkov dobljenih produktov	26
Slika 12. Reakcijska shema tvorbe derivatov z elektrofilnimi bojnimi glavami	29
Slika 13. Mehanizem poteka Pechmannove reakcije po Robertsonu.	38
Slika 14. Potek Pechmannove reakcije po predlogu Ahmeda in Desaia.	38
Slika 15. Selektivno bromiranje ketonov z bakrovim (II) bromidom	39
Slika 16. Mehanizem O-alkiliranja fenolov z alikli bromidi	40
Slika 17. Mehanizem ciklizacije 7-hidroksikumarinskih derivatov	41
Slika 18. Mehanizem tvorbe amidne vezi s sklopitvenim reagentom EDC.	43
Tabela I. Razlike v vezavnih mestih konstitutivnega proteasoma in imunoproteasoma	6
Tabela II. Prikaz derivatov cianometil amidov, njihov izkoristek reakcije, izgled in temperatura tališča	30
Tabela III. Derivata 2,5-dioksopirolidin-1-il 3-(5-metil-7-okso-7H-furo[3,2-g]kromen-6-il)propanoata s sukcinimidno funkcionalno skupino, njun izkoristek reakcije, izgled in temperatura tališča	33
Tabela IV. Zaviralno delovanje (RA, K_i , IC_{50}) na $\beta 5i$ podenoto imunoproteasoma	44

POVZETEK

Proteasom je del ubikvitin-proteasomskega sistema, ki je celični aparat za razgradnjo proteinov. V normalnih okoliščinah je v večini celic izražen konstitutivni proteasom, ob stresnih situacijah in vnetjih pa se začne povečano izražati njegova izoforma, imunoproteasom. Prekomerna aktivacija katalitičnih podenot imunoproteasoma je povezana s številnimi avtoimunskimi in vnetnimi obolenji ter nekaterimi vrstami raka, zato predstavlja razvoj selektivnih zaviralcev imunoproteasoma zanimivo terapevtsko strategijo.

Selektivni zaviralci imunoproteasoma so večinoma peptidne strukture, ki pa jih telo hitro metabolizira. Z virtualnim rešetanjem je bil na Katedri za farmacevtsko kemijo odkrit selektivni zaviralec kimotripsinske podenote imunoproteasoma ($\beta 5i$) z nepeptidnim psoralenskim ogrodjem. Z namenom optimizacije zaviralnih lastnosti te spojine smo načrtovali in sintetizirali devet novih derivatov, pri čemer smo ohranili psoralenski skelet, na mestu 4' pa smo fenilni obroč zamenjali z različnimi heterocikli (2,5-dimetiltiofen, 2,5-dimetilfuran, furan). Dobljenim nekovalentnim zaviralcem smo na karboksilno skupino uvedli elektrofilni center (*N*-hidroksisukcinimid, aminoacetonitril), ki bi lahko tvoril kovalentno vez s katalitsko aktivnim treoninom v S1 vezavnem žepu kimotripsinske β -podenote imunoproteasoma.

Na Katedri za klinično biokemijo so naše spojine biokemijsko okarakterizirali z določanjem rezidualne aktivnosti na kimotripsinski podenoti imunoproteasoma. Ugotovili smo, da je zamenjava fenila z ostalimi heterocikli privedla do zmanjšane zaviralne učinka. Nasprotno pa je uvedba elektrofilnega sukcinimida močno povečala zaviranje imunoproteasoma, medtem ko spojine z aminoacetonitriлом niso izkazovale zaviralnih lastnosti.

Psoralenski derivati nam tako nudijo nova spoznanja za nadaljnji razvoj nepeptidnih zaviralcev imunoproteasoma z večjo jakostjo in boljšo specifičnostjo delovanja.

Ključne besede: imunoproteasom, selektivni zaviralci imunoproteasoma, ireverzibilno zaviranje, psoralenski skelet

ABSTRACT

Proteasome is a part of ubiquitin-proteasome system, a cellular apparatus for protein degradation. Under physiological conditions most cells express constitutive proteasome. When inflammation or stressful situations occur, the expression of immunoproteasome is induced. Overexpression of immunoproteasome is associated with numerous autoimmune, inflammatory diseases and some types of cancer. Selective inhibition of immunoproteasome therefore represents an interesting therapeutic strategy.

Majority of selective immunoproteasome inhibitors have peptide backbone, which is quickly metabolised *in vivo*. New selective inhibitor of immunoproteasome chymotrypsin subunit ($\beta 5i$) with non-peptide skeleton was discovered through virtual screening approach. With aim to optimize the inhibitory properties of the hit compound we designed and synthesized nine new derivatives. Psoralene core was left intact, and changes were made at position 4', where phenyl ring was replaced with various heterocycles (2,5-dimethylthiophene, 2,5-dimethylfuran, furan). Electrophilic warheads (*N*-hydroxysuccinimide, aminoacetonitrile) were thereafter attached to the carboxyl group of the noncovalent inhibitors, which could form a covalent bond with the catalytically active threonine.

The compounds were biochemically characterized by determining the residual activity on chymotrypsin subunit of immunoproteasome. The replacement of the phenyl ring with other heterocycles led to reduced inhibitory potencies. In contrast, the introduction of the electrophilic succinimide greatly increased inhibition of immunoproteasome while compounds with aminoacetonitrile showed no inhibitory properties.

Psoralene derivatives can be considered as a good starting point for further development of novel, more potent and more specific non-peptide immunoproteasome inhibitors.

Keywords: immunoproteasome, selective immunoproteasome inhibitors, irreversible inhibition, psoralene skeleton

SEZNAM OKRAJŠAV

AK	aminokislina
ATP	adenozin trifosfat
br s	širok singlet
CD8+ T-celica	citotoksična T celica
CH ₂ Cl ₂	diklorometan
d	dublet
dd	dublet dubleta
DMSO	dimetilsulfoksid
DUBs	deubikvitinacijski encimi
E1	ubikvitin aktivacijski encim
E2	ubikvitin konjugacijski encim
E3	ubikvitin ligaza
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
ekv	molarni ekvivalent
EtOAc	etil acetat
EtOH	etanol
HATU	(1-[bis(dimetilamino)metilen]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol[4,5- <i>b</i>]piridin 3-oksid heksafluorofosfat)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HRMS	masna spektroskopija visoke ločljivosti
IC ₅₀	polovična maksimalna inhibitorna koncentracija
IFN-(α, γ)	interferon-(alfa, gama)
IL-(6, 1β)	interlevkin-(6, 1beta)
Ile	izolevcin
IR	infrardeča spektroskopija
Ki	konstanta inhibicije
MeOH	metanol
MF	mobilna faza
MHC I	glavni histokompatibilni kompleks razreda I
NF-κB	jedrni transkripcijski faktor κB

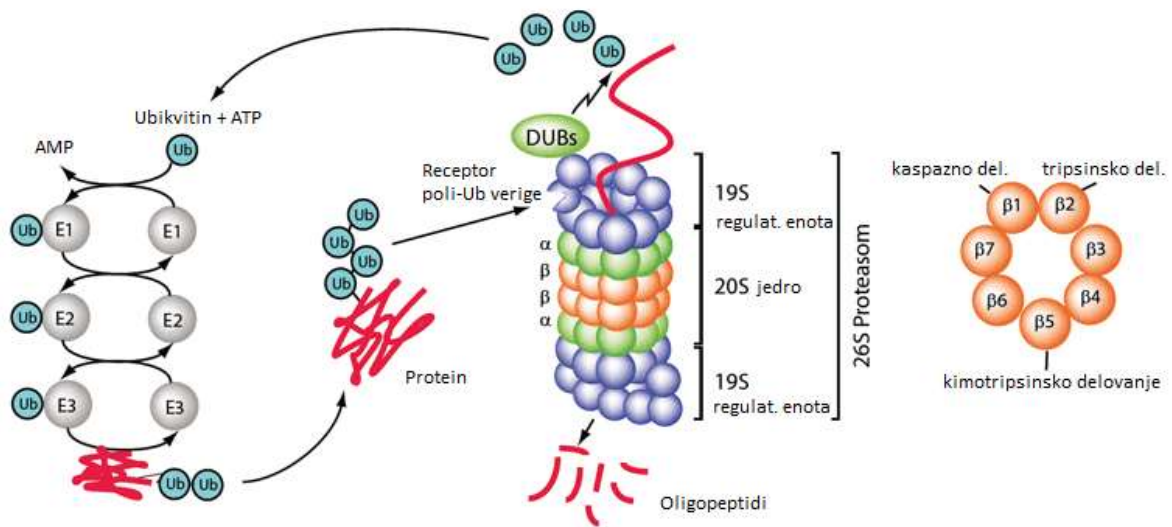
NHS	<i>N</i> -hidroksisukcinimid
NMR	jedrska magnetna resonanca
NUK	nukleofilna vodna molekula
RA	rezidualna aktivnost
R _f	retencijski faktor
s	singlet
SLE	sistemski eritematozni lupus
t	triplet
TEA	triethylamin
THF	tetrahidrofuran
Thr	treonin
TMS	tetrametilsilan
TNF- α	tumor nekrotizirajoči faktor alfa
T _{tal}	temperatura tališča
UPS	ubikvitin-proteasomski sistem

1. UVOD

1.1 UBIKVITIN-PROTEASOMSKI SISTEM

Znotraj celice se na minuto razgradi približno 2×10^6 proteinov. Poleg avtofagije (razgradnja v lizosomih) je celični stroj, ki to omogoča, ubikvitin-proteasomski sistem (UPS). Ta sistem igra pomembno vlogo pri vzdrževanju proteinske homeostaze in v regulaciji številnih celičnih procesov. Ključni igralec pri nelizosomski razgradnji beljakovin UPSa je 26S proteasom, multikatalitični encimski kompleks, izražen v jedru in citoplazmi vseh evkariontskih celic. Sestavljen je iz proteolitskega 20S jedrnega dela in iz ene ali dveh 19S regulatornih enot [1].

Prepoznavanje proteinov poteka preko majhnega peptida ubikvitina, ki se veže na tarčni protein in ga tako označi za razgradnjo. Vezavo prostega ubikvitina na protein sproži kaskada treh encimov: E1, E2 in E3. Najprej ubikvitin aktivacijski encim E1 preko hidrolize ATP veže ubikvitin in aktivira njegov prenos na nosilni protein E2. Ubikvitin ligaza E3 prepozna specifični protein, se nanj veže in katalizira prenos ubikvitina iz E2 na tarčni protein [2]. Na lizinske aminokislinske ostanke ubikvitina se vežejo dodatne monomerne enote ubikvitina. Proces se ponovi vsaj štirikrat, nastane poliubikvitinska veriga, ki jo nato prepozna 19S podenota proteasoma. Po vezavi pride do hidrolize poliubikvitinske verige z deubikvitinacijskimi encimi (DUBs) na monomere enote, ki se lahko ponovno uporabijo za ubikvitinacijo. 19S podenota protein denaturira in delno razvije, da lahko ta vstopi v proteolitsko jedro. Pester nabor encimov E3, ki specifično prepoznavajo substrate za ubikvitinacijo, nakazuje na ogromno število tarč ubikvitin-proteasomskega sistema, ki je pomemben ne le za celični cikel, ampak tudi pri vnetnem odzivu in predstavitvi antigenov [3].



Slika 1. Ubikvitin-proteasomski sistem, povzeto po [4]

1.2 PROTEASOM

Proteasom razgrajuje poškodovane in napačno zvite proteine, ter mnoge signalne molekule, tumorske supresorje, regulatorje celičnega cikla, transkripcijske faktorje, antiapoptotične proteine, ki so pomembni za celični cikel in preživetje celice. Pri vretenčarjih najdemo štiri različne podvrste proteasoma: konstitutivni proteasom, ki je prisoten v vseh evkariontskih celicah in trije tkivno specifični proteasomi. Timoproteasom je izražen le v epitelijskih celicah skorje timusa in je odgovoren za pozitivno selekcijo T-celic, spermatoproteasom najdemo v testisih, kjer sodeluje pri spermatogenezi ter imunoproteasom, ki se pretežno nahaja v mono- in limfocitih, v stresnih situacijah pa se izraža tudi v ostalih celicah [5].

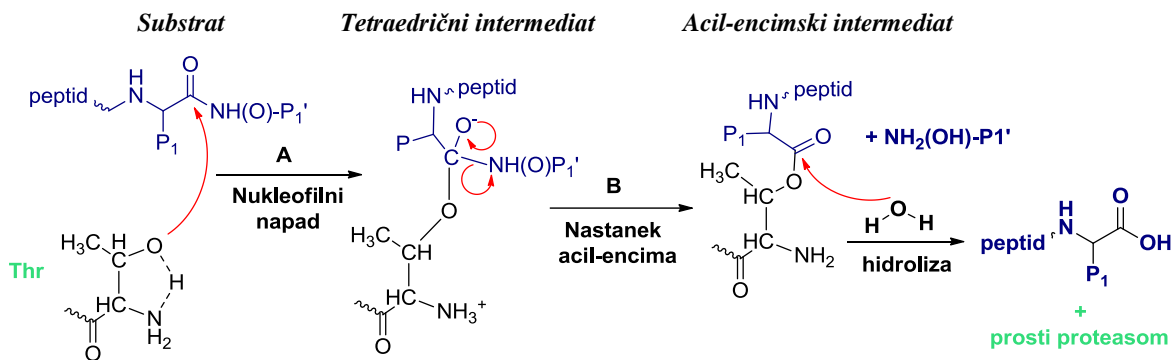
1.2.1 Zgradba proteasoma

Proteasom sestavlja katalitski 20S jedrni del, ki lahko deluje samostojno, lahko pa se nanj vežeta dve enaki ali različni regulatorni enoti (19S/PA700, PA28 $\alpha\beta$, 11S/PA28, PA200). Regulatorni kompleksi so substratno specifični, delujejo kot vratarji pred jedrom proteasoma in vplivajo na proteolitično kapaciteto proteasoma. 20S jedro ima obliko cilindra, sestavljenega iz štirih obročev, vsak obroč pa je sestavljen iz sedmih podenot (Slika 1). Zunanja dva obroča vsebujeta konstitutivno izražene α podenote, ki z

regulatornima enotama tvorita ozek kanal, v katerega lahko vstopajo le denaturirani proteini. Katalitski prostor tvorita notranja β obroča, vsak s tremi proteolitsko aktivnimi podenotami ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$). Aktivne podenote so poimenovane po encimih, ki imajo podobno proteolitsko aktivnost in specifičnost. Ločimo kimotripsinsko podenoto ($\beta 5$), ki cepi peptidne vezi za hidrofobnimi AK ostanki, tripsinsko podenoto ($\beta 2$), ki cepi za bazičnimi AK ostanki, ter kaspazno podenoto ($\beta 1$), ki cepi za kislimi AK ostanki [6]. Vezavno mesto aktivnih β -podenot lahko razdelimo na tri vezavne žepe: S1, S2 in S3 [7]. Aktivno mesto, kjer pride do cepitve peptidne vezi se nahaja v S1 žepu. Tvori ga N-terminalni treoninski ostanek Thr1, ki pri hidrolizi peptidnih vezi deluje kot proton akceptor ($-\text{NH}_2$; Thr1N) in kot nukleofil ($-\text{OH}$; Thr1O^y). V bližini Thr1 za strukturno integriteto vezavnega mesta skrbijo še ostale AK, ki s substratom tvorijo vodikove vezi (Ser129, Ser169, Asp166) in prispevajo k protonaciji ionizirajočih skupin (Lys33). V bližini Thr1 je molekula topila, predhodno opredeljena kot katalitična voda (NUK), z novimi raziskavami pa identificirana kot kloridni ion in 2 do 4 molekule vode [8]. Ostali AK ostanki znotraj S1 žepa vplivajo na proteolitsko dejavnost podenote, tako v $\beta 5$ podenoti h kimotripsinski aktivnosti prispevajo še Ala20, Met45, Ala49, Cys52 [7, 9].

1.2.2 Delovanje proteasoma

Ozek kanal α -podenot služi kot vhod v notranjost cilindra, kjer poteka proteoliza. Globularni proteini so preveliki, da bi prosto prešli odprtino, zato jih je treba najprej razviti. Ta proces katalizirajo regulatorne 19S enote, s čimer omogočijo proteinu prehod v katalitično 20S jedro. Znotraj jedra se protein veže na aktivne podenote, kjer pride do njegove razgradnje. Terciarna struktura aktivnih podenot je podobna amidazam, katerih stranska veriga N-terminalnega ostanka deluje kot katalitični nukleofil, zato proteasom uvrščamo med N-terminalne nukleofilne (Ntn) hidrolaze. Aktivne β -podenote so sintetizirane kot neaktivni prekursorji - propeptidi, ki vsebujejo N-terminalne peptide. Ti se tekom sestave jedra odstranijo in razgalijo N-terminalni treonin (Thr1). Pri cepitvi peptidne vezi pride do nukleofilnega napada Thr1O^y na karbonilno skupino peptidne vezi substrata in prenosa protona s pomočjo NUK na Thr1N. Nastane tetraedrični intermediat (Slika 2, korak A), ki nato razpade na vmesni acil-proteasomski intermediat in peptid z novim N-terminalnim koncem (Slika 2, korak B). Aktivno mesto proteasoma se sprosti s hidrolizo acil-proteasomskega intermediata, pri čemer zopet sodeluje NUK, ob tem pa se sprosti še drugi reakcijski produkt (Slika 2, korak C).



Slika 2. Hidroliza peptidne vezi v proteasomu

Mehanizem cepitve je enak pri vseh aktivnih β -podenotah, razlikujejo pa se po cepitvenem mestu peptida. Specifičnost cepitve določajo AK, ki sestavljajo S1 vezavni žep v katerega se pred hidrolizo peptidne vezi veže substrat. Znotraj 20S jedra tako pride do razgradnje proteinov do kratkih peptidov s 3–25 AK [10, 11].

1.3 IMUNOPROTEASOM

Vse celice z jedrom vsebujejo molekulo glavnega histokompatibilnega kompleksa I (MHC I), na kateri celice predstavljajo peptide na svoji površini. Ti peptidi so lahko del lastnih znotrajceličnih proteinov ali pa so tujega, virusnega ali bakterijskega izvora, vsi pa so predhodno razgrajeni v proteasomu. Kadar citotoksična T celica prepozna tuj peptid, predstavljen na MHC-I molekuli, sproži apoptozo celice s sproščanjem različnih mediatorjev. Med njimi sta tudi tumor nekrotizirajoči faktor α (TNF- α) in interferon γ (IFN- γ), ki inducirata izražanje treh specializiranih, katalitično aktivnih proteasomskih β -podenot, ki sestavljajo imunoproteasom. Izražanje imunoproteasoma v večini celic je nizko, vendar izrazito naraste predvsem v antigen predstavitevni celici ob izpostavitvi citokinoma (TNF- α in IFN- γ) in pri oksidativnemu stresu. Proizvodnja in razgradnja imunoproteasoma je zelo dinamična, saj poteka štirikrat hitreje od konstitutivnega proteasoma. To zagotavlja, da celice hitro razširijo nabor peptidov, ki jih predstavijo imunskemu sistemu. Po umiritvi imunskega odziva se bazalno stanje imunoproteasoma prav tako hitro povrne na izhodiščne vrednosti, kjer glavno vlogo ponovno prevzame konstitutivni proteasom [7, 12].

1.3.1 Zgradba imunoproteasoma

Edina strukturna razlika med konstitutivnim proteasomom in imunoproteasomom je v treh katalitsko aktivnih podenotah β . Zamenjane so z inducibilnimi podenotami imunoproteasoma in sicer $\beta 1$ z $\beta 1i$ /LMP2 (nizkomolekularni peptid 2), $\beta 2$ z $\beta 2i$ /MECL-1 (multikatalitični endopeptidazni kompleks), $\beta 5$ z $\beta 5i$ /LMP7 (nizkomolekularni peptid 7). Te inducibilne podenote vsebujejo predsekvence, ki so homologne konstitutivnim podenotam in služijo kot njihovi substituenti med sestavljanjem proteasoma. Strukturna superpozicija α -podenot in neaktivnih β -podenot ostane praktično enaka pri obeh vrstah proteasoma [13].

Spremembe so očitne v primarni zgradbi zamenljivih β -podenot in sicer so zamenjane nekatere AK v vezavnem mestu [6]. Te strukturne spremembe vplivajo na cepitveni vzorec multikatalitskega kompleksa, s čimer optimizirajo kakovost in raznolikost nastalih peptidov za predstavitev na molekulah glavnega histokompatibilnega kompleksa (MHC) razreda I. Spremenjeno procesiranje antigenov je pojasnjeno s kristalno strukturo obeh vrst proteasoma (Tabela I).

Podenota $\beta 2i$ je edina podenota imunoproteasoma, katere vezavno mesto v primerjavi z $\beta 2$ ni spremenjeno. Menjan je le Asp53 z Glu, kar pa ne vpliva na vezavo substrata, razlog za vgradnjo $\beta 2i$ v imunoproteasom pa se še raziskuje. Na drugi strani pa menjave AK ostankov pri $\beta 1$ podenoti v primerjavi z $\beta 1i$ povečajo hidrofobnost in spremembo celokupnega naboja vezavnega mesta iz pozitivnega v nevtralnega. To je lahko razlog za drastično zmanjšanje kaspazne in povečanje kimotripsinske aktivnosti te podenote. Hidroliza peptidne vezi prednostno poteka za majhnimi, hidrofobnimi, razvejanimi ostanki, kar poveča nastanek nepolarnih MHC-I epitopov. V $\beta 5i$ podenoti so AK, ki omogočajo kimotripsinsko aktivnost ohranjene, povečana pa je hidrofilnost aktivnega mesta, kar kinetično favorizira hidrolizo peptidov, poleg tega je možna tvorba dodatnih vodikovih vezi, ki stabilizirajo tetraedrični intermediat [7, 14, 15].

Tabela I. Razlike v vezavnih mestih konstitutivnega proteasoma in imunoproteasoma, povzeto po [14]
(→ ponazarja nadomestitev AK)

Podenota imunoproteasoma	Sprememba vezavnega mesta	Posledice
β1i (LMP2)	<ul style="list-style-type: none"> • S1 žep: Thr21 → Val; Arg45 → Leu = ↑ hidrofobnost, ↓ velikost • S3 žep: ↓ velikost, ↑ polarnost 	<ul style="list-style-type: none"> • Nastanek CD8+ T celičnih epitopov z nepolarnimi C-terminalnimi konci (Ile, Leu, Val), ki so primernejši za predstavitev na MHC-I molekulah. • Spremenjena preferenca AK v S3.
β2i (MECL-1)	<ul style="list-style-type: none"> • Asp53 → Glu 	<ul style="list-style-type: none"> • Menjava nima vpliva na vezavo substrata.
β5i (LMP7)	<ul style="list-style-type: none"> • S1 žep: ohranjeni Ala20, Ala49, Cys52, razlika le v konformaciji Met45; Ser53 → Gln = ohranjen hidrofoben značaj, ↑ velikost, • Aktivno mesto: Ala46Ser, Val127Thr = ↑ hidrofilitnost okrog nukleofilnega Thr1O^γ; SerO^γ, Thr127O^γ, Gly47NH = vzpostavitev H-vezi • Plitek S2 žep • S3 žep: Ala27 → Ser = omejena velikost, ↑ hidrofilitnost 	<ul style="list-style-type: none"> • Ohranjena kimotripsinska aktivnost. β5i lahko sprejme večje AK v S1 žep v primerjavi z β5 podenoto. • Večja polarnost aktivnega mesta lahko vpliva na hidrolizo peptidov. Vodikove vezi stabilizirajo tetraedrični intermedat med katalizo. • Omejena velikost AK substrata v S2 žepu. • Vezava majhnih hidrofilitnih AK v S3 žep

1.3.2 Naloge imunoproteasoma

Imunoproteasom je s svojim vplivom na imunski sistem in drugimi funkcijami pomemben v boju proti infekcijam in pri številnih drugih boleznih. Njegove glavne funkcije so sledeče:

- Generiranje antigenih peptidov

Dobro znana funkcija je generiranje peptidov s hidrofobnim C-koncem z visoko afiniteto do molekul MHC I za antigensko predstavitev. Predstavitev peptidov na površini celice omogoča prilagojenemu imunskemu sistemu preko CD8⁺ T-celic nadzor nad možnimi obolelimi celicami. V primerjavi s konstitutivnim proteasomom je učinkovitost razgradnje in velikost peptidov enaka, vendar pa imunoproteasom zaradi spremenjenega cepitvenega vzorca tvori specifičen nabor peptidov, ki imajo višjo afiniteto do MHC I [14]. Vpletenost imunoproteasoma v antigensko predstavitev so dokazali na miših brez vseh treh imunokatalitskih podenot, saj so te imele okrnjeno sposobnost predstavljanja antigenov na molekulah MHC I [16].

- Vzdrževanje proteinske homeostaze in zaščita pred oksidativnim stresom

Imunoproteasom je del UPS, katerega osnovna naloga je razgradnja nedelujočih, napačno zviti proteinov. Pri odgovoru na stres ali poškodbo pride do povečanega izražanja in aktivnosti imuno podenot, kar kaže na zaščitno vlogo pri teh pogojih. Primerjalni poskusi na miših z manjkajočo eno ali večimi katalitskimi podenotami imunoproteasoma in miših z normalnim imunoproteasomom so pokazali, da so slednje učinkoviteje odstranjevale poliubikvitirane proteine [17]. Prav tako so se v $\beta 1i^{-/-}$ miših kopičili oksidirani proteini v možganih in jetrih, kar kaže na vpletenost imunoproteasoma pri zmanjševanju oksidativne škode [18].

- Regulacija citokinov

Pri normalnih pogojih imunoproteasom vzdržuje ravnovesje med destruktivnimi in efektivnimi odgovori citokinov na infekcijo. Okvara imunoproteasoma posredno vodi bodisi v povečano ali zmanjšano izločanje citokinov.

Pri redkem Nakajo-Nishimura sindromu, kjer je tekom sestave imunoproteasoma okvarjena vgradnja LMP7 podenote, pride do povečane koncentracije IL-6 in IFN- γ -inducibilnega proteina-10 (IP-10) v serumu [19], kar pa je v nasprotju z rezultati raziskav selektivnih zaviralcev $\beta 5i$ podenote, ki zmanjšajo izločanje proinflatornih citokinov. Tudi dendritične celice kostnega mozga v LMP2 $^{-/-}$ miših so izločale znatno manj IFN- α , IL-1 β , IL-6 in TNF- α pri odgovoru na okužbo z virusom gripe v primerjavi

z normalno mišjo. Zmanjšana produkcija citokinov je pripisana ovirani signalizaciji NF- κ B (osrednji regulatorni protein, ki aktivira transkripcijo mnogih genov vključno s citokini in se aktivira po razgradnji s proteasomom), kar še dodatno kaže na vključevanje imunoproteasoma v regulacijo aktivnosti citokinov [20].

- Proliferacija T-celic

Imunoproteasom ne vpliva le na proizvodnjo antigenskih determinant, ki jih prepoznajo T-celice, vpliva tudi na profil T-celic. Raziskave na miših z okvarjenim imunoproteasomom so pokazale zmanjšano število CD8⁺ T-celic in šibkejši imunski odziv na tuje antigene. Zaviranje β 5i vodi v zmanjšano diferenciacijo CD4⁺ T-celic v T_H17 celice, kar je lahko posledica okrnjene razgradnje diferenciacijskih faktorjev z imunoproteasomom. Prav tako je blokirano s T-celicami povezano nastajanje IFN- γ . To kaže na vpletenost imunoproteasoma v nastajanje provnetnih citokinov in polarizacijo T-celic [13, 20].

1.3.3 Vpletenost imunoproteasoma v bolezenska stanja

Primarno je imunoproteasom poznan zaradi vloge, ki jo igra v pridobljenem imunskem sistemu. Poleg tega pa je vpleten tudi v druge biološke in patološke procese, kjer opravlja neimunološke naloge. Nepogrešljiv je na primer pri oksidativnem stresu, saj učinkoviteje razgrajuje oksidirane proteine kot konstitutivni proteasom, pri vnetnem odzivu pa z razgradnjo novonastalih proteinov, stimuliranih s citokini, omejuje vnetne poškodbe [17]. Z odkrivanjem vedno novih vlog imunoproteasoma, poleg udeležnosti v predstavljanje antigenov, se širi tudi seznam bolezni v katere je vpleten:

- Vnetne in avtoimunske bolezni

Glede na dobro znano vlogo vnetnih citokinov na povečano izražanje imunoproteasoma, so bile njegove funkcije obširno raziskane v povezavi z vnetnimi in avtoimunskimi boleznimi. Povišana aktivnost imunoproteasoma je bila ugotovljena pri ulceroznem kolitisu, Crohnovi bolezni in hepatitisu. V vzorcih pacientov z vnetnimi črevesnimi boleznimi so bile najdene povišane koncentracije β 1i in β 5i proteinov v primerjavi z normalnim tkivom. Transgene miši brez β 1i podenote niso razvile eksperimentalno-induciranega kolitisa, prav tako je selektivna inhibicija β 1i podenote imunoproteasoma ublažila škodo v črevesni mukozi [22]. Podobne rezultate so dobili v raziskavi na miših z revmatoidnim artritisom in pri transgenih miših brez β 5i podenote, kar kaže na vpletenost imunoproteasoma v imunskem odgovoru na te bolezni. S selektivno

inhibicijo $\beta 5i$ podenote so ublažili vnetni imunski odgovor in zmanjšali resne bolezenske simptome [23]. Ti rezultati so dokaz, da je pri teh vnetnih in avtoimunskih boleznih v razvoj bolezni vpleten imunoproteasom in da je selektivna inhibicija le tega dobra terapevtska tarča.

- Rakava obolenja

V hitro delečih se rakavih celicah igra proteasom pomembno vlogo, saj vpliva na aktivacijo in deaktivacijo večih regulatorjev celičnega cikla in hkrati reciklira odvečne proteine. Medtem ko je za maligne celice značilna povečana aktivnost konstitutivnega proteasoma v primerjavi z nemalignimi celicami, pa koncentracija imunoproteasoma varira glede na vrsto tumorja. Ezofagealni, renalni, kožni rak so primeri, pri katerih je izražanje imunoproteasoma zmanjšano, nasprotno pa je pri multiplem mielomu, raku prostate in pljučnem raku izražanje povečano [19, 24]. Raziskave na *in vitro* in *in vivo* modelih raka prostate in multiplega mieloma so pokazale, da selektivno zaviranje imunoproteasoma izboljša protitumorsko delovanje in toksikološki profil v primerjavi s širokodelujočimi zaviralci proteasoma [25]. To potrjuje vpletenost imunoproteasoma v proces preživetja tumorskih celic in je zaradi tega potencialna tarča za kemoterapevtike.

- Bolezni centralnega živčnega sistema (CŽS) in staranje

Bolezni CŽS so pogosto povezane z nalaganjem proteinskih agregatov zaradi neuravnotežene sinteze proteinov in proteolize. Oksidirani proteini, ki tvorijo amorfne agregate znotraj celice, potujejo direktno v 20S jedro proteasoma brez predhodne vezave ubikvitina in prepoznavanja preko 19S regulatore enote. Visok delež oksidativnih poškodb poveča stopnjo zamreženja proteinskih fragmentov, zaradi česar postanejo agregati odporni na proteolizo. V starejših možganih je prisotno kronično vnetje, kar je povezano tudi s povečanim številom in velikostjo visoko oksidiranih agregatov. Netopni in nepravilno zviti agregati proteinov so lahko nevrotoksični in so povezani z razvojem Parkinsonove in Alzheimerjeve bolezni.

Številne raziskave kažejo, da je pri bolezenskih stanjih kot so Alzheimerjeva, Huntingtonova bolezen, amiotrofična lateralna skleroza raven imunoproteasoma povišana. Na miših z eksperimentalnim avtoimunskim encefalomyelitisom in kliničnih vzorcih bolnikov z multiplo sklerozo so tekom akutnega napada opazili povišano aktivnost imunoproteasoma, pri kronični obliki bolezni pa upad aktivnosti konstitutivnega proteasoma. To nakazuje, da je imunoproteasom tisti, ki razgrajuje poškodovane proteine pri vnetnih demielinizirajočih boleznih [26].

1.4 ZAVIRALCI PROTEASOMA

Zaviralci proteasoma zavzemajo pomembno mesto tako v temeljnih kot uporabnih biokemijskih raziskavah. Služijo kot orodje za raziskovanje raznolikih in zapletenih mehanizmov delovanja proteasoma in postavljajo temelje za razvoj novih zdravil, ki ciljajo UPS.

Zaviranje proteasoma vpliva na številne regulatorne proteine, kot so ciklini, ciklin kinazni zaviralci (p27), tumorski supresorji (p53), transkripcijski faktorji (NF- κ B), saj se le ti aktivirajo z razgradnjo v proteasomu. Zaviralci proteasoma tako vplivajo na celično delitev, ki jo lahko popolnoma ustavijo, zavrejo transkripcijo antiapoptotičnih genov in povzročijo kopičenje proapoptotičnih faktorjev, čemur sledi celična smrt. Številne raziskave so dokazale terapevtsko uporabnost zaviranja proteasoma pri zdravljenju raka, katerega hitro deleče celice imajo povečano potrebo po razgradnji ciklinov in odstranjevanju napačno zvitih proteinov ter so zaradi tega dosti bolj dovzetne za zaviranje proteasoma.

Medtem ko je v tumorskih celicah nasploh povečano izražanje proteasoma, pa se nenormalne koncentracije imunoproteasoma pojavljajo predvsem pri nevrodegenerativnih boleznih, avtoimunskih okvarah in nekaterih vrstah raka. Potrebno bo še natančneje raziskati ali je povečano izražanje imunoproteasoma vzrok ali posledica bolezni, vendar pa je selektivno zaviranje imunoproteasoma obetavna terapevtska strategija [8, 27].

1.4.1 Neselektivni zaviralci proteasoma

Večina raziskanih proteasomskih zaviralcev je peptidne narave in oponašajo vezavo naravnih substratov preko vzpostavitve antiparalelne β strukture z aktivnim mestom. Vezavna specifičnost na podenoto je torej v glavnem odvisna od peptidnega dela zaviralca (aminokislinsko zaporedje), večja zaviralna moč pa je dosežena z dodano elektrofilno funkcionalno skupino, ki se reverzibilno ali ireverzibilno veže na Thr1 ostanek aktivnega mesta preko kovalentne vezi [28]. Glede na tip elektrofilne bojne glave lahko te kovalentne zaviralce razdelimo v sedem skupin (Slika 3):

1) Aldehidi so bili prvi razviti zaviralci proteasoma. Elektrofilna karbonilna skupina reagira z *N*-terminalnim Thr1 ostankom proteolitske podenote β in tvori reverzibilni

hemiacetal. Po enakem mehanizmu imajo ti aldehidi za tarčo tudi serinske in cisteinske proteaze. Zaradi oksidacije se hitro deaktivirajo, kar omejuje njihov terapevtski potencial.

2) Boronati so po odobritvi bortezomiba (Velcade[®]) s strani Zveznega urada za hrano in zdravila (FDA) za zdravljenje multiplega mieloma postali najbolj obetavni zaviralci proteasoma. Z aktivnim mestom proteasoma tvorijo reverzibilni tetraedrični intermediat, ki je stabiliziran z vodikovimi vezmi med hidroksilno skupino boronata in oksianionsko luknjo Gly47NH ter Thr1N. Zaradi teh povezav ima bortezomib sicer večjo afiniteto do Ntn-hidrolaz kot do ostalih proteaz, vendar kljub temu deluje tudi na serinske proteaze. Njegovo delovanje v zdravih celicah povzroča hude stranske učinke kot so periferna nevropatija, gastrointestinalne motnje in trombocitopenija. Dolgoročno uporabo in complianco pacientov omejuje tudi intravenska uporaba in pojav odpornosti [27, 29].

3) Epoksiketoni so peptidi s terminalnim α,β' -epoksiketonom kot dvojno elektrofilno bojno glavo. Reagirajo z nukleofilnim Thr1O^γ po dvostopenjskem mehanizmu. Najprej nastane reverzibilni hemiketal med Thr1O^γ in ketonom, nato pa sledi nukleofilni napad Thr1N na epoksid. Preko tvorbe sekundarnega amina s Thr1 nastane ireverzibilni 1,4-morfolinski obroč [7]. Predstavnik te skupine, ki je trenutno v klinični rabi, je karfilzomib (Kyprolis[®]). Karfilzomib je derivat naravne spojine epoksimicina in je bolj specifičen za proteasom kot bortezomib (predvsem za $\beta 5/\beta 5i$ podenoto), zato deluje pri nižjih koncentracijah in ima manj stranskih učinkov. Slabosti pa sta predvsem slaba biološka uporabnost (i.v. aplikacija) in kratka razpolovna doba (30 minut) [27].

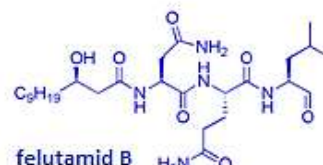
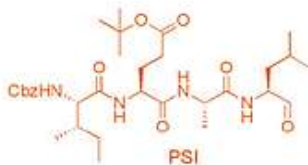
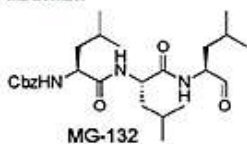
4) α -ketoaldehidi tako kot epoksiketoni najprej tvorijo reverzibilni hemiketal med Thr1O^γ in ketonom, nato pa sledi nukleofilni napad Thr1N na aldehyd. Nastane reverzibilni ciklični karbinolamiski intermediat s Thr1, ki se s kondenzacijo transformira v 5,6-dihidro-2H-1,4-oksazinski obroč. Zaradi unikatnega mehanizma, ki vključuje Thr1O^γ in Thr1N, so α,β' -epoksiketoni in α -ketoaldehidi najbolj specifične funkcionalne bojne glave za proteasom.

5) β -laktoni so obetavni farmakofori z naravnim predstavnikom marizomibom v kliničnih raziskavah. Nukleofil Thr1O^γ napade karbonilni ogljik estrske skupine in odpre laktonski obroč, s čimer nastane nova hidroksilna skupina in acil-encimski ester. Aktivno mesto se obnovi s počasno hidrolizo acil-encimskega kompleksa, saj je NUK tekom reakcije odmaknjen iz svoje normalne pozicije. Pri marizomibu tvorbi acil-encimskega estra sledi še drugi korak reakcije. Kloroetilna stranska veriga marizomiba napade novo formirano –OH skupino, sledi ireverzibilna ciklizacija do tetrahidrofuranskega obroča, kar pomeni, da se aktivno mesto ne more obnoviti.

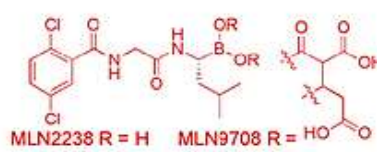
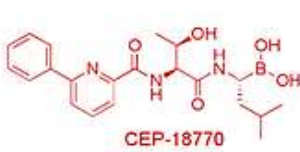
6) Peptidi z vinil sulfonsko glavo reagirajo z aktivnim Thr1 preko Michaelove 1,4-adicije pri kateri nastane ireverzibilna eterska vez. Poleg tega lahko reagirajo tudi s tiolno skupino cisteinskih proteaz.

7) Sirbaktini so naravni makrolaktamski obročni sistemi, ki preko vinilamidne funkcionalne skupine reagirajo s Thr1 po podobnem mehanizmu kot vinil sulfoni [27].

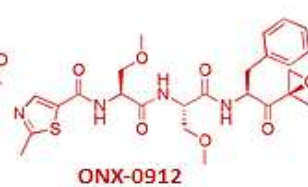
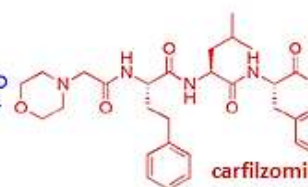
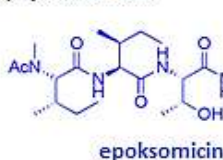
1) Aldehidi:



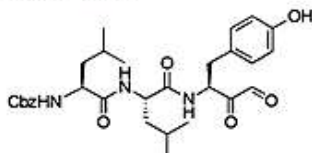
2) Boronati:



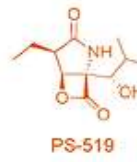
3) Epoksiketoni:



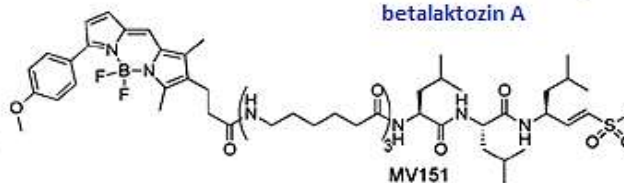
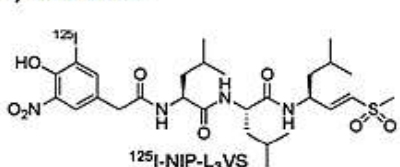
4) α -ketoaldehydi:



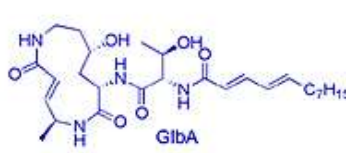
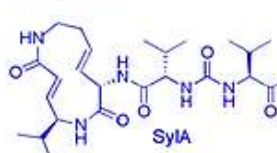
5) β -laktoni:



6) Vinil sulfoni:



7) Sirbaktini:



Slika 3. Predstavniki glavnih razredov neselektivnih kovalentnih zaviralcev proteasoma. Naravni produkti so obarvani modro. Sintetični zaviralci v klinični rabi za zdravljenje raka so obarvani rdeče. Naravni produkt v kliničnih testiranjih za zdravljenje raka je obarvan roza. Sintetna zaviralca za zdravljenje drugih indikacij sta obarvana oranžno. Povzeto po [30].

Zaradi stabilne kovalentne vezave teh spojin na proteasom v normalnih celicah so v izogib stranskim učinkom razvili nekovalentne zaviralce in specifične zaviralce za posamezne podenote proteasoma. Primeri obetavnih nekovalentnih zaviralcev so ciklični peptidi (TMC-95 in njegovi derivati, Argirin A, scitonemin A in B), ki se tesno vežejo v aktivno mesto proteasoma in preprečijo dostop substratu. Nekovalentno se vežejo tudi nepeptidni zaviralci, kot so PI-083 in hidroksisečnine (velike hidrofobne skupine zasedejo S1 in S3 žep, nimajo pa kontakta s Thr1).

Zanimivi so tudi alosterični zaviralci, ki se ne vežejo na katalitične podenote. Aktivnost proteasoma onemogočajo z vezavo bodisi na α podenote regulatornega dela proteasoma (PR-39) ali pa na nekatalitične podenote jedra (5-amino-8-hidroksikinolin) [30].

1.4.2 Selektivni zaviralci

Večina zgoraj navedenih zaviralcev primarno zavira kimotripsinsko podenoto ($\beta 5/\beta 5i$), sočasno pa zavira tudi kaspazno ($\beta 1/\beta 1i$) in/ali tripsinsko podenoto ($\beta 2/\beta 2i$). Ob uvedbi bortezomiba, ki zavira tudi kaspazno podenoto, se je pojavilo vprašanje ali je to ključnega pomena za njegovo antineoplastično delovanje, zato so razvili za podenote specifične zaviralce. S temi spojinami so pokazali, da povečana specifičnost zaviralcev zmanjša citotoksične učinke za celice multiplega mieloma in da hkratno zaviranje $\beta 2/\beta 2i$ podenote poveča občutljivost celic na $\beta 5/\beta 5i$ zaviralce [31].

Številni zaviralci proteasoma prav tako ne razlikujejo med konstitutivnim proteasomom in imunoproteasomom zaradi majhnih razlik v vezavnem mestu. Pri boleznih, za katere je značilno nenormalno povečano izražanje imunoproteasoma, je smiselno selektivno zaviranje le tega. Tako je konstitutivni proteasom, ki je pomemben del številnih celičnih funkcij normalnih celic neoviran, kar zmanjša pojavnost neželenih učinkov [28].

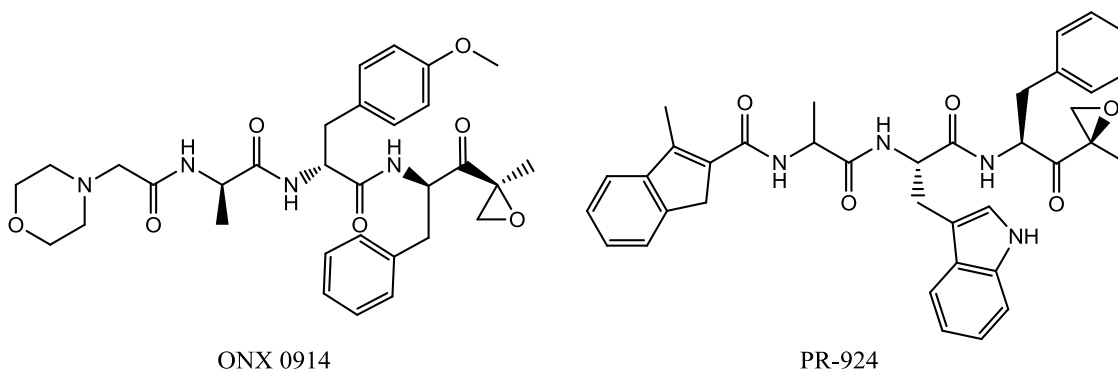
Razvoj selektivnih zaviralcev je torej pomemben za določanje profila aktivnih mest in uvedbo ustrezne terapije z maksimalno citotoksičnostjo in selektivnostjo za maligne celice.

- $\beta 5/\beta 5i$ selektivni zaviralci

Z zaviranjem kimotripsinske podenote proteasoma povzročimo celično smrt, kar se s pridom uporablja pri zdravljenju multiplega mieloma. Zadnje čase pa je vse več raziskav usmerjenih v selektivno zaviranje $\beta 5i$ podenote, ki procesira antigene za predstavitev na MHC I in je vpletena v produkcijo vnetnih citokinov. Prvi $\beta 5i$ selektivni zaviralec ONX 0914 (Slika 4) je omogočil določitev ključnih strukturnih sprememb med konstitutivnim in

imunoproteasomom (Tabela 1). Poznavanje razlik v vezavnih mestih med enim in drugim proteasomom je odprlo vrata za razvoj spojin specifičnih za $\beta 5$ podenoto in za izboljšanje selektivnosti $\beta 5i$ zaviralcev [32].

ONX 0914 je ireverzibilni α',β' -epoksiketon z veliko hidrofobno skupino, ki se preferenčno veže v S1 žep $\beta 5i$ podenote, saj je S1 žep $\beta 5$ podenote zanjo premajhen. Uspešno zavira napredovanje vnetnih bolezni (revmatoidni artritis, kolitis, SLE) in je terapevtsko učinkovit že pri koncentracijah, ki so mnogo nižje od maksimalne tolerirane vrednosti. PR-924 je še eden izmed epoksiketonovskih $\beta 5i$ selektivnih zaviralcev in ima dober potencial kot protitumorska učinkovina (povzroča apoptozo celic multiplega mieloma), medtem ko selektivni zaviralci $\beta 5$ podenote (PR-825, PR-893) nimajo terapevtskih indikacij [27].



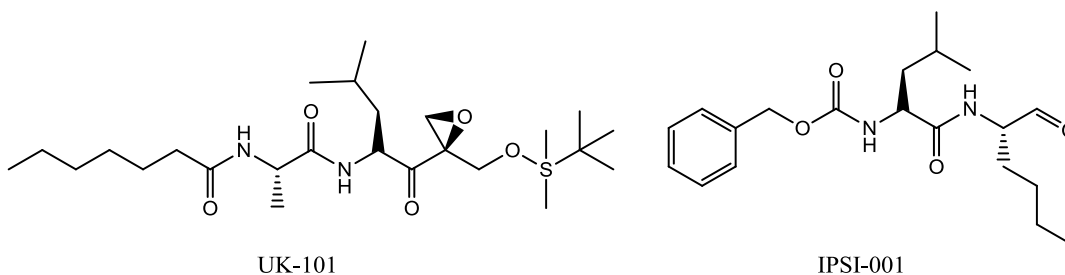
Slika 4. Predstavnika $\beta 5/\beta 5i$ selektivnih zaviralcev

- $\beta 1/\beta 1i$ selektivni zaviralci

Največja razlika med konstitutivno in njegovo imunoizoforno je v kaspazni podenoti, kjer $\beta 1$ podenota sprejme tako kisle kot AK hidrofobne ostanke, $\beta 1i$ podenota pa prednostno cepi proteine le za hidrofobnimi AK ostanke. Pri $\beta 1i$ podenoti je zmanjšana tudi velikost S1 in S3 žepa.

Prvi $\beta 1i$ selektivni zaviralec UK-101 inducira smrt celic raka prostate, ki povečano izraža prav $\beta 1i$ podenoto, saj se s svojim hidrofobnim heptanojskim repom odlično prilega S3 žepu, levcinska stranska veriga pa se veže v S1 žep.

IPSI-001 (kalpeptin) je aldehydni zaviralec, ki se selektivno veže na $\beta 1i$ ter inducira apoptozo hematoloških malignih celic, ki povečano izražajo imunoproteasom in so odporne na bortezomib [27].



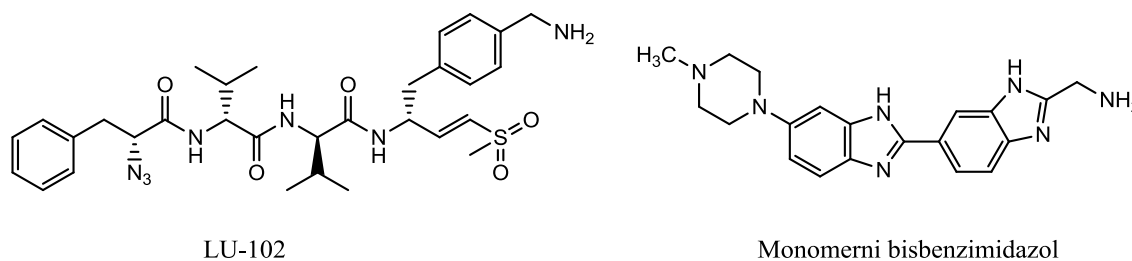
Slika 5. Predstavnika $\beta 1/\beta 1i$ selektivnih zaviralcev

- $\beta 2/\beta 2i$ selektivni zaviralci

Selektivni zaviralci tripsinske aktivnosti proteasoma sami po sebi sicer nimajo protitumorskega učinka, povečajo pa občutljivost malignih celic na druge zaviralce.

LU-102 je peptidni vinilsulfonski $\beta 2/\beta 2i$ selektiven zaviralec, ki ohranja celokupno razgradnjo ubikvitiniranih proteinov, zmanjša pa razgradnjo I κ B–NF- κ B kompleksa. I κ B je inhibitorni protein vezan na osrednji regulatorni protein NF- κ B. Z njegovo odstranitvijo v proteasomu, se prosti NF- κ B translocira v jedro celice, kjer aktivira transkripcijo mnogih genov vključno z rastnimi faktorji, faktorji angiogeneze, celičnimi adhezijскими molekulami in antiapoptotičnimi faktorji. V kombinaciji z ibrutinibom (tirozin kinazni zaviralec za zdravljenje B-celičnega limfoma) deluje LU-102 sinergistično in je bolj učinkovit kot bortezomib, ki deluje na $\beta 1$ in $\beta 5$ podenoti [33].

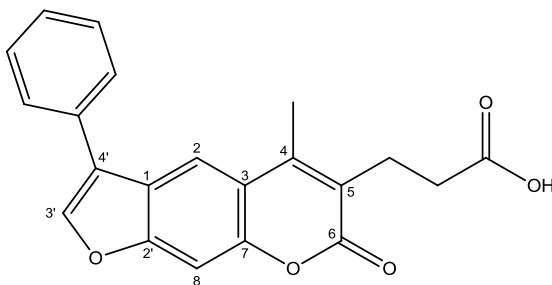
Monomer in dimer bisbenzimidazola sta prva selektivna zaviralca imunoproteasomske tripsinske podenote $\beta 2i$. Delujeta v nanomolarnem območju in se bolje prilegata v $\beta 2i$ aktivno mesto kot v $\beta 2$ podenoti kljub veliki podobnosti obeh vezavnih mest. Čeprav vloga $\beta 2i$ podenote še ni povsem razjasnjena pa njena odsotnost prepreči razvoj kolitisa, kar kaže na možno terapevtsko uporabnost selektivnega zaviranja $\beta 2i$ podenote [29].



Slika 6. Predstavnika $\beta 2/\beta 2i$ selektivnih zaviralcev

2. NAMEN DELA

Večina trenutnih zaviralcev imunoproteasoma ima peptidno ogrodje, s čimer je povezana njihova slaba metabolična stabilnost in nizka biološka uporabnost. Poleg izboljšav trenutnega nabora peptidnih imunoproteasomskih zaviralcev je potrebno razvijati nove zaviralce z drugačnim strukturnim ogrodjem in izboljšanimi fizikalnokemijskimi lastnostmi ter posledično boljšo farmakološko uporabnostjo. Z virtualnim reševanjem banke spojin ZINC so na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo odkrili novo spojino zadetek z nepeptidnim skeletom, ki reverzibilno zavira β 5i podenoto imunoproteasoma v nizkem mikromolarnem območju (Slika 7).



Slika 7. Spojina vodnica: 3-(5-metil-7-okso-3-fenil-7H-furo[3,2-g]kromen-6-il)propanojska kislina

Z namenom optimizacije tega novoodkritega zaviralca bomo na podlagi njegove strukture načrtovali in sintetizirali usmerjeno knjižnico novih derivatov s 4'-heteroarilno substitucijo na 4-metilpsoralenskem skeletu. Z menjavo fenilnega obroča s 2,5-dimetiltiofenom, 2,5-dimetilfuranom in furanom bomo skušali izboljšati prileganje spojine v S3 žep aktivnega mesta. Nato bomo z uvedbo elektrofilne bojne glave na karboksilno skupino iz teh reverzibilno delujočih spojin sintetizirali potencialne ireverzibilne zaviralce. Elektrofilni centri lahko tvorijo kovalentno vez s treoninom v aktivnem mestu imunoproteasoma in s tem izboljšajo zaviralno delovanje spojin. Na koncu bomo spojine še biokemijsko ovrednotili z določanjem rezidualne aktivnosti na β 5i podenoti imunoproteasoma.

Osnovni skelet naših končnih spojin bo predstavljal furokumarinski oz. psoralenski obroč, katerega sinteza bo potekala v več stopnjah. Najprej bomo kot dva osnovna gradnika pripravili derivat 7-hidroksikumarina ter ustrezne α -bromoketone. V naslednjem koraku bomo oba dobljena prekursorja povezali med sabo z reakcijo nukleofilne substitucije. V bazičnem okolju bomo dobljeni substituirani 3-(kumarin-7-il)propanoat zaciklali do linearne furokumarina s karboskilatom v stranski verigi. V zadnjem koraku sinteze bomo

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Tekom izvedbe eksperimentalnega dela smo uporabili reagente in topila naslednjih proizvajalcev: Sigma Aldrich, Acros Organics, Carlo Erba, Fluka, Merck, AK Scientific.

Topila: EtOH, EtOAc, CH₂Cl₂, MeOH, THF, n-heksan, 2-propanol, koncentrirana H₂SO₄, očetna kislina, 10% (m/V) citronska kislina, 1 M NaOH, 1 M HCl

Topila smo uporabljali za izvedbo reakcij in za pripravo mobilnih faz. Brezvodni THF smo pripravili tik pred uporabo topila z destilacijo ob prisotnosti Na v argonovi atmosferi in benzofenona kot indikatorja.

Baza: TEA

Nasičene vodne raztopine: NaCl, NaHCO₃

Sušilno sredstvo: Na₂SO₄

Orositveni reagenti: raztopine ninhidrina, bromkrezolno zelenega, 2,4-dinitrofenilhidrazina

3.2 METODE

Ekstrakcija

Za ekstrahiranje smo kot vodno fazo uporabili prečiščeno vodo, 10% (m/V) citronsko kislino, 1 M vodno raztopino HCl, nasičeno raztopino NaHCO₃. Kot organsko fazo smo uporabljali EtOAc. Združene organske faze smo sušili z nasičeno vodno raztopino NaCl in Na₂SO₄.

Kromatografske metode

Tankoplastna kromatografija (TLC): Potek reakcij in čistost produkta po kolonski kromatografiji smo določali na TLC ploščah Silica gel 60 F254 proizvajalca Merck (0,20 mm debel nanos silikagela z dodanim fluorescenčnim indikatorjem na aluminijastem nosilcu). Uporabljene mobilne faze so navedene pri posameznih spojinah v poglavju 4. Za detekcijo spojin smo uporabili UV svetlobo ($\lambda = 254$ nm in $\lambda = 366$ nm) in zgoraj naštete raztopine orositvenih reagentov.

Kolonska kromatografija: Spojine smo očistili z različnimi mobilnimi fazami (navedene pri sinteznih postopkih v poglavju 4) s kolonsko »flash« kromatografijo, kjer smo kot stacionarno fazo uporabili Silica Gel 20, proizvajalca Merck z velikostjo delcev 0,040–0,063 mm.

Visokotlačna tekočinska kromatografija (HPLC): Čistost spojin smo preverili na sistemu Agilent Technologies HP 1100 z G1365B UV-VIS detektorjem (220 in 254 nm). Uporabili smo kolono Agilent Eclipse Plus C18 (4,6 × 150 mm), kot mobilno fazo pa mešanico 0,1 % raztopine trifluorocetne kisline in acetonitrila. Volumen injiciranja je bil 10 µL, hitrost pretoka mobilne faze pa 1 mL/min.

Spektroskopske metode

Infrardeča spektroskopija (IR): Infrardeče spektre spojin smo s tehniko oslabiljenega popolnega odboja (angl. attenuated total reflectance, ATR) posneli na Perkin-Elmer FT-IR, Spectrum BX spektrofotometru na Fakulteti za farmacijo.

Jedrska magnetna resonanca (NMR): Za potrditev strukture sintetiziranih spojin smo posneli ¹H in ¹³C spektre z Bruker Avance III 400 MHz spektrometrom na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Vzorce smo raztopili v devteriranem topilu (CDCl₃ ali DMSO-*d*₆), kot interni standard pa smo uporabili TMS. Spektre smo obdelali s programom MestRe-C 4.8.6 (Masterlab Research SL.).

Masna spektrometrija visoke ločljivosti (HRMS): Masni spektri so bili posneti na VG-Analytical AutoSpec Q (Micromass) masnem spektrometru z ESI tehniko v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

Elementna analiza

Za izvedbo elementne analize je bil uporabljen analizator Perkin-Elmer 240C na Katedri za organsko kemijo Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani.

Določanje temperature tališča

Spojine smo segrevali na ogrevalni mizici znamke Leica in jim s pomočjo Kofflerjevega mikroskopa določali temperaturo tališča (Fakulteta za farmacijo). Talilni intervali so nekorrigirani.

Izris struktur in reakcij

Kemijske strukture in reakcijske sheme smo izrisali s pomočjo računalniškega programa ChemBioDraw Ultra 11.0 (Cambridge Soft).

Biokemijsko ovrednotenje

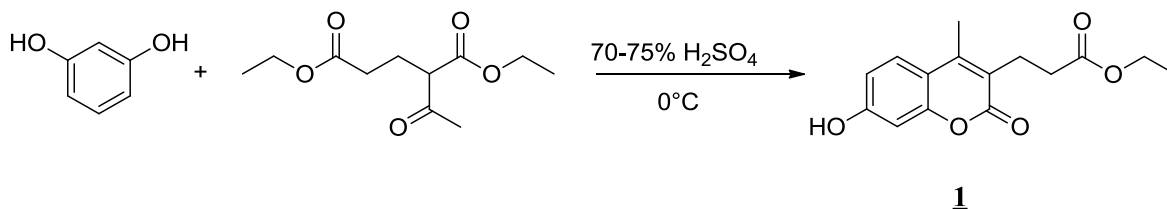
Spojine je biokemijsko ovrednotila doc. dr. Martina Gobec s Katedre za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo. S preliminarnimi testi so bile določene rezidualne aktivnosti na kimotripsinu podobni podenoti ($\beta 5i$) imunoproteasoma. Humanemu 20S imunoproteasomu, izoliranemu iz humanih perifernih mononuklearnih krvnih celic, so dodali 10 μ M koncentracije naših produktov in ju nato inkubirali pri 37 °C pol ure. Za kontrolne vrednosti so uporabili samo pufer s pH = 7,4 (0,01% SDS, 50 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA). Nato so dodali za $\beta 5i$ podenoto selektiven substrat Suc-LLVY-AMC in merili aktivnost encima dve uri na vsakih 5 minut. Pomerili so fluorescenco (F) pri 460nm v odvisnosti od časa (t). Večja kot je hitrost nastajanja fluorogenega substrata, večja je aktivnost encima. Iz dobljenih meritev so določili začetno hitrost encimske reakcije (k), ki je enaka naklonu premice v časovnem intervalu med 15. in 60. minuto. Razmerje vrednosti začetne hitrosti encimske reakcije tretiranega encima (k_t) in netretiranega encima (k_{nt}) nam poda rezidualno aktivnost encima.

$$k = \Delta F / \Delta t \quad ; \quad RA (\%) = (k_t / k_{nt}) \times 100$$

Spojnam, ki so na podlagi nizke rezidualne aktivnosti izražale dobre zaviralne lastnosti, so nadalje določili še konstanto inhibicije (K_i) za reverzibilne zaviralce in polovično maksimalno inhibitorno koncentracijo (IC_{50}) za ireverzibilne zaviralce. Delo je potekalo podobno kot pri preliminarnih testiranjih, le da so pri določanju obeh parametrov uporabili zaviralce v različnih koncentracijah, pri določanju K_i pa poleg tega tudi štiri različne koncentracije dodanega substrata. IC_{50} in K_i sta bila določena v programu GraphPad Prism s prilaganjem RA v odvisnosti od koncentracije zaviralca in substrata različnim modelnim funkcijam, in sta podana kot povprečje vsaj treh neodvisnih meritev.

4. EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 Sinteza etil 3-(7-hidroksi-4-metil-2-okso-2H-kromen-3-il)propanoata (**1**)



Kristale resorcinola (1 ekv; 1,7 g; 15,5 mmol) smo strli v terilnici in jih prenesli v bučko, postavljeno na ledeno kopel. V bučko smo ob stalnem mešanju s kapalnikom počasi dodajali 70–75 % vodno raztopino H₂SO₄ (50 mL) dokler se resorcinol ni raztopil. Počasi smo dodali še dietil-2-acetilglutarat (1,5 ekv; 5 mL; 23,2 mmol) in zmes pustili mešati 2 uri pri sobni temperaturi. Nato smo vsebino bučke ob stekleni palčki vlili na led, jo sprali z vodo in postavili na mešalo, da je izpadla bela oborina. Oborino smo odnučali, posušili, prenesli v bučko in jo raztopili v EtOH (50 mL). Dodali smo katalitično količino koncentrirane H₂SO₄ (1 mL) ter zmes mešali 4 ure pod refluxom pri 85 °C. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom, dodali nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (50 mL) in vsebino bučke prenesli v lij ločnik. Vodno fazo smo ekstrahirali z EtOAc (3 × 50 mL). Združene organske faze smo ponovno ekstrahirali z nasičeno vodno raztopino NaCl (50 mL), jih sušili z Na₂SO₄ ter topilo odparili pod znižanim tlakom. V bučki je ostala trdna snov bele barve (3,9 g).

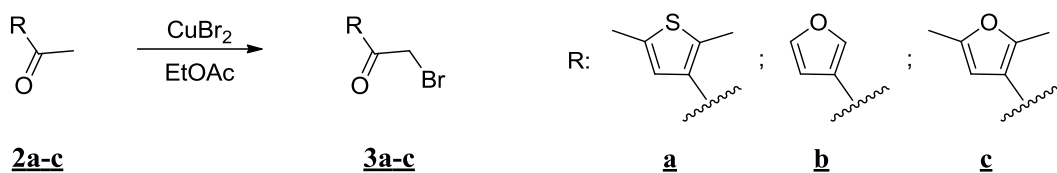
Izkoristek reakcije: 92%; Izgled: trdna amorfna snov bele barve; T_{tal}: 104,0–108,0 °C;

TLC: R_f = 0,23; MF: CH₂Cl₂/MeOH= 20/1, orositveni reagent: ninhidrin;

IR (ATR) ν = 3240, 2978, 1729, 1670, 1613, 1566, 1293, 1237, 1178, 1154, 1095, 1053, 867, 818, 781, 690 cm⁻¹;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,15 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H, CH₂CH₃); 2,37 (s, 3H, Ar-CH₃); 2,46 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H, CH₂CH₂COO); 2,79 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H, CH₂CH₂COO); 4,03 (q, *J* = 7,2 Hz, 2H, CH₂CH₃); 6,68 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H, Ar-H); 6,79 (dd, *J*₁ = 8,8 Hz, *J*₂ = 2,4 Hz, 1H, Ar-H); 7,61 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, Ar-H); 10,43 (br s, 1H, OH)

4.2 Bromiranje 3-acetil-heteroarilnih derivatov

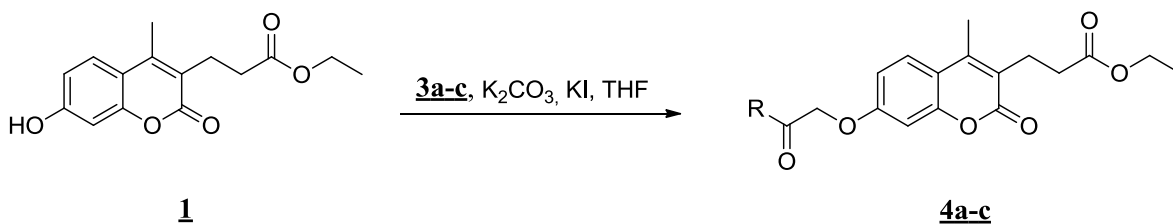


	Izgled	Masa izhodne spojine (g)	Masa surovega produkta (g)	Izkoristek reakcije (%)	R _f
3a	temno sivo olje	3,0	5,1 (55% čistost)	49	0,84
3b	beli kristali	2,0	3,0 (70% čistost)	88	0,76
3c	beli kristali	2,0	2,2 (75% čistost)	70	0,87

Slika 9. Sintezna shema bromiranja 3-acetil-heteroarilov **2a-c** in tabela osnovnih podatkov dobljenih produktov (**3a** - 3-bromoacetil-2,5-dimetiltiofen; **3b** - 3-bromoacetilfuran; **3c** - 3-bromoacetil-2,5-dimetilfuran)

V bučko smo zatehtali izhodno spojino **2a** (1 ekv; 3,0 g; 19,5 mmol) ter dodali EtOAc (20 mL) in CuBr₂ (2,5 ekv; 10,9 g; 48,75 mmol). Vsebino smo mešali pri 83 °C 72 ur. Reakcijsko zmes smo nato prefiltrirali in ji pod znižanim tlakom odparili topilo. Enak sintezni postopek smo uporabili za sintezo spojin **3b** in **3c** iz izhodnih reagentov **2b** in **2c**. Potek reakcije smo preverili s TLC-jem razvitem v MF: CH₂Cl₂/MeOH= 20/1 + 0,3% očetna kislina za spojini **3a**, **3c** in v MF: CH₂Cl₂/MeOH= 20/1 za spojino **3b**. Orosili smo jih z bromkrezolno zelenim.

4.3 Sinteza derivatov etil 3-(7-hidroksi-4-metil-2-okso-2H-kromen-3-il)propanoata



	Produkt reakcije	Izkoristek, izgled, T_{tal}
4a		24% (139 mg), svetlo rjava trdna spojina, $T_{\text{tal}} = 97,5\text{--}98,5\text{ }^\circ\text{C}$
4b		32% (334 mg), siva trdna spojina, $T_{\text{tal}} = 108,8\text{--}113,4\text{ }^\circ\text{C}$
4c		44% (1058 mg), svetlo rjavi kristali, $T_{\text{tal}} = 53,5\text{--}56,5\text{ }^\circ\text{C}$

Slika 10. Sintezna shema derivatov etil 3-(6-hidroksi-1-metil-3-okso-3,4-dihidronaftalen-2-il)propanoata **4a-c** in tabela osnovnih podatkov dobljenih produktov

Natehtali smo izhodno spojino **1** (1 ekv; 1,5 g; 5,4 mmol), bučko prepihali z argonom in raztopili reagent v THF (15 mL). Dodali smo K_2CO_3 (2 ekv; 1,5 g; 10,8 mmol), katalitično količino KI (0,1 ekv; 0,09 g; 0,5 mmol) in ustrezen bromid **3a-c** ter ob mešanju segrevali 24 ur na $60\text{ }^\circ\text{C}$. Nato smo pod znižanim tlakom uparili topilo, zaostanek pa raztopili v EtOAc (50 mL) in vsebino kvantitativno prenesli v lij ločnik. Bučko smo sprali z vodo (50

mL) in nato izvedli ekstrakcijo z EtOAc (2×50 mL). Združene organske faze smo sprali z nasičenim NaCl (60 mL), jih sušili z Na_2SO_4 , filtrirali in matičnici uparili topilo. Trdno zmes, ki je ostala v bučki, smo prekrystalizirali iz EtOH in dobili čist produkt.

Etil 3-(7-(2-(2,5-dimetiltiofen-3-il)-2-oksoetoksi)-4-metil-2-okso-2H-kromen-3-il)propanoat (4a)

TLC: $R_f = 0,44$; MF: EtOAc/n-heksan = 1/1; orositveni reagent: 2,4-dinitrofenilhidrazin

IR (ATR) $\nu = 2897, 1723, 1689, 1611, 1563, 1509, 1477, 1427, 1375, 1341, 1299, 1255, 1230, 1208, 1166, 1134, 1086, 1034, 985, 921, 837, 795, 768, 726 \text{ cm}^{-1}$;

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1,23 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H, CH_2CH_3); 2,43 (s, 3H, CH_3); 2,45 (s, 3H, CH_3); 2,59 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$); 2,68 (s, 3H, CH_3); 2,95 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$); 4,11 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, CH_2CH_3); 5,11 (s, 2H, OCH_2CO); 6,74 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, Ar-H); 6,93 (dd, $J_1 = 8,9$ Hz, $J_2 = 2,6$ Hz, 1H, Ar-H); 7,03 (d, $J = 1,2$ Hz, 1H, Ar-H); 7,53 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H, Ar-H);

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 14,13; 14,90; 14,95; 16,02; 23,06; 32,53; 60,43; 71,50; 101,32; 112,47; 114,55; 121,68; 124,05; 125,84; 131,86; 136,38; 147,28; 150,08; 153,50; 160,12; 161,48; 172,75; 188,69;

HRMS (ESI) m/z izračunan za $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{O}_6\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 429,1372; izmerjen 429,1365.

Etil 3-(7-(2-(furan-2-il)-2-oksoetoksi)-4-metil-2-okso-2H-kromen-3-il)propanoat (4b)

TLC: $R_f = 0,31$; MF: EtOAc/n-heksan = 1/1;

IR (ATR) $\nu = 3125, 2978, 1693, 1675, 1613, 1564, 1509, 1466, 1424, 1378, 1323, 1295, 1275, 1236, 1202, 1155, 1149, 1083, 1069, 1025, 994, 979, 913, 907, 846, 815, 772 \text{ cm}^{-1}$;

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1,23 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H, CH_2CH_3); 2,43 (s, 3H, CH_3); 2,59 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$); 2,95 (t, $J = 7,8$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$); 4,11 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H, CH_2CH_3); 5,20 (s, 2H, OCH_2CO); 6,62 (dd, $J_1 = 3,6$ Hz, $J_2 = 1,7$ Hz, 1H, Ar-H); 6,79 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H, Ar-H); 6,95 (dd, $J_1 = 8,9$ Hz, $J_2 = 2,8$ Hz, 1H, Ar-H); 7,39 (dd, $J_1 = 3,6$ Hz, $J_2 = 0,7$ Hz, 1H, Ar-H); 7,54 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H, Ar-H); 7,67 (dd, $J_1 = 1,7$ Hz, $J_2 = 0,7$ Hz, 1H, Ar-H);

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 14,14; 14,93; 23,09; 32,53; 60,45; 69,95; 101,52; 112,41; 112,69; 114,79; 118,71; 121,91; 125,93; 147,13; 147,23; 150,43; 153,51; 159,91; 161,44; 172,77; 182,42;

HRMS (ESI) m/z izračunan za $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 385,1287; izmerjen 385,1280.

Etil 3-(7-(2-(2,5-dimetilfuran-3-il)-2-oksoetoksi)-4-metil-2-okso-2H-kromen-3-il)propanoat (4c)

TLC: Rf = 0,49; MF: EtOAc/n-heksan = 1/1;

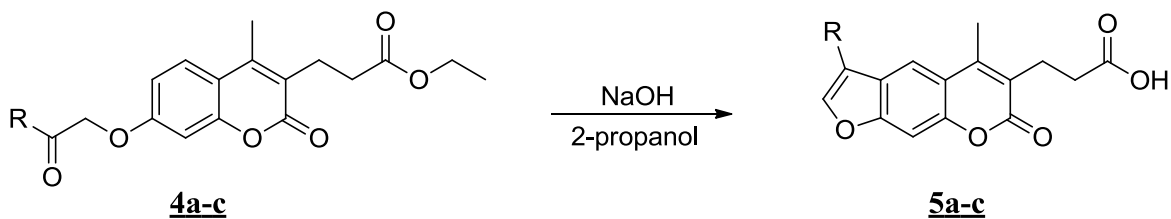
IR (ATR) ν = 2926, 1701, 1607, 1567, 1509, 1431, 1370, 1283, 1231, 1159, 1088, 1007, 942, 849, 810, 775, 729 cm^{-1} ;

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1,22 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H, CH_2CH_3); 2,28 (d, $J = 0,4$ Hz, 3H, CH_3); 2,42 (s, 3H, CH_3); 2,56 (s, 3H, CH_3); 2,58 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$); 2,94 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$); 4,10 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H, CH_2CH_3); 4,98 (s, 2H, OCH_2CO); 6,26 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, Ar-H); 6,73 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H, Ar-H); 6,91 (dd, $J_1 = 8,9$ Hz, $J_2 = 2,6$ Hz, 1H, Ar-H); 7,52 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H, Ar-H);

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 13,15; 14,14; 14,39; 14,92; 23,08; 32,54; 60,44; 71,41; 101,36; 104,17; 112,44; 114,60; 118,36; 121,74; 125,87; 147,29; 150,83; 153,51; 159,01; 160,09; 161,49; 172,77; 189,45;

HRMS (ESI) m/z izračunan za $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 413,1600; izmerjen 413,1610.

4.4 Sinteza derivatov 3-(5-metil-7-okso-7H-furo[3,2-g]kromen-6-il)propanojske kisline



	Produkt reakcije	Izkoristek, izgled, T_{tal}
5a		33% (552 mg), svetlo rumena trdna spojina, $T_{\text{tal}} = 162,0\text{--}164,5\text{ }^{\circ}\text{C}$;
5b		13% (96 mg), siva trdna spojina, $T_{\text{tal}} = 185,5\text{--}187,0\text{ }^{\circ}\text{C}$
5c		4% (45 mg), svetlo rjava trdna spojina, $T_{\text{tal}} = 186,5\text{--}189,0\text{ }^{\circ}\text{C}$

Slika 11. Sinteza shema derivatov **5a-c** in tabela osnovnih podatkov dobljenih produktov

Spojino **4a** (1 ekv; 1,9 g; 4,4 mmol) smo raztopili v 2-propanolu (30 mL) in dodali 1M NaOH (6 ekv; 26 mL; 0,07 mol). Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč na oljni kopeli pri 85 °C. Nato smo zmes nakisali s koncentriranim HCl do pH ~ 1 in uparili približno polovico topila, dokler se ni v bučki pojavilo olje. Izvedli smo ekstrakcijo z EtOAc (3 × 50 mL) in nato organske faze sprali z nasičenim NaCl (50 mL) ter jih sušili z Na₂SO₄. Po filtraciji smo matičnici uparili topilo pod znižanim tlakom in dobljeno trdno

zmes očistili s silikagelno kolono (MF: CH₂Cl₂/MeOH = 20/1 + 0,3% očetna kislina). Zbrane frakcije smo prekrystalizirali iz EtOAc. Enak sintezni postopek smo uporabili za sintezo **5b-c**.

3-(3-(2,5-Dimetiltiofen-3-il)-5-metil-7-okso-7H-furo[3,2-g]kromen-6-il)propanojska kislina (5a)

TLC: R_f = 0,34; MF: CH₂Cl₂/MeOH = 20/1 + 0.3% očetna kislina, orositveni reagent: bromkrezolno zeleno;

IR (ATR) ν = 2986, 2894, 1724, 1704, 1689, 1612, 1562, 1509, 1477, 1427, 1376, 1340, 1299, 1255, 1230, 1208, 1166, 1134, 1086, 1034, 985, 921, 880, 837, 796, 768, 726 cm⁻¹;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2,42 (s, 3H, CH₃); 2,44 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H, CH₂CH₂COOH); 2,47 (s, 3H, CH₃); 2,53 (s, 3H, CH₃); 2,84 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H, CH₂CH₂COOH); 7,05 (d, *J* = 0,8 Hz, 1H, Ar-H); 7,75 (s, 1H, Ar-H); 7,87 (s, 1H, Ar-H); 8,22 (s, 1H, Ar-H); 12,28 (br s, 1H, COOH);

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,92; 14,83; 15,09; 22,94; 32,28; 99,18; 116,08; 116,36; 116,71; 122,29; 123,81; 126,25; 126,40; 133,08; 136,00; 144,57; 147,73; 149,73; 155,02; 160,44; 173,59;

HRMS (ESI) m/z izračunan za C₂₁H₁₉O₅S [M+H]⁺ 383,0953; izmerjen 383,0951;

Čistost spojine določena s HPLC: 95,99%.

3-(3-(Furan-2-il)-5-metil-7-okso-7H-furo[3,2-g]kromen-6-il)propanojska kislina (5b)

TLC: R_f = 0,33; MF: CH₂Cl₂/MeOH = 20/1 + 0.3% očetna kislina, orositveni reagent: bromkrezolno zeleno;

IR (ATR) ν = 3147, 1733, 1655, 1622, 1571, 1456, 1421, 1386, 1342, 1315, 1202, 1169, 1154, 1117, 1086, 1026, 927, 872, 854, 824, 786, 747 cm⁻¹;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2,43 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H, CH₂CH₂COOH); 2,57 (s, 3H, CH₃); 2,84 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H, CH₂CH₂COOH); 6,69 (dd, *J*₁ = 3,4 Hz, *J*₂ = 1,8 Hz, 1H, Ar-H); 7,14 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H, Ar-H); 7,73 (s, 1H, Ar-H); 7,83 (dd, *J*₁ = 1,8 Hz, *J*₂ = 0,6 Hz, 1H, Ar-H); 8,16 (s, 1H, Ar-H); 8,47 (s, 1H, Ar-H); 12,22 (s, 1H, COOH);

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 15,16; 22,99; 32,25; 99,41; 107,52; 111,72; 112,74; 116,66; 117,11; 120,94; 122,57; 142,66; 143,15; 145,24; 147,79; 149,99; 155,24; 160,38; 173,62;

HRMS (ESI) m/z izračunan za C₁₉H₁₃O₆ [M-H]⁻ 337,0712; izmerjen 337,0720;

Čistost spojine določena s HPLC: 95,68%.

**3-(3-(2,5-dimetilfuran-3-il)-5-metil-7-okso-7H-furo[3,2-g]kromen-6-il)propanojska
kislina (5c)**

TLC: R_f = 0,33; MF: CH₂Cl₂/MeOH = 20/1 + 0.3% očetna kislina, orositveni reagent:
bromkrezolno zeleno;

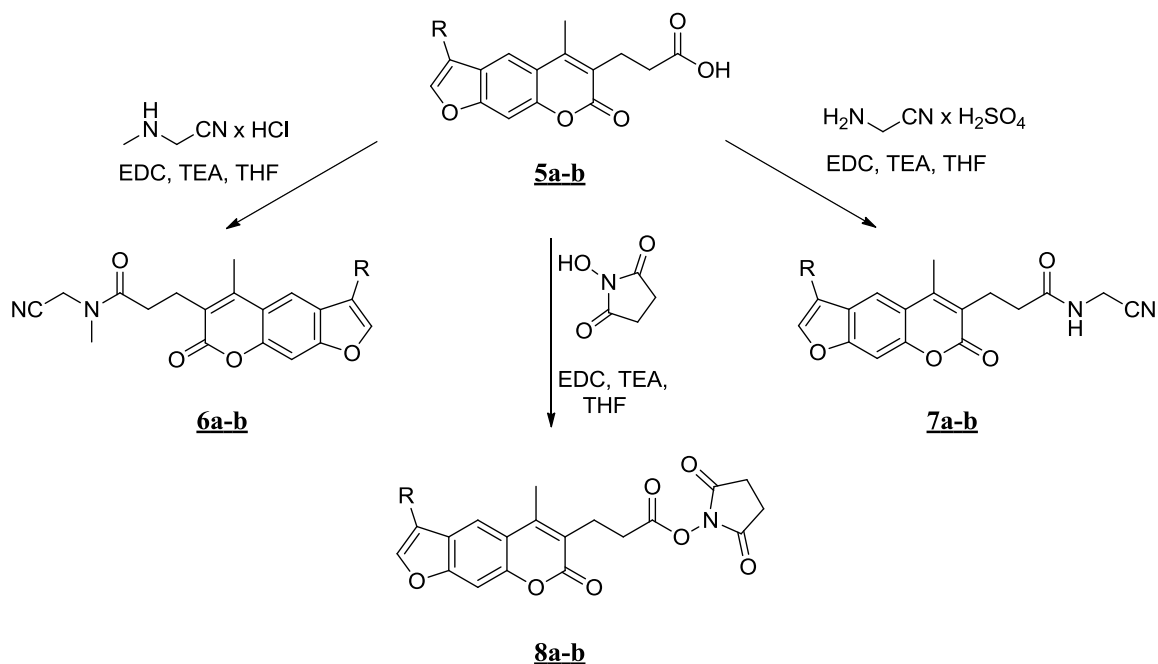
IR (ATR) ν = 2989, 1687, 1630, 1579, 1429, 1394, 1338, 1291, 1234, 1209, 1158, 1129,
1084, 1041, 964, 909, 854, 809, 774, 720 cm⁻¹;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2,32 (s, 3H, CH₃); 2,36 (s, 3H, CH₃); 2,43 (t, *J* = 8,0 Hz,
2H, CH₂CH₂COOH); 2,55 (s, 3H, CH₃); 2,85 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H, CH₂CH₂COOH); 6,53 (d,
J = 0,8 Hz, 1H, Ar-H); 7,74 (s, 1H, Ar-H); 7,93 (s, 1H, Ar-H); 8,18 (s, 1H, Ar-H); 12,22
(br s, 1H, COOH);

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,57; 13,19; 15,12; 22,95; 32,29; 99,21; 107,01;
110,13; 113,79; 116,33; 116,69; 122,30; 123,86; 143,51; 146,56; 147,84; 149,77; 150,04;
155,19; 160,49; 173,59;

HRMS (ESI) *m/z* izračunan za C₂₁H₁₇O₆ [M+H]⁺ 365,1025; izmerjen 365,1018;

Čistost spojine določena s HPLC: 97,78%.

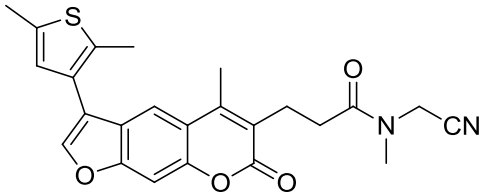
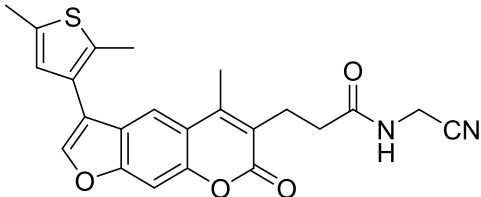
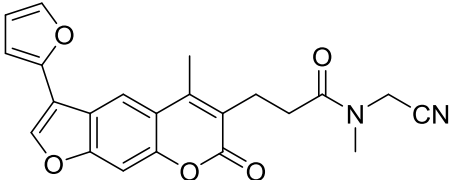
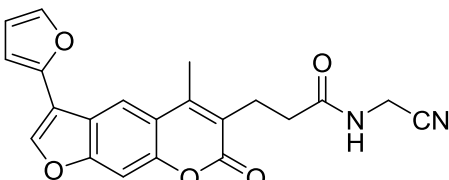


Slika 12. Reakcijska shema tvorbe derivatov z elektrofilnimi bojnimi glavami

4.5 Splošni sintezni postopek za pripravo cianometil amidov

V bučko smo natehtali izhodno spojino **5a** (1,00 ekv; 0,8 g; 2,0 mmol) in aminoacetonitril oziroma *N*-metilaminoacetonitril (1,25 ekv; 0,3 g; 2,5 mmol) ter ju prek septe prepihali z argonom. Dodali smo brezvodni THF (30 mL) in zmes ohladili na 0 °C s pomočjo ledene kopeli. V bučko smo nato dodali EDC (1,25 ekv; 0,5 g; 2,5 mmol) in čez 5 minut še TEA (2,5 ekv; 0,5 g; 5,0 mmol) ter pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Reakcijski zmesi smo uparili topilo, trdni zaostanek pa smo prenesli v lij ločnik z EtOAc (100 mL). Organsko fazo smo spirali z 1 M HCl (2 × 50 mL), nato z vodo (1 × 50 mL) in na koncu še z nasičeno raztopino NaHCO₃ (1 × 50 mL). Izvedli smo še spiranje z nasičeno raztopino NaCl (1 × 40 mL) in organsko fazo sušili z Na₂SO₄. Topilo smo odparili in surov produkt očistili s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc/n-heksan = 1/1) in po potrebi še s prekrystalizacijo iz EtOAc. Po enakem sinteznem postopku smo sintetizirali spojine **6b** in **7a-b**.

Tabela II. Prikaz derivatov cianometil amidov, izkoristek reakcije, izgled in temperatura tališča

	Produkt reakcije	Izkoristek, izgled, T_{tal}
<u>6a</u>		8% (13 mg), rumeni kristali, $T_{\text{tal}} = 119,0\text{--}121,0\text{ }^{\circ}\text{C}$
<u>7a</u>		14% (24 mg), rumena trdna spojina, $T_{\text{tal}} = 189,5\text{--}191,5\text{ }^{\circ}\text{C}$
<u>6b</u>		39% (14 mg), rumeni kristali, $T_{\text{tal}} = 223,5\text{--}225,5\text{ }^{\circ}\text{C}$
<u>7b</u>		22% (48 mg), rumeni kristali, $T_{\text{tal}} = 261,5\text{--}264,0\text{ }^{\circ}\text{C}$

***N*-(cianometil)-3-(3-(2,5-dimetiltiofen-3-il)-5-metil-7-okso-7*H*-furo[3,2-*g*]kromen-6-il)-*N*-metilpropanamid (**6a**)**

Pri sintezi te spojine nismo uporabili ledene kopeli, celotna reakcija je potekala pri sobni temperaturi.

TLC: $R_f = 0,20$; MF: EtOAc/n-heksan = 1/1; orositveni reagent: ninhidrin;

IR (ATR) $\nu = 2920, 2851, 1702, 1621, 1577, 1444, 1391, 1335, 1260, 1231, 1199, 1138, 1090, 1032, 843, 813, 775 \text{ cm}^{-1}$;

^1H NMR (400 MHz, aceton- d_6) δ 2,47 (s, 3H, CH_3); 2,48–2,49 (m, 3H, CH_3); 2,59 (s, 3H, CH_3); 2,70 (t, $J = 7,8 \text{ Hz}$, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 2,94–2,98 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 3,18 (s, 3H, CH_3); 4,42 (s, 2H, CH_2CN); 7,01 (d, $J = 1,2 \text{ Hz}$, 1H, Ar-H); 7,55 (s, 1H, Ar-H); 7,96 (s, 1H, Ar-H); 8,02 (s, 1H, Ar-H);

^{13}C NMR (100 MHz, aceton- d_6) δ 15,23; 16,09; 16,52; 25,11; 33,02; 36,56; 36,80; 100,91; 117,98; 118,51; 118,80; 119,18; 125,11; 126,29; 128,48; 128,58; 135,51; 138,35; 146,02; 149,35; 152,46; 157,59; 162,58; 173,90;

HRMS (ESI) m/z izračunan za $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 435,1379; izmerjen 435,1371;

Čistost spojine določena s HPLC: 95,03%.

***N*-(cianometil)-3-(3-(2,5-dimetiltiofen-3-il)-5-metil-7-okso-7*H*-furo[3,2-*g*]kromen-6-il)propanamid (**7a**)**

TLC: $R_f = 0,26$; MF: EtOAc/n-heksan = 1/1; orositveni reagent: ninhidrin;

IR (ATR) $\nu = 3306, 2915, 1678, 1627, 1578, 1524, 1441, 1394, 1336, 1311, 1270, 1225, 1175, 1138, 1077, 1033, 891, 834, 816, 780, 756, 686 \text{ cm}^{-1}$;

^1H NMR (400 MHz, aceton- d_6) δ 2,46 (s, 3H, CH_3); 2,48 (dd, $J_1 = 1,2 \text{ Hz}$, $J_2 = 0,6 \text{ Hz}$, 3H, CH_3); 2,52 (t, $J = 7,6 \text{ Hz}$, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 2,58 (s, 3H, CH_3); 2,98 (t, $J = 7,6 \text{ Hz}$, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 4,19 (d, $J = 5,6 \text{ Hz}$, 2H, CH_2CN); 7,01 (d, $J = 0,8 \text{ Hz}$, 1H, Ar-H); 7,55 (s, 1H, Ar-H); 7,83 (br s, 1H, NH); 7,96 (s, 1H, Ar-H); 8,02 (s, 1H, Ar-H);

^{13}C NMR (100 MHz, aceton- d_6) δ 15,22; 16,09; 16,60; 25,51; 28,76; 35,59; 100,88; 118,62; 118,79; 118,81; 119,17; 124,92; 126,28; 128,49; 128,58; 135,53; 138,36; 146,02; 149,50; 152,47; 157,60; 162,49; 173,73;

HRMS (ESI) m/z izračunan za $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 421,1222; izmerjen 421,1230;

Čistost spojine določena s HPLC: 92,57%.

***N*-(cianometil)-3-(3-(furan-2-il)-5-metil-7-okso-7*H*-furo[3,2-*g*]kromen-6-il)-*N*-metilpropanamid (**6b**)**

Spojina je bila očiščena s kolonsko kromatografijo in s prekrizalizacijo iz EtOAc.

TLC: R_f = 0,22; MF: EtOAc/n-heksan = 1/1; orositveni reagent: ninhidrin;

IR (ATR) ν = 3131, 2990, 1693, 1650, 1581, 1459, 1396, 1334, 1273, 1202, 1149, 1114, 1079, 1029, 997, 945, 872, 849, 792, 731 cm⁻¹;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2,60–2,62 (m, 5H, CH₃ + CH₂CH₂CO); 2,85 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H, CH₂CH₂CO); 3,05 (s, 3H, CH₃); 4,40 (s, 2H, CH₂CN); 6,70 (dd, *J*₁ = 3,4 Hz, *J*₂ = 1,8 Hz, 1H, Ar-H); 7,18 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H, Ar-H); 7,81 (s, 1H, Ar-H); 7,85 (d, *J* = 1,2 Hz, 1H, Ar-H); 8,24 (s, 1H, Ar-H); 8,52 (s, 1H, Ar-H);

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 15,20; 22,85; 30,85; 35,16; 35,31; 99,46; 107,56; 111,72; 112,76; 116,69; 116,82; 117,19; 120,97; 122,81; 142,68; 143,20; 145,22; 147,82; 150,02; 155,26; 160,49; 172,05;

HRMS (ESI) *m/z* izračunan za C₂₂H₁₉N₂O₅ [M+H]⁺ 391,1294; izmerjen 391,1291;

Čistost spojine določena s HPLC: 96,04%.

***N*-(cianometil)-3-(3-(furan-2-il)-5-metil-7-okso-7*H*-furo[3,2-*g*]kromen-6-il)propanamid (**7b**)**

TLC: R_f = 0,22; MF: EtOAc/n-heksan = 1/1; orositveni reagent: ninhidrin;

IR (ATR) ν = 3283, 3110, 1671, 1627, 1578, 1529, 1465, 1394, 1340, 1303, 1270, 1250, 1219, 1155, 1113, 1085, 1020, 981, 918, 873, 845, 826, 781, 759, 703 cm⁻¹;

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2,39 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H, CH₂CH₂CO); 2,58 (s, 3H, CH₃); 2,86 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H, CH₂CH₂CO); 4,10 (d, *J* = 5,6 Hz, 2H, CH₂CN); 6,70 (dd, *J*₁ = 3,4 Hz, *J*₂ = 1,8 Hz, 1H, Ar-H); 7,15 (d, *J* = 3,2 Hz, 1H, Ar-H); 7,78 (d, *J* = 0,4 Hz, 1H, Ar-H); 7,85 (dd, *J*₁ = 1,8 Hz, *J*₂ = 0,6 Hz, 1H, Ar-H); 8,20 (s, 1H, Ar-H); 8,51 (s, 1H, Ar-H); 8,65 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H, NH);

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 15,21; 23,42; 26,92; 33,33; 99,45; 107,55; 111,74; 112,76; 116,76; 117,19; 117,62; 120,96; 122,69; 142,71; 143,22; 145,24; 147,84; 150,04; 155,27; 160,42; 171,48;

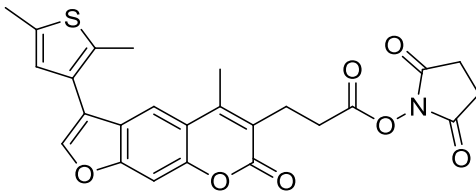
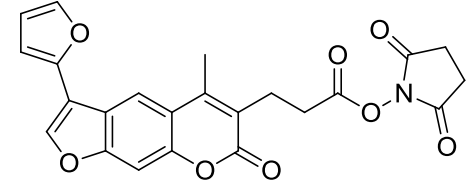
HRMS (ESI) *m/z* izračunan za C₂₁H₁₅N₂O₅ [M-H]⁻ 375,0981; izmerjen 375,0976;

Čistost spojine določena s HPLC: 88,06%.

4.6 Sinteza derivatov 2,5-dioksopirolidin-1-il 3-(5-metil-7-okso-7H-furo[3,2-g]kromen-6-il)propanoata

Spojino **5a** (1 ekv; 0,4 g; 1,0 mmol) smo natehtali v bučko in jo prepihali z argonom. Dodali smo *N*-hidroksisukcinimid (1,25 ekv; 0,1 g; 1,25 mmol) in zmes raztopili v brezvodnem THF (10 mL). Bučko smo postavili na led, da se je ohladila na 0 °C in dodali EDC (1,25 ekv; 0,2 g; 1,25 mmol) ter čez 5 minut še TEA (1,25 ekv; 0,1 g; 1,25 mmol). Reakcijsko zmes smo pri sobni temperaturi mešali 24 ur. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom in zaostanek prenesli v lij ločnik z EtOAc (50 mL). Organsko fazo smo ekstrahirali z 10% (m/V) citrsko kislino (3 × 30 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (40 mL). Nato smo jo sušili nad Na₂SO₄, prefiltrirali in z rotavaporjem uparili topilo. Sledilo je čiščenje s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc/n-heksan = 1/1) in prekrizalizacija iz EtOAc. Enak sintezni postopek smo uporabili za sintezo derivata **8b**.

Tabela III. Derivata 2,5-dioksopirolidin-1-il 3-(5-metil-7-okso-7H-furo[3,2-g]kromen-6-il)propanoata, izkoristek reakcije, izgled in temperatura tališča

	Produkt reakcije	Izkoristek, izgled, T _{tal}
8a		12% (52 mg), beli kristali, T _{tal} = 223,5–225,5 °C
8b		33% (68 mg), rumeni kristali, T _{tal} = 214,0–215,0 °C

2,5-Dioksopirolidin-1-il 3-(3-(2,5-dimetiltiofen-3-il)-5-metil-7-okso-7H-furo[3,2-g]kromen-6-il)propanoat (8a)

TLC: R_f = 0,31; MF: EtOAc/n-heksan = 1/1;

IR (ATR) ν = 2978, 1812, 1780, 1732, 1712, 1625, 1581, 1441, 1390, 1367, 1334, 1285, 1198, 1141, 1081, 1066, 903, 879, 851, 808, 784, 749 cm⁻¹;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2,43 (s, 3H, CH₃); 2,47 (s, 3H, CH₃); 2,55 (s, 3H, CH₃); 2,79 (br s, 4H, COCH₂CH₂CO); 2,91–3,01 (m, 4H, CH₂CH₂COO); 7,06 (d, *J* = 1,2 Hz, 1H, Ar-H); 7,78 (s, 1H, Ar-H); 7,89 (s, 1H, Ar-H); 8,24 (s, 1H, Ar-H);

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,93; 14,84; 15,31; 22,57; 25,35; 28,69; 99,32; 116,11; 116,64; 166,72; 120,90; 123,91; 126,21; 126,43; 133,13; 136,04; 144,69; 148,83; 149,84; 155,15; 160,42; 168,19; 170,09;

HRMS (ESI) *m/z* izračunan za C₂₅H₂₂NO₇S [M+H]⁺ 480,1117; izmerjen 480,1110;

Elementna analiza: izračunano za C₂₅H₂₁NO₇S: C 62,62; H 4,41; N 2,92; izmerjeno C 62,27; H 4,71; N 2,98.

2,5-Dioksopirolidin-1-il 3-(3-(furan-2-il)-5-metil-7-okso-7H-furo[3,2-g]kromen-6-il)propanoat (8b)

TLC: R_f = 0,20; MF: EtOAc/n-heksan = 1/1;

IR (ATR) ν = 2999, 1806, 1776, 1735, 1712, 1629, 1581, 1468, 1430, 1393, 1354, 1339, 1293, 1259, 1200, 1150, 1114, 1063, 1021, 990, 947, 854, 791, 756, 699 cm⁻¹;

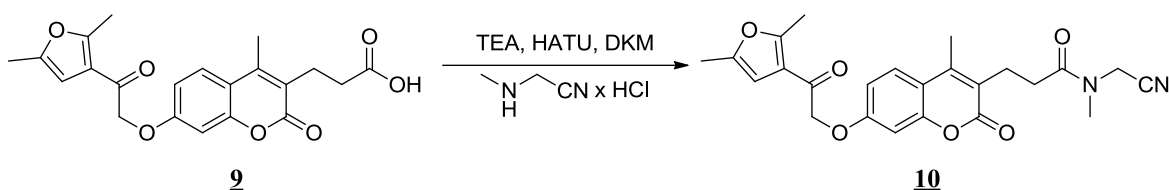
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2,62 (s, 3H, CH₃); 2,79 (br s, 4H, COCH₂CH₂CO); 2,94–3,01 (m, 4H, CH₂CH₂COO); 6,70 (q, *J*₁ = 3,4 Hz, *J*₂ = 1,9 Hz, 1H, Ar-H); 7,18 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H, Ar-H); 7,80 (s, 1H, Ar-H); 7,85 (d, *J* = 1,2 Hz, 1H, Ar-H); 8,24 (s, 1H, Ar-H); 8,52 (s, 1H, Ar-H);

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 15,37; 22,61; 25,36; 28,66; 99,53; 107,61; 111,74; 112,77; 116,93; 117,12; 121,04; 121,17; 142,71; 143,28; 145,20; 148,86; 150,10; 155,38; 160,35; 168,21; 170,11;

HRMS (ESI) *m/z* izračunan za C₂₃H₁₈NO₈ [M+H]⁺ 436,1032; izmerjen 436,1021;

Elementna analiza: izračunano za C₂₃H₁₇NO₈: C 63,45; H 3,94; N 3,22; izmerjeno C 63,20; H 3,54; N 3,26.

4.7 Sinteza *N*-(cianometil)-3-(7-(2-(2,5-dimetilfuran-3-il)-2-oksoetoksi)-4-metil-2-okso-2*H*-kromen-3-il)-*N*-metilpropanamida



Spojino **2** (1,00 ekv; 44 mg, 0,12 mmol) smo suspendirali v DKM (5 mL), ohladili na ledu na 0 °C in dodali TEA (3,00 ekv; 55 μ L; 0,36 mmol), da se je kislina raztopila. Po 5 minutah smo dodali HATU (1,20 ekv; 53 mg, 0,12 mmol) in po 15 minutah še *N*-metilaminoacetonitril (1,50 ekv; 20 mg, 0,19 mmol) raztopljen v DKM. Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Nato smo zmesi dodali DKM (20 mL) in organsko fazo spirali z 1 M HCl (2 \times 20 mL), nasičeno raztopino NaCl (1 \times 20 mL) ter sušili z Na₂SO₄. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom in produkt očistili s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc/n-heksan = 2/1).

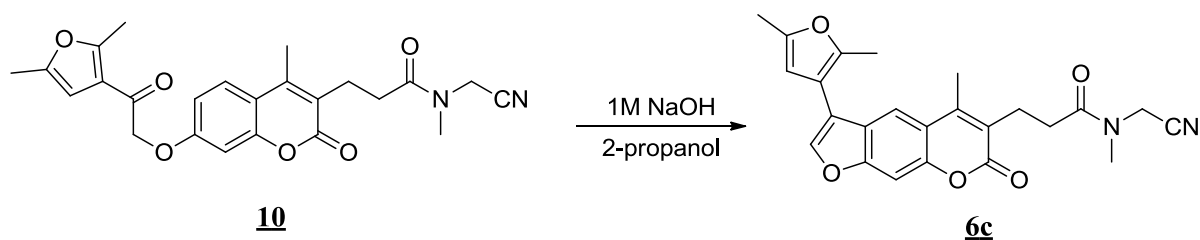
Izkoristek reakcije: 29% (15 mg); Izgled: rumeni kristali;

TLC: R_f = 0,20; MF: EtOAc/n-heksan = 2/1; orositveni reagent: ninhidrin;

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,65 (s, 2H, CH₂CN); 2,31 (d, *J* = 0,4 Hz, 3H, CH₃); 2,49 (s, 3H, CH₃); 2,60 (s, 3H, CH₃); 2,68 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H, CH₂CH₂CO); 2,98 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H, CH₂CH₂CO); 3,17 (t, *J* = 10,8 Hz, 3H, CH₃N); 5,02 (s, 2H, OCH₂CO); 6,29 (d, *J* = 0,8 Hz, 1H, Ar-H); 6,77 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H, Ar-H); 6,95 (dd, *J*₁ = 11,2 Hz, *J*₂ = 2,4 Hz, 1H, Ar-H); 7,58 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H, Ar-H);

HRMS (ESI) *m/z* izračunan za C₂₄H₂₅N₂O₆ [M+H]⁺ 437,1713; izmerjen 437,1715;

Čistost spojine določena s HPLC: 95,80%.

4.7.1 Poskus sinteze *N*-(cianometil)-3-(3-(2,5-dimetilfuran-3-il)-5-metil-7-okso-7*H*-furo[3,2-*g*]kromen-6-il)-*N*-metilpropanamida

Izhodni spojini **10** (1 ekv; 10 mg; 0,02 mmol) smo dodali 1 M NaOH (3,5 ekv; 2,80 mL; 0,07 mmol), destilirano vodo in 2-propanol (30 mL). Reakcijsko zmes smo pustili mešati dva dneva pri 85 °C. Naredili smo TLC reakcijske zmesi v MF: EtOAc/*n*-heksan = 1/1, vendar nobena izmed lis ni potovala, vse so ostale na startu.

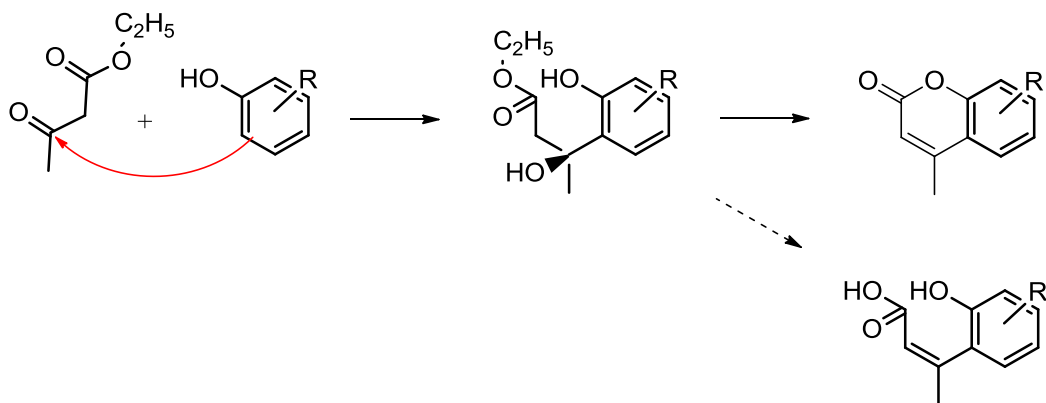
5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 SINTEZA DERIVATOV PSORALENA

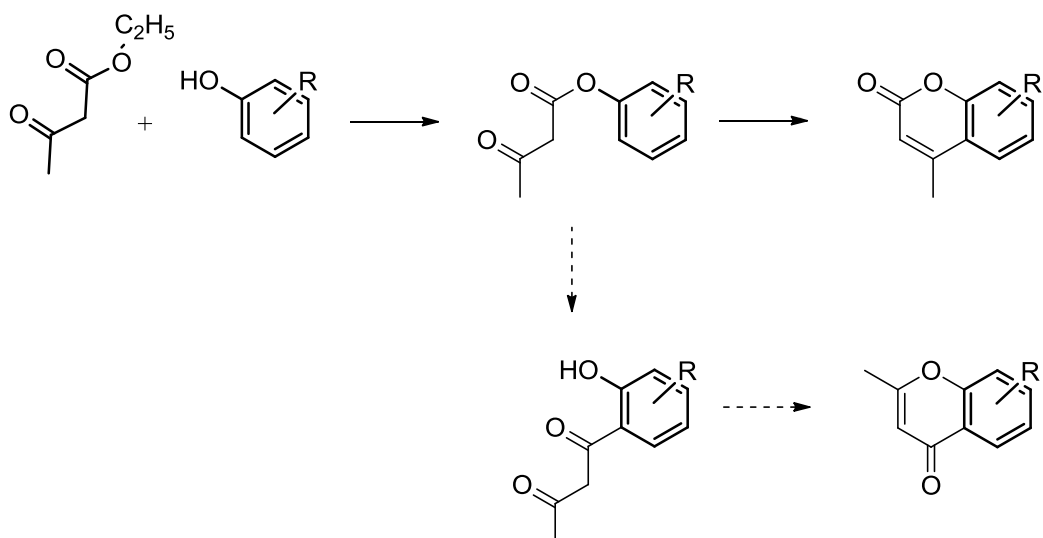
5.1.1 Sinteza 7-hidroksikumarinskega derivata

Najpogostejša sintezna pot za pripravo kumarinskih derivatov je kondenzacija po Hansu von Pechmannu. Pri Pechmannovi kondenzaciji med β -keto estrom ali β -keto karboksilno kislino in aktiviranim fenolom nastane kumarin ter stranska produkta voda in alkohol. Kljub pomembnosti kumarinov in razširjenosti njihove uporabe, točen mehanizem reakcije še ni pojasnjen. Mehanizem po Robertsonu (Slika 13) predpostavlja, da tekom reakcije pride do elektrofilnega napada β -keto skupine na aromatski obroč, sledi ji eliminacija vode in transesterifikacija (preestrenje). Ahmed in Desai pa predlagata, da najprej poteče esterifikacija, kateri sledi elektrofilni napad, eliminacija vode in zapiranje obroča (Slika 14) [34].

Reakcija poteka v prisotnosti močne kisline, ki je katalizator transesterifikacije in keto-enol tautomerije. Uporabili smo 75% H_2SO_4 , ki smo jo pripravili z redčenjem 96% H_2SO_4 . Reakcija Pechmannove kondenzacije običajno poteka pri povišani temperaturi, vendar segrevanje v našem primeru ni bilo potrebno. Resorcinol ima namreč dve elektron donorski fenolni skupini (-OH), od katerih se ena glede na drugo nahaja na *meta* mestu in zlahka vstopa v reakcijo Pechmannove kondenzacije. Kisli pogoji lahko tekom reakcije hidrolizirajo estersko vez produkta, zato smo reakcijsko zmes sprva ohladili na 0 °C. Iz predhodnih poskusov smo vedeli, da je kot stranski produkt s hidrolizo etilnega estra nastajala 3-(7-hidroksi-4-metil-2-okso-2*H*-kromen-3-il)propanojska kislina. Zato smo z velikim prebitkom EtOH izvedli še kislinsko katalizirano esterifikacijo in s tem pomaknili ravnotežje reakcije v smer nastanka estra. EtOH smo enostavno odstranili z odparevanjem pod znižanim tlakom in dobljeno oborino raztopili v nasičenem $NaHCO_3$ za nevtralizacijo H_2SO_4 . Po ekstrakciji iz EtOAc smo dobili čist produkt **1** ob hkratnem dobrem izkoristku reakcije ($\eta = 92\%$).



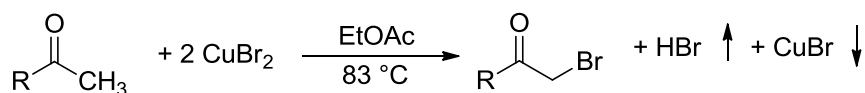
Slika 13. Mehanizem poteka Pechmannove reakcije po Robertsonu. Prikazan je tudi mehanizem nastanka možnega stranskega produkta



Slika 14. Potek Pechmannove reakcije po predlogu Ahmeda in Desaia. Prikazan je tudi mehanizem nastanka možnega stranskega produkta

5.1.2 Selektivno monobromiranje izhodnih reagentov

Za sintezo psoralenskega obroča je bilo potrebno v prvi stopnji pripraviti α -bromoketone, ki so vstopali v reakcijo z derivatom 7-hidroksikumarina. Kupljene reagente **2a-c** smo zatorej podvrgli procesu bromiranja. Zaradi predhodnih težav z bromiranjem aktiviranih metilenskih skupin in dibromiranjem izhodnih reagentov po klasičnem postopku z elementarnim bromom, smo se odločili za enostavno reakcijo bromiranja s suspenzijo bakrovega (II) bromida v EtOAc. Potekla je selektivna radikalna substitucija broma na α -mestu ketona in nastali so ustrezni α -bromoketoni.



Slika 15. Selektivno bromiranje ketonov z bakrovim (II) bromidom

Reakcijo smo izvedli z enim ekvivalentom spojine **2a-c** in dvema ekvivalentoma CuBr_2 (Slika 15). Izhodno spojino ter reagent smo suspendirali v EtOAc in zmes segrevali pod refluxom. Potek reakcije smo spremljali s tankoplastno kromatografijo in oroševanjem z bromkrezolno zelenim. Bromkrezolno zeleno je kislinsko-bazni indikator, ki je produkt obarval rumeno, saj ima aktivirana metilenska skupina produkta šibko kisle protone, ki povzročijo spremembo barve iz modre v rumeno. Prvi TLC smo razvili po devetdesetih minutah mešanja, drugega pa po štiriindvajsetih urah in pri obeh ugotovili, da pretvorba ni bila popolna (prisotna je bila izhodna spojina). Sodeč po intenzivnosti obarvanja lise izhodnega produkta pod UV lučko smo sklepali, da je bil v reakcijski zmesi prisoten še precejšen delež izhodne spojine. V zmes smo zato dodali dodatnega pol ekvivalenta CuBr_2 in pustili mešati nadaljnja dva dneva. Izhodni reagent kljub temu ni zreagirala popolnoma, zato smo prekinili reakcijo ter izolirati produkt. Tekom reakcije je potekla pretvorba črnega CuBr_2 v beli CuBr , ki je netopen in smo ga zlahka odstranili s filtracijo. Drugi stranski produkt je bil HBr, ki je zaradi vretja sproti hlapel iz reakcijskega sistema. Surovemu produktu smo nato uparili topilo pod znižanim tlakom. Spojini **3b** in **3c** sta v obliki belih kristalov, medtem ko je spojina **3a** temno sivo olje. Vse bromirane produkte smo zaradi njihove nestabilnosti shranjevali v hladilniku zaščitene pred svetlobo.

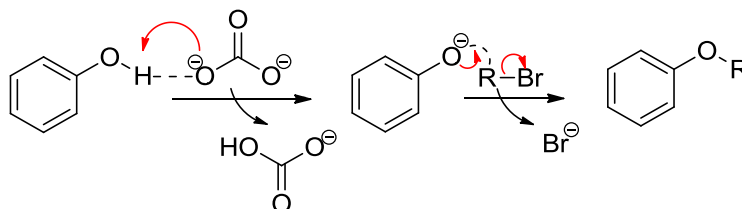
Iz posnetih ^1H NMR spektrov smo določili, kolikšen delež izhodne spojine je prisoten v surovem produktu. Najslabša pretvorba je bila pri sintezi spojine **3a**, kjer je poleg produkta ostalo še 45% nezreagirane izhodne spojine. Slednje nismo odstranili iz zmesi pri nobenem izmed derivatov, saj v nadaljnjih korakih izhodna spojina ne reagira. Pri produktih **3b** in **3c** je bil izkoristek boljši, prisotne je ostalo okoli 30% izhodne spojine. Z analizo NMR spektra smo potrdili tudi izboljšano selektivnost bromiranja naših izhodnih spojin v primerjavi z elementarnim bromom, saj je bil dibromiran stranski produkt prisoten le v manjši meri.

Prednosti izbranega postopka bromiranja so enostavna izvedba, selektivnost in mili pogoji za izvedbo reakcije. Slabši od pričakovanih so izkoristki, saj izhodni reagenti niso zreagirali do konca, kljub prebitku reagenta in podaljšanem času reakcije.

5.1.3 Sinteza derivatov 3-(kumarin-7-il)propanoata

Z bromiranimi reagenti **3a–c** smo *O*-alkilirali predhodno sintetiziran kumarinski derivat **1** do 3-(kumarin-7-il)propanoatov, ki smo jih v naslednjem koraku zaciklali do psoralenov. Potekla je reakcija nukleofilne substitucije med nukleofilno OH skupino kumarinskega skeleta na mestu 7 in elektrofilnim ogljikovim atomom α -bromiranega ketona.

Reakcija je potekala v inertnem okolju, kar smo zagotovili s preprihavanjem bučke z argonom. Izhodna reagenta **1** in **3a–c** smo raztopili v polarnem topilu THF. V reakcijsko zmes smo v prebitku dodali K_2CO_3 , ki je šibka baza s katero lahko selektivno deprotoniramo organske kisline. V našem primeru je to hidroksi skupina, vezana na aromatski obroč (fenol), kar ji daje rahlo kisel značaj. K_2CO_3 odtegne proton in nastane fenoksidni anion, kar je prikazano na shemi. Za lažji potek reakcije med α -bromiranim ketonom in nukleofilnim fenoksidnim anionom, smo dodali katalitično količino kalijevega jodida KI (topen v polarnem topilu). Nukleofilni jodid zamenja brom in tvori intermediat, ki je bolj reaktiven kot alkilni bromid. Poteče napad aniona (**1**) na elektrofilno metilensko skupino (**3a–c**), pri čemer izstopi molekula HBr (oz. HI), in nastane derivat 3-(kumarin-7-il)propanoata.



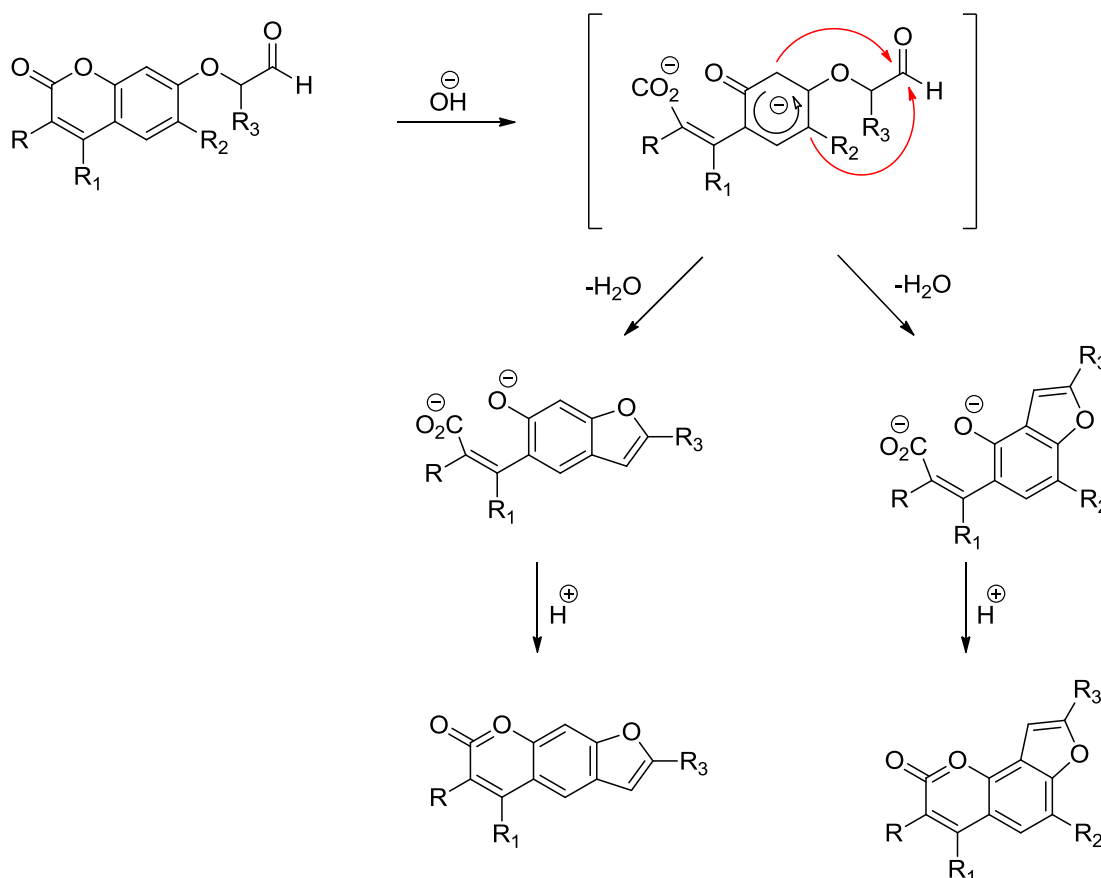
Slika 16. Mehanizem *O*-alkiliranja fenolov z alkil bromidi

Najslabši izkoristek smo imeli pri spojini **4a**, pri kateri je sodeč po narejenih TLC-jih nastalo več stranskih produktov, ki jih je bilo težavno odstraniti. Najprej smo poskušali očistiti spojino s prekrizalizacijo iz mešanice dietiletra in heksana in nato še iz etanola. Težave s čiščenjem in majhno maso produkta smo imeli tudi pri ostalih derivatih **4b** in **4c**. Reakcije smo ponovili večkrat in za čiščenje izvedli kolonsko kromatografijo s sledečo prekrizalizacijo izbranih frakcij. K nastanku večih različnih stranskih produktov so verjetno prispevali nečisti pripravljene reagenti **3a–c**.

5.1.4 Ciklizacija do psoralenskega skeleta

Naslednja stopnja sintezne poti do psoralenskega skeleta je bila ciklokondenzacijska reakcija 7-hidroksikumarinskih derivatov in tvorba furanskega obroča. Sočasno s ciklizacijo je pod danimi pogoji potekla tudi hidroliza estrske vezi v stranski verigi, nastale so kisline **5a–c**.

3-(Kumarin-7-il)propanoati se najenostavneje zaciklajo pod bazičnimi pogoji. Najboljši izkoristek reakcije dobimo, kadar aldehyd/keton vezan na fenolno skupino kumarina reagira v raztopini NaOH pod refluxom [35]. Predpostavljen mehanizem reakcije je prikazan na Sliki 17. Najprej pride do odprtja laktonskega obroča in nastanka dianionskega intermediata. To sproži nukleofilno adicijo s sledečo eliminacijo na karbonilnem ogljiku aldehida/ketona in tvorbo furanskega obroča. Nato z nakisanjem (koncentriran HCl) zapremo laktonski obroč, kar vodi v nastanek končnega skeleta. Po tem postopku se tvorijo večinoma linearni psoraleni, delež nelinearnih je nizek.



Slika 17. Mehanizem ciklizacije 7-hidroksikumarinskih derivatov

Največ težav s ciklizacijo smo imeli pri derivatu z dimetilfuranom **5c**, ki se je kljub večim ponovljenim poskusom zaciklal samo enkrat, izkoristek reakcije pa je bil le 4%. V večini poskusov je potekla samo hidroliza etilnega estra, nastal je necikliziran derivat **9**, ki smo ga kljub temu uporabili tudi v naslednji stopnji sinteze. Produkt **9** smo poskusili zaciklati, in sicer smo najprej ponovno zaestrili karboksilno skupino z EtOH in H₂SO₄ kot katalizatorjem. V naslednji stopnji smo poskušali izvesti ciklizacijo z 1 M NaOH v 2-propanolu.

Izkoristki pri sintezi ostalih psoralenskih derivatov so bili nekoliko boljši (**5a** : 33%, **5b**: 13%), vendar smo morali kljub temu reakcijo večkrat ponoviti, da smo dobili zadosti produkta za nadaljne sintezne stopnje. Produkta smo najprej želeli očistiti s prekristalizacijo, vendar so bili bodisi preveč topni v izbranih topilih ali pa se sploh niso raztapljali. Zato smo izvedli kolonsko kromatografijo z mobilno fazo CH₂Cl₂/MeOH = 20/1 + 0,3% očetne kisline in nato zbrane najbolj čiste frakcije prekristalizirali iz EtOAc.

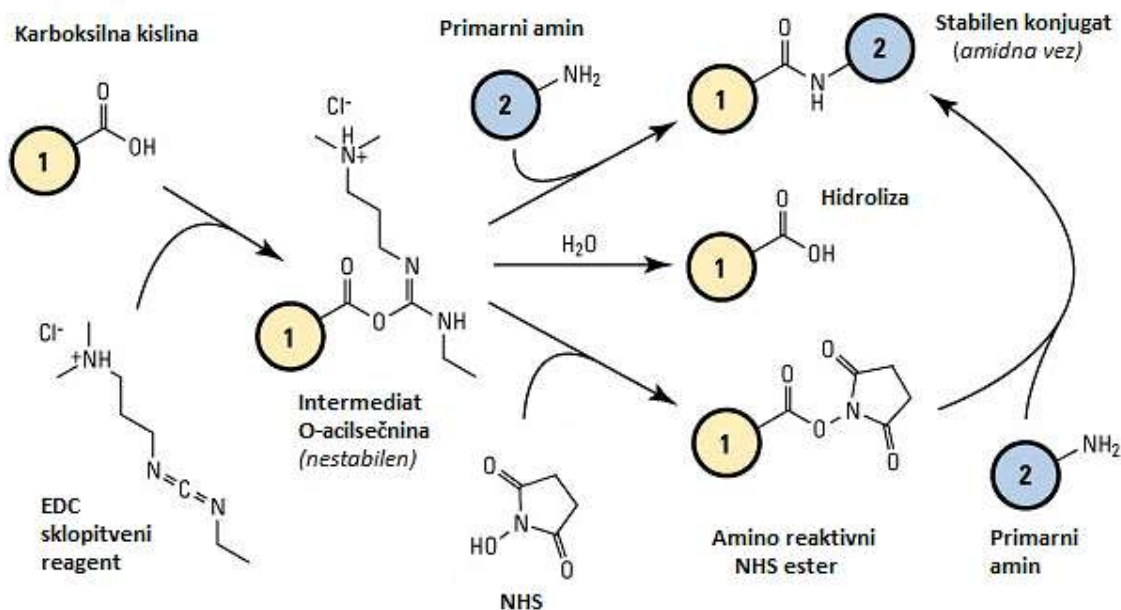
5.2 UVAJANJE ELEKTROFILNEGA CENTRA

Na karboksilno skupino spojin **5a–b** smo vezali aminoacetonitril, *N*-metilaminoacetonitril oziroma *N*-hidroksisukcinimid, s čimer smo v spojino uvedli elektrofilni center. Kot sklopitveni reagent smo uporabili 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid (EDC), s katerim smo tvorili aktivirane estre in *N*-cianometilamide.

EDC aktivira karboksilno skupino z nastankom aktivirane *O*-acilsečnine. Na tem intermediatu poteče nukleofilni napad amino skupine in tvori se amidna vez s karboksilno skupino vstopnega reagenta. Kot stranski produkt nastane derivat sečnine, ki je topen v vodi in se ga enostavno odstrani z ekstrakcijo v kislo vodno fazo. Sam intermedat *O*-acilsečnina pa je nestabilen v prisotnosti vode, poteče hidroliza in deaktivacija karboksilne skupine (Slika 18) [36]. V reakcijskem sistemu smo zato zagotovili brezvodne pogoje. Inertno okolje smo ustvarili s preprihavanjem bučke z argonom, kot topilo pa smo uporabili sveže predestiliran THF. EDC je kot reagent v obliki soli s HCl in je kot tak v organskih topilih slabo topen, zato smo v reakcijsko zmes dodali bazo TEA, s čimer smo ga pretvorili v prosto obliko in mu tako povečali topnost. Poleg tega smo z bazo pretvorili aminoacetonitrila, ki sta bila v obliki soli, v prosto obliko, ki je kot nukleofil napadla

aktivirano karboksilno kislino. Prebitno TEA smo po nakisanju s HCl enostavno poekstrahirali v vodno fazo.

N-hidroksisukcinimid (NHS) se pogosto uporablja v kombinaciji z EDC, saj izboljša njegovo učinkovitost pri tvorbi amidne vezi. EDC veže NHS na karboksilate in tvori ester, ki je načeloma bolj stabilen v prisotnost vode kot *O*-acilsečninski intermediat. Reakcije smo ustavili na stopnji *O*-acilsečninskega intermedjata, saj so bili to naši želeni produkti **8a–b**.



Slika 18. Mehanizem tvorbe amidne vezi s sklopitvenim reagentom EDC. Srednji del prikazuje hidrolizo intermedjata v prisotnosti vode, spodnji pa prikazuje reakcijo z NHS. Povzeto po [37].

Reakcije imajo slabe izkoristke, še posebej je bilo to očitno pri derivatu z 2,5-dimetiltiofenskim substituentom. Predvidevamo, da je lahko razlog za to slaba topnost spojine.

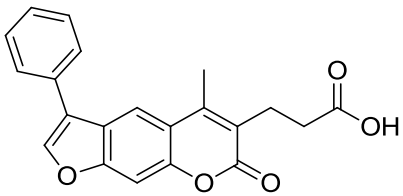
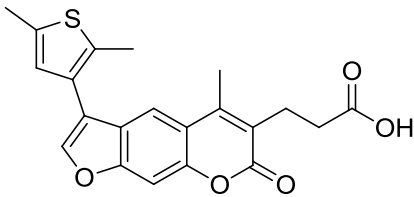
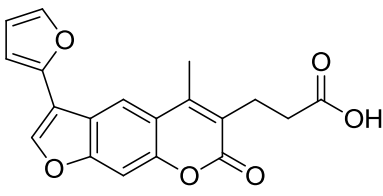
Zaradi težav s ciklizacijo in čiščenjem produkta **5c** smo za tvorbo aktiviranega estra z NHS in amidne vezi z *N*-metilaminoacetonitrilom uporabili kar delno očiščen produkt. Po čiščenju s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc/*n*-heksan = 1/1) smo dobili manj kot 10 mg nečistega produkta, kar je bilo premalo za nadaljnje čiščenje in nadaljnjo analizo produkta. Smo pa uspeli očistiti zadostno količino nezaciklanega stranskega produkta **9**, na katerega smo kot elektrofilen center uvedli *N*-metilaminoacetonitril in po čiščenju s kolonsko normalnofazno kromatografijo (MF: EtOAc/*n*-heksan = 2/1) dobili produkt **10**. Del slednjega smo poskusili ponovno zaciklati do spojine **6c** z 1 M NaOH v 2-propanolu.

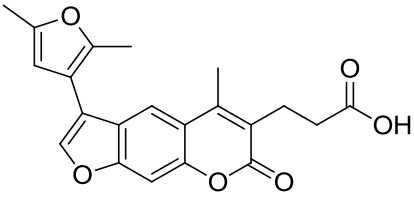
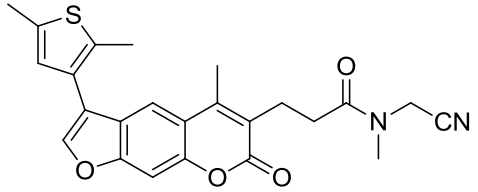
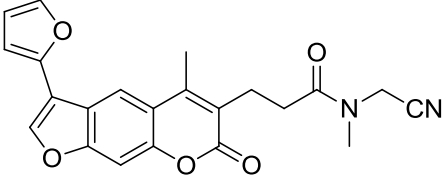
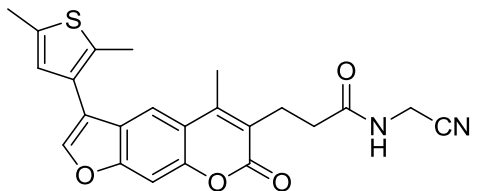
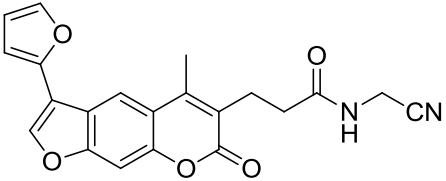
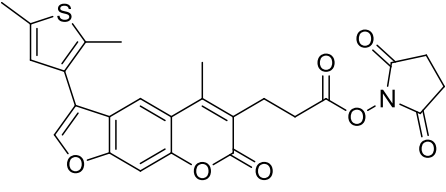
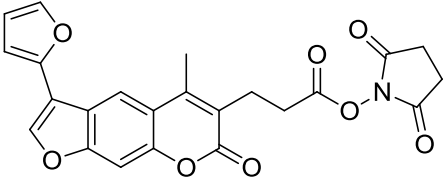
Ciklizacija ni bil uspešna, vse lise so ostale zbite na startu TLC-ja, iz česar smo sklepali, da je potekla hidroliza bodisi –CN skupine ali amidne vezi do kisline.

5.3 BIOKEMIJSKO VREDNOTENJE SPOJIN

Zaviralno delovanje naših spojin na imunoproteasomu smo preverili z merjenjem rezidualnih aktivnosti. Rezidualna aktivnost je razmerje med aktivnostjo encima v prisotnosti zaviralca in aktivnostjo encima brez dodanega zaviralca. Nižja kot je vrednost RA, boljše je zaviralno delovanje spojine. Spojinama **5a** in **5b** smo kot reverzibilnima zaviralcema pomerili še konstanto inhibicije, spojinama **8a** in **8b**, ki sta kot ireverzibilna zaviralca izkazovala najboljše zaviralno delovanje glede na RA, pa vrednost IC_{50} .

Tabela IV. Zaviralno delovanje (RA, K_i , IC_{50}) na $\beta 5i$ podenoto imunoproteasoma

	Struktura	RA
Spojina vodnica		26%, $K_i = 1,57 \mu M$
5a		69%, $K_i = 52,25 \mu M$
5b		65%, $K_i = 115,56 \mu M$

<u>5c</u>		115%
<u>6a</u>		107%
<u>6b</u>		86%
<u>7a</u>		119%
<u>7b</u>		97%
<u>8a</u>		16%, $IC_{50} = 1,22 \mu M$
<u>8b</u>		2%, $IC_{50} = 3,44 \mu M$

Če primerjamo spojine s karboksilno skupino (**5a–c**) s spojino vodnico, lahko glede na RA in K_i vidimo, da menjava benzenovega obroča s heteroarili na mestu 4' psoralenskega skeleta zmanjša reverzibilno zaviralno delovanje spojin. Spojina **5a** z 2,5-dimetiltiofenom in **5b** s furanom še izkazujeta zaviralno delovanje, medtem ko ga spojina **5c** z 2,5-dimetilfuranom izgubi. Uvedba *N*-metilaminoacetonitrilnega elektrofilnega centra ne kaže pozitivnih rezultatov, saj se zaviralna aktivnost popolnoma izgubi. Kot dobra ireverzibilna zaviralca imunoproteasoma pa sta se izkazali spojini s *N*-hidroksisukcinimidnim estrom kot elektrofilnim centrom. Vrednost RA je zelo nizka pri derivatu s furanom na mestu 4' psoralenskega skeleta (**8b**, 2%), nekoliko višja je pri derivatu z 2,5-dimetiltiofenom (**8a**, 16%). Zanju je bil določen tudi IC_{50} , ki je bolj zanesljiv pokazatelj zaviranja. Izkazalo se je, da ima derivat **8a** boljšo zaviralno aktivnost.

Na spremembo zaviralnih aktivnosti najbolj vpliva spreminjanje elektrofilnega centra. Najobetavnejši zaviralci kimotripsinu podobne podenote imunoproteasoma so glede na rezultate prikazane v Tabeli IV aktivirani sukcinimidi, ki delujejo kot ireverzibilni zaviralci. *N*-metilaminoacetonitrili kot elektrofilni niso učinkoviti. Spreminjanje spojine vodnice na mestu 4' psoralenskega skeleta z uvedbo heteroarilnih obročev namesto benzena, ni privedlo do povečanja zaviranja, kljub temu pa so te zamenjave zelo učinkovite, če je hkrati uveden tudi sukcinimidni ester.

6. SKLEP

Z namenom izboljšanja selektivnosti in zaviralne moči spojine vodnice do kimotripsinske β 5i podenote imunoproteasoma smo z manjšimi modifikacijami strukture uspešno sintetizirali 9 novih derivatov. Ohranili smo osnovni psoralenski skelet, spremembe pa smo uvajali na dveh straneh molekule. Najprej smo fenilni obroč na mestu 4' menjali z drugimi heterocikličnimi obroči (2,5-dimetiltiofen, 2,5-dimetilfuran, furan), nato pa smo na karboksilno skupino vezali eno izmed elektrofilnih bojnih glav (aminoacetonitril, *N*-metilaminoacetonitril, *N*-hidroksisukcinimid).

Sintezna pot psoralenskega skeleta je potekala preko tvorbe 7-hidroksikumarina, spajanja le tega z α -bromoketonom ter na koncu še zaciklanje dobljene spojine v bazičnem mediju. Tvorbo derivata kumarina iz resorcinola in dietil-2-acetilglutarata smo izvedli po postopku Pechmannove kondenzacije. Za pretvorbo izhodnih 3-acetilheteroarilov do α -bromoketonov smo uporabili postopek bromiranja z CuBr_2 , ki je enostaven za izvedbo in bolj selektiven od bromiranja z elementarnim bromom. Sledilo je *O*-alkiliranje 7-hidroksikumarinskega derivata z α -bromoketonom in ciklizacija v alkalnem. V zadnji stopnji smo uvedli tri različne elektrofilne bojne glave, da bi dosegli kovalentno vezavo naših produktov v aktivno mesto β 5i podenote.

Vse spojine smo biokemijsko ovrednotili in jih primerjali s spojino vodnico. Izmed potencialnih nekovalentnih zaviralcev se je kot najboljša izkazala spojina **5a** z 2,5-dimetiltiofensko skupino ($K_i = 52,25 \mu\text{M}$), vendar pa ima v primerjavi s spojino vodnico ($K_i = 1,57 \mu\text{M}$) precej šibkejšo zaviralno delovanje. Menjava fenilnega obroča z ostalimi heterocikli torej ni pripomogla k izboljšanju zaviralnih lastnosti. Aminoacetonitrili ne kažejo nobenega izboljšanja zaviralnih lastnosti, izboljšanje aktivnosti napram ustrezni karboksilni kislini pa je vidno pri sukcinimidnih elektrofilih **8a** ($\text{IC}_{50} = 1,22 \mu\text{M}$) in **8b** ($\text{IC}_{50} = 3,44 \mu\text{M}$). Kljub povečanju zaviralnega delovanja pa ju je potrebno obravnavati s previdnostjo zaradi njune reaktivnosti in nestabilnosti.

7. LITERATURA

- [1] Adams J: The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat Rev* 2003; 29: 3–9.
- [2] Haas AL, Warms JV, Hershko A, Rose IA: Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *J Biol Chem* 1982; 257 (5): 2543–2548.
- [3] Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM: Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *The EMBO Journal* 2000; 19(1): 94–102.
- [4] <https://www.biomol.com/ubiquitin-and-proteasome-research.html?id=1374>
- [5] Kniepert A, Groettrup M: The unique functions of tissue-specific proteasomes. *Trends Biochem Sci* 2014; 39: 17–24.
- [6] Jung T, Grune T: The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part I – structure of proteasomes. *Redox Biol* 2013; 1: 178–182.
- [7] Huber EM, Basler M, R Schwab, Heinemeyer W, Kirk CJ, Groettrup M, Groll M: Immuno- and Constitutive Proteasome Crystal Structures Reveal Differences in Substrate and Inhibitor Specificity. *Cell* 2012; 148: 727–738.
- [8] Schrader J, Henneberg F, Mata RA, Tittmann K, Schneider TR, Stark H, Bourenkov G, Chari A: The inhibition mechanism of human 20S proteasomes enables next-generation inhibitor design. *Science* 2016; 353: 594–598.
- [9] Groll M, Huber R: Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: a structural approach. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1695: 33–44.
- [10] [5] Voges D, Zwickl P, Baumeister W: The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68 (1): 1015–1068.
- [11] Kisselev AF, Songyang Z, Goldberg AL: Why does Threonine, and not Serine, function as the active site nucleophile in proteasomes?. *J Biol Chem* 2000; 275: 14831–14837.
- [12] Fitzpatrick LR, Khare V, Small JS, Koltun WA: Dextran sulfate sodium-induced colitis is associated with enhanced low molecular mass polypeptide 2 (LMP2) expression and is attenuated in LMP2 knockout mice. *Dig Dis Sci* 2006; 51:1269–1276.
- [13] Kaur G, Batra S: Emerging role of immunoproteasomes in pathophysiology. *Immunol Cell Biol* 2016; 94(9): 812–820.

- [14] Basler M, Kirk CJ, Groettrup M: The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions. Elsevier Ltd 2013; 25: 74–80.
- [15] Ferrington DA, Gregerson DS: Immunoproteasomes: Structure, function, and antigen presentation. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2012; 109: 75–112.
- [16] Kincaid EZ, Che JW, York I, Escobar H, Reyes-Vargas E, Delgado JC: Mice completely lacking immunoproteasomes show major changes in antigen presentation. *Nat Immunol* 2011; 13: 129–35.
- [17] Seifert U, Bialy LP, Ebstein F, Bech-Otschir D, Voigt A, Schröter F: Immunoproteasomes Preserve Protein Homeostasis upon Interferon-Induced Oxidative Stress. *Cell* 2010; 142: 613–624.
- [18] Hussong SA, Kapphahn RJ, Phillips SL, Maldonado M, Ferrington DA: Immunoproteasome deficiency alters retinal proteasome's response to stress. *J Neurochem* 2010; 113: 1481–1490.
- [19] Bellavista E, Andreoli F, Parenti MD, Martucci M, Santoro A, Salvioli S, Capri M, Baruzzi A, Del Rio A, Franceschi C, Mishto M: Immunoproteasome in Cancer and Neuropathologies: A New Therapeutic Target?. *Curr Pharm Des.* 2013; 19: 702–718.
- [20] Angeles A, Fung G, Luo H: Immune and non-immune functions of the immunoproteasome. *Front Bioscience* 2012; 17: 1904–1916.
- [21] Atkinson SP, Collin J, Irina N, Anyfantis G, Kyung BK, Lako M, Armstrong L: A putative role for the immunoproteasome in the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem cells* 2012; 30: 1373–1384.
- [22] Fitzpatrick LR, Khare V, Small JS, Koltun WA: Dextran sulfate sodium-induced colitis is associated with enhanced low molecular mass polypeptide 2 (LMP2) expression and is attenuated in LMP2 knockout mice. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 1269–1276.
- [23] Muchamuel T, Basler M, Aujay MA: A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nat Med* 2009; 15: 781–787.
- [24] Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, et al. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res* 1999; 59(11): 2615–2622.
- [25] Kuhn DJ, Hunsucker SA, Chen Q, Voorhees PM, Orlowski M, Orlowski RZ.: Targeted inhibition of the immunoproteasome is a potent strategy against models of multiple myeloma that overcomes resistance to conventional drugs and nonspecific proteasome inhibitors. *Blood* 2009; 113: 4667–4676.

- [26] Miller Z, Ao L, Kim KB, Lee W: Inhibitors of the Immunoproteasome: Current Status and Future Directions. *Curr Pharm Des* 2013; 19: 4140–4151.
- [27] Huber EM, Groll M: Inhibitors for the Immuno- and Constitutive Proteasome: Current and Future Trends in Drug Development. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2012; 51: 8708–8720.
- [28] Bruin G, Huber EM, Xin BT, van Rooden EJ, Al-Ayed K, Kim KB, Kisselev AF, Driessen C, van der Stelt M, van der Marel GA, Groll M, Overkleeft HS: Structure-Based Design of β 1i or β 5i Specific Inhibitors of Human Immunoproteasomes. *J Med Chem* 2014; 57: 6197–6209.
- [29] Koroleva ON, Pham TH, Bouvier D, Dufau L, Qin L, Reboud-Ravaux M, Ivanov AA, Zhuze AL, Gromova ES, Bouvier-Durand M: Bisbenzimidazole derivatives as potent inhibitors of the trypsin-like sites of the immunoproteasome core particle. *Biochimie* 2015; 108: 94–100.
- [30] Kisselev AF, van der Linden WA, Overkleeft HS: Proteasome Inhibitors: An Expanding Army Attacking a Unique Target. *Chem Biol* 2012; 19: 99–115.
- [31] Screen M, Britton M, Downey SL, Verdoes M, Voges MJ, Blom AE, Geurink PP, Risseuw MD, Florea BI, van der Linden WA: Nature of pharmacophore influences active site specificity of proteasome inhibitors. *J Biol Chem* 2010; 285: 40125–40134.
- [32] Huber EM, Heinemeyer W, de Bruin G, Overkleeft HS, Groll M: A humanized yeast proteasome identifies unique binding modes of inhibitors for the immunosubunit β 5i. *The EMBO Journal* 2016; 35: 2602–2613.
- [33] Kraus J, Kraus M, Liu N, Besse L, Bader J, Geurink PP, de Bruin G, Kisselev AF, Overkleeft H, Driessen C: The novel β 2-selective proteasome inhibitor LU-102 decreases phosphorylation of I kappa B and induces highly synergistic cytotoxicity in combination with ibrutinib in multiple myeloma cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015; 76: 383–396.
- [34] Daru J, Stirling A: Mechanism of the Pechmann Reaction: A Theoretical Study. *J Org Chem* 2011; 76: 8749–8755.
- [35] Chimichi S, Boccalini M, Cosimelli B, Viola G, Vedaldi D, Dall'Acqua F: A convenient synthesis of psoralens. *Tetrahedron* 2002; 58: 4859–4863.
- [36] Montalbetti CA, Falque V: Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* 2005; 61: 10837–10838.

[37] <https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/carbodiimide-crosslinker-chemistry.html>