

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



NEŽA SLEVEC PETERNEL

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM
FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



NEŽA SLEVEC PETERNEL

NAČRTOVANJE IN SINTEZA
HETEROARILKARBOKSAMIDNIH ZAVIRALCEV
IMUNOPROTEASOMA

DESIGN AND SYNTHESIS OF
HETEROARYLCARBOXAMIDE
IMMUNOPROTEASOME INHIBITORS

Ljubljana, 2017

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

ZAHVALA:

Ob zaključku svojega študija na Fakulteti za farmacijo se iskreno zahvaljujem vsem, ki so mi pomagali na študijski poti in pri izvedbi magistrske naloge. Iskrena hvala mentorju, prof. dr. Alešu Obrezi, mag. farm. in somentorju, asist. dr. Marku Jukiču, mag. farm. za strokovne nasvete pri eksperimentalnemu delu, za izkazano prijaznost, dosegljivost in zelo hiter pregled naloge. Hvala tudi predsedniku komisije prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm. in asist. dr. Nejc Horvatu, mag. farm. za izjemno hiter pregled naloge ter tehničnim sodelavcem in asistentom na katedri za pomoč pri izvedbi dela v laboratoriju.

Zahvaljujem se tudi prijateljem in sošolcem za oporo in popestritev študijskih dni. Največja zahvala pa gre staršema Igorju in Mateji, sestri Maji ter starim staršem, za izkazano veliko skrb in podporo tekom celotnega študija. Verjeli ste vame vsak trenutek in nikoli podvomili v moje uspehe. Iskrena hvala tudi Tomažu; razumel si me v najtežjih trenutkih, mi bil v oporo in mi polepšal dneve.

IZJAVA:

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

Neža Slevec Peternel

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

Član komisije: asist. dr. Nejc Horvat, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

I. POVZETEK.....	I
II. ABSTRACT	II
III. SEZNAM OKRAJŠAV	III
1 UVOD	1
1.1 SISTEM UBIKVITIN-PROTEASOM	1
1.2 PROTEASOM	3
1.3 IMUNOPROTEASOM.....	5
1.4 PROTEASOM KOT TARČA ZDRAVILNIH UČINKOVIN	6
1.4.1 AVTOIMUNE IN VNETNE BOLEZNI.....	7
1.4.2 RAKAVE BOLEZNI	8
1.4.3 NEVRODEGENERATIVNE BOLEZNI.....	8
1.4.4 INFEKCIJSKE BOLEZNI	9
1.5 ZAVIRALCI PROTEASOMA	9
1.5.1 NESELEKTIVNI ZAVIRALCI PROTEASOMA IN IMUNOPROTEASOMA	10
1.5.2 SELEKTIVNI ZAVIRALCI IMUNOPROTEASOMA.....	12
2 NAMEN IN POTEK DELA	16
3 MATERIALI IN METODE	20
3.1 MATERIALI.....	20
3.2 METODE	20
4 EKSPERIMENTALNO DELO	23
4.1 SINTEZA IZHODNIH SPOJIN ZA VEZAVO AMINOKISLINSKIH AMIDOV ..	23
4.1.1 Sinteza etil 5-aminobenzofuran-2-karboksilata (1) in etil 5-amino-1H-indol- 2-karboksilata (2)	23

4.1.2	Sinteza etil 5-(((benziloksi)karbonil)amino)benzofuran-2-karboksilata (3), etil 5-(((benziloksi)karbonil)amino)-1H-indol-2-karboksilata (4) in etil 2-(((benziloksi)karbonil)amino)tiazol-5-karboksilata (5)	25
4.1.3	Sinteza 5-(((benziloksi)karbonil)amino)benzofuran-2-karboksilne kisline (6), 5-(((benziloksi)karbonil)amino)-1H-indol-2-karboksilne kisline (7) in 2-(((benziloksi)karbonil)amino)tiazol-5-karboksilne kisline (8).....	28
4.1.4	Sinteza etil 6-hidroksinikotinata (9)	30
4.1.5	Sinteza etil 6-(2-okso-2-feniletoksi)nikotinata (10)	32
4.1.6	Sinteza 6-(2-okso-2-feniletoksi)nikotinske kisline (11)	33
4.2	SINTEZA SPOJIN Z VEZANIM AMIDOM GLY, L-ALA IN L-PHE	34
4.2.1	Sinteza benzil (2-((2-amino-2-oksoetil)karbamoil)benzofuran-5-il)karbamata (12), benzil (2-((2-amino-2-oksoetil)karbamoil)-1H-indol-5-il)karbamata (13) in benzil (5-((2-amino-2-oksoetil)karbamoil)tiazol-2-il)karbamata (14).....	34
4.2.2	Sinteza benzil (R)-(2-((1-amino-1-oksopropan-2-il)karbamoil)benzofuran-5-il)karbamata (15) in benzil (S)-(5-((1-amino-1-oksopropan-2-il)karbamoil)tiazol-2-il)karbamata (16)	38
4.2.3	Sinteza benzil (R)-(2-((1-amino-1-okso-3-fenilpropan-2-il)karbamoil)benzofuran-5-il)karbamata (17), benzil (S)-(2-((1-amino-1-okso-3-fenilpropan-2-il)-karbamoil)-1H-indol-5-il)karbamata (18), benzil (S)-(5-((1-amino-1-okso-3-fenilpropan-2-il)karbamoil)tiazol-2-il)karbamata (19) in (S)-N-(1-amino-1-okso-3-fenilpropan-2-il)-6-(2-okso-2-feniletoksi)nikotinamida (20)	40
4.3	SINTEZA DERIVATOV 1,3,4-OKSATIAZOL-2-ONA.....	45
4.3.1	Poskus sinteze benzil (2-(((2-okso-1,3,4-oksataiazol-5-il)metil)karbamoil)benzofuran-5-il)karbamata (21).....	45
4.3.2	Poskus sinteze benzil (5-(((2-okso-1,3,4-oksataiazol-5-il)metil)karbamoil)tiazol-2-il)karbamata (22).....	46
4.4	BIOKEMIJSKO VREDNOTENJE POTENCIALNIH ZAVIRALCEV IMUNOPROTEASOMA.....	47
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	48

5.1 KATALITSKO HIDROGENIRANJE AROMATSKIH NITRO SPOJIN (sinteza spojin 1 in 2)	48
5.2 UVEDBA BENZILOKSIKARBONILNE SKUPINE NA AMINSKO SKUPINO DERIVATOV BENZOFURANA, INDOLA IN TIAZOLA (sinteza spojin 3, 4 in 5)...	49
5.3 HIDROLIZA DERIVATOV BENZOFURANA, INDOLA IN TIAZOLA (sinteza spojin 6, 7 in 8)	50
5.4 TVORBA ESTRA KOT ZAŠČITA 6-HIDROKSINIKOTINSKE KISLINE (sinteza spojine 9).....	52
5.5 VEZAVA 2-BROMOACETOFENONA IN TVORBA ETRA (sinteza spojine 10)	54
5.6 HIDROLIZA DERIVATA PIRIDINA (sinteza spojine 11).....	56
5.7 SKLOPITVENE REAKCIJE NA DERIVATIH BENZOFURANA, INDOLA, TIAZOLA IN PIRIDINA (sinteza spojin 12-20).....	56
5.8 CIKLIZACIJA AMINOKISLINSKIH DERIVATOV DO 1,3,4-OXSATIAZOL-2-ONA (poskus sinteze spojin 21 in 22)	59
5.9 BIOKEMIJSKO VREDNOTENJE POTENCIALNIH ZAVIRALCEV IMUNOPROTEASOMA.....	61
6 SKLEP IN ZAKLJUČEK	63
7 LITERATURA	64
8 PRILOGA	67

KAZALO SLIK

Slika 1: shema delovanja UPS (prirejeno po [4]).....	2
Slika 2: shematični prikaz procesiranja antigenov in njihove predstavitve na MHC I molekulah (prirejeno po [6]).....	3
Slika 3: zgradba podenot različnih vrst proteasoma (prirejeno po [6])	4
Slika 4: shematični prikaz zgradbe in delovanja 26S proteasoma ter zgradbe β -obroča 20S podenote (prirejeno po [8]).....	4
Slika 5: shema aktivnega mesta proteasoma, kamor se veže substrat (prirejeno po [7])	5
Slika 6: prikaz imunoproteasoma z aktivnim mestom $\beta 5i$ podenote (prirejeno po [7])	5
Slika 7: shematični prikaz različnih učinkov, ki so posledica zaviranja proteasoma (prirejeno po [9]).....	7
Slika 8: Bortezomib (prirejeno po [7]).....	10
Slika 9: Karfilzomib (prirejeno po [7]).....	11
Slika 10: Marizomib (prirejeno po [7])	11
Slika 11: Oprozomib (prirejeno po [7])	12
Slika 12: ONX 0914 (prirejeno po [7]).....	13
Slika 13: PR-924 (prirejeno po [7]).....	14
Slika 14: UK-101 (prirejeno po [7])	14
Slika 15: IPSI-001 (prirejeno po [7]).....	14
Slika 16: 1-CA (prirejeno po [20]).....	15
Slika 17: prikaz vezave sintetizirane spojine 18 v aktivno mesto imunoproteasoma ($\beta 5i$)	16
Slika 18: shema interakcij sintetizirane spojine 18 v vezavnem mestu imunoproteasoma ($\beta 5i$)	17
Slika 19: 1,3,4-oksatriazol-2-on.....	17
Slika 20: poenostavljena shema sinteze derivatov 1,3,4-oksatriazol-2-ona benzofuranskega tipa	18
Slika 21: poenostavljena shema sinteze derivatov 1,3,4-oksatriazol-2-ona indolnega tipa	18
Slika 22: poenostavljena shema sinteze derivatov 1,3,4-oksatriazol-2-ona tiazolnega tipa	19

Slika 23: poenostavljena shema sinteze derivatov 1,3,4-oksatazola-2-on piridinskega tipa	19
Slika 24: mehanizem adicije s sledečo eliminacijo (prirejeno po [22])	50
Slika 25: bazično-katalizirana hidroliza estra (prirejeno po [22]).....	52
Slika 26: mehanizem tvorbe kislinskega klorida z SOCl ₂ (prirejeno po [22])	53
Slika 27: mehanizem tvorbe estra iz acil klorida in EtOH (prirejeno po [22]).....	54
Slika 28: mehanizem tvorbe etra (S _N 2) (prirejeno po [22])	55
Slika 29: mehanizem delovanja katalizatorja faznega prenosa (prirejeno po [24])....	56
Slika 30: prikaz sklopitvene reakcije med karboksilno kislino in aminom z uporabo sklopitvenega reagenta EDC in zaviralca racemizacije HOBT (prirejeno po [26])	57
Slika 31: a) TBTU [29], b) EDC [27], c) HOBT [28]	57
Slika 32: predpostavljen mehanizem ciklizacije do 1,3,4-oksatazola-2-on (prirejeno po [22])	60

KAZALO PREGLEDNIC

Tabela 1:	lastnosti spojin 1 in 2	24
Tabela 2:	lastnosti spojin 3, 4 in 5	26
Tabela 3:	lastnosti spojin 6, 7 in 8	29
Tabela 4:	lastnosti spojine 9.....	31
Tabela 5:	lastnosti spojine 10.....	32
Tabela 6:	lastnosti spojine 11.....	33
Tabela 7:	lastnosti spojin 12, 13 in 14	36
Tabela 8:	lastnosti spojin 15 in 16	39
Tabela 9:	lastnosti spojin 17, 18, 19 in 20	42
Tabela 10:	 sintetizirane spojine s prikazano rezidualno aktivnostjo (RA) encima v prisotnosti zaviralca	62

I. POVZETEK

Sistem ubikvitin-proteasom se nahaja v citosolu in jedru vseh evkariontskih celic. Kot najpomembnejši sistem za razgradnjo proteinov je ključen pri uravnavanju celičnega signaliziranja in apoptoze. Če se v teh procesih pojavijo motnje, lahko vodijo do nastanka rakavih, vnetnih in avtoimunih bolezni. Pri omenjenih boleznih se imunoproteasom izraža v večji meri kot pri zdravih posameznikih. Dokazali so, da lahko moduliranje delovanja imunoproteasoma privede do želenih terapevtskih učinkov. Prvi odkrit zaviralec proteasoma je bil bortezomib, ki pa je žal premalo selektiven in povzroča številne neželene učinke. Raziskovalci so predstavili številne nove učinkovine, ki so bolj selektivne in imajo blažje neželene učinke.

Namen magistrskega dela je bila sinteza nepeptidnih selektivnih kovalentnih in nekovalentnih zaviralcev imunoproteasoma, ki bi se selektivno vezali na njegovo $\beta 5i$ podenoto. Ti naj bi izkazovali manj neželenih učinkov v primerjavi z neselektivnimi zaviralci. Z molekulskim sidranjem smo odkrili, kakšni molekularni fragmenti so potrebni za selektivno vezavo spojin v aktivno mesto $\beta 5i$ podenote.

Na derivatih benzofurana in indola smo izvedli katalitsko hidrogeniranje za redukcijo nitro skupine v amsko in tvorili karbamate z benzil kloroformatom. Podobno smo naredili s spojino s tiazolnim skeletom. Izhodno spojino piridinskega tipa smo morali najprej zaščititi v obliki estra s pomočjo tionilklorida, na prosto hidroksilno skupino pa smo vezali 2-bromoacetofenon. Ester, ki je služil kot zaščita, smo povsod hidrolizirali in na različne heteroarilkarboksilne kisline, tj. derivate benzofurana, indola, tiazola in piridina, uvedli tri različne aminokisline, ki so imele karboksilno skupino pretvorjeno v primarni amid. To smo storili s pomočjo sklopitvenih reagentov. V zadnji stopnji smo želeli terminalni amid ciklizirati do 1,3,4-oksatiazol-2-ona, ki je močan elektrofil za reakcijo s treoninom v aktivnem mestu encima.

Uspešno smo sintetizirali devet potencialnih nekovalentnih zaviralcev imunoproteasoma, ki smo jih biokemijsko ovrednotili, vendar so bili neaktivni. Kovalentnih zaviralcev pa nam zaradi neuspele ciklizacije ni uspelo sintetizirati.

Ključne besede: sistem ubikvitin-proteasom, imunoproteasom, kovalentni in nekovalentni zaviralci, $\beta 5i$ podenota, sinteza 1,3,4-oksatiazol-2-ona

II. ABSTRACT

Ubiquitin-proteasome system is located in nucleus and cytosol of all eucariotic cells. Due to its major role in protein degradation, it is one of the key systems in regulation of cell signalling and apoptosis. Proper control of these processes is crucial for prevention of cancer, inflammatory and autoimmune diseases. Expression of immunoproteasome is enhanced in these diseases compared to healthy people. It has been shown that modulation of the immunoproteasome may lead to wanted therapeutic effects. The first discovered proteasome inhibitor was bortezomib, which unfortunately lacks selectivity and causes unwanted side effects. Scientists have introduced several new and more selective compounds exhibiting much weaker side effects.

Our main goal in this work was to synthesize non-peptidic covalent and non-covalent immunoproteasome inhibitors that would selectively bind to the $\beta 5i$ subunit of immunoproteasome. Ideally, they would exert weaker side effects than non-selective inhibitors. Using a molecular docking we found several promising molecular fragments for selective binding to the $\beta 5i$ subunit.

We catalytically hydrogenated nitro groups in benzofurane and indole reagents to obtain amines and proceeded reaction with benzyl chloroformate to form carbamates. In the similar manner we treated the thiazole derivative. We protected the structure of pyridine by the esterification of carboxylic group with thionyl chloride and performing the reaction between the hydroxyl group and 2-bromoacetophenone reagent. We proceeded with the hydrolysis of ester, which was the protecting group. On all heteroarylcarboxylic acids of benzofurane, indole, thiazole and pyridine derivatives we introduced three different aminoacids with carboxylic group modified into primary amide. To perform the reaction we used coupling reagents. In the final stage we attempted to prepare cyclic derivatives of 1,3,4-oxathiazol-2-one from the terminal amide. 1,3,4-oxathiazol-2-one is potent electrophile for reaction with threonine in the enzyme active site.

Finally, we synthesized nine potential non-covalent inhibitors of immunoproteasome. However, the biochemical tests showed that none of them was active. We were not able to synthesize covalent inhibitors, because of the unsuccessful cyclization.

Keywords: ubiquitin-proteasome system, immunoproteasome, covalent and non-covalent inhibitors, $\beta 5i$ subunit, 1,3,4-oxathiazole-2-one synthesis

III. SEZNAM OKRAJŠAV

ADP	adenozin difosfat	J	sklopitvena konstanta
ALL	akutna limfoblastna levkemija	L-Ala	L-alanin
AML	akutna mieloična levkemija	LMP	nizkomolekularni peptid
AMP	adenozin monofosfat	L-Phe	L-fenilalanin
Asp	asparaginska kislina	Lys	lizin
ATP	adenozin trifosfat	m	multiplet
br	razširjen signal	MECL1	multikatalitični endopeptidazni kompleks podenota 1
cCP	konstitutivni proteasom	Met	metionin
CD4+	T-celice pomagalke	MF	mobilna faza
CD8+	citotoksični T-limfociti	MHC I	poglavitni kompleks tkivne skladnosti I
ChTL	aktivnost podobna kimotripsinu	MS	masna spektrometrija
CL	aktivnost podobna kaspazam	NF-κB	jedrni faktor κB
Cys	cistein	NMR	jedrska magnetna resonanca
d	dublet	p53/27^{Kip1}	protein 53/27 ^{Kip1}
dd	dublet dubleta	q	kvartet
DMF	dimetilformamid	PP	pirofosfat
DMSO	dimetilsulfoksid	Pro	prolin
DUBs	deubikvitinirajoči encimi	RA	rezidualna aktivnost
E1	ubikvitin-aktivirajoči encim	Rf	retencijski faktor
E2	ubikvitin-konjugirajoči encim	rs	razširjen singlet
E3	ubikvitin ligaza	s	singlet
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid	SLE	sistemski eritematozni lupus
eq	ekvivalent	S_N	nukleofilna substitucija
ER	endoplazemski retikulum	t	triplet
ERAP	aminopeptidaza endoplazemskega retikuluma	TAP	transportni proteinski kompleks

ESI	elektronrazprševalna ionizacija	TBTU	O-(benzotriazol-1-il)-N, N, N', N'-tetrametiluronijev tetrafluoroborat
Gly	glicin	tCP	timoproteasom
His	histidin	TCR	T-celični receptor
HIV	humani virus imunske pomankljivosti	Thr	treonin
HOBT	1-hidroksibenzotriazol	yCP	proteasom kvasovk
HRMS	masna spektrometrija visoke ločljivosti	Ub	ubikvitin
iCP	imunoproteasom	Val	valin
IFN-γ	interferon γ	δ	kemijski premik
IL	interlevkin	η	izkoristek reakcije
IR	infrardeča spektroskopija	λ	valovna dolžina
IUPAC	mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo	v	valovno število

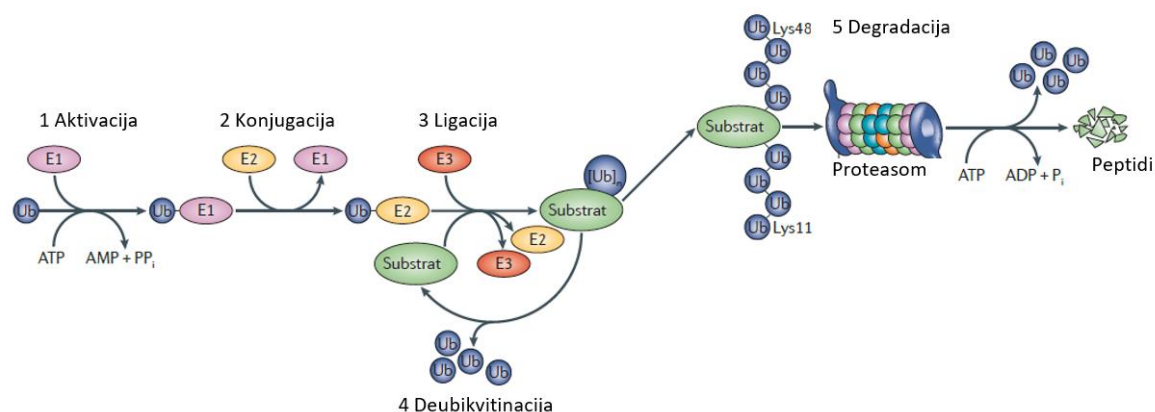
1 UVOD

Normalno delovanje vseh celic v organizmu zagotavljajo proteini, ki so specializirani za opravljanje specifičnih bioloških nalog. Nahajajo se tako v celici kot zunaj nje. Za razgradnjo poškodovanih, denaturiranih in nepravilno zviti proteinov je v največji meri odgovoren sistem ubikvitin-proteasom (UPS) (slika 1) [1, 2].

1.1 SISTEM UBIKVITIN-PROTEASOM

UPS je sistem, ki je odgovoren za razgradnjo približno 80 % znotrajceličnih proteinov. Nahaja se v citosolu in jedru vseh evkariontskih celic. Med njegovimi nalogami je najpomembnejša regulacija celičnega cikla preko uravnavanja razgradnje regulatornih proteinov ter vpliva na molekule, ki so odgovorne za celično signaliziranje. Udeležen je tudi v popravilu DNA, transkripciji ter sprožanju apoptoze. V primeru, da ne bi bilo ustrezne homeostaze proteinov, tudi ne bi bilo ustreznega imunskega odgovora in razvoja vnetja, zato bi prišlo do iztirjenja omenjenih procesov. To bi vodilo v razvoj številnih bolezni, kot so avtoimune, nevrodegenerativne in vnetne bolezni ter rakava obolenja [1, 2, 3].

Razgradnja proteinov, sintetiziranih v celici, vključuje dva koraka. Sprva pride v citoplazmi do ubikvitinacije oziroma označitve tarčnega proteina za razgradnjo, nato pa se ta izvede v 20S podenoti proteasoma. Peptidi, ki nastanejo, so dolgi od 8 do 10 aminokislin in so idealni za vezavo na MHC I molekulo (slika 2). Ubikvitinacija je zelo kompleksen proces in vključuje kovalentno vezavo ubikvitina na tarčni protein (slika 1). Za to so odgovorni trije encimi, ki so del encimske kaskade. To so E1 (*ubikvitin-aktivirajoči encim*), E2 (*ubikvitin-konjugirajoči encim*) in E3 (*ubikvitin ligaza*). Začetek ubikvitinacije se začne z aktivacijo ubikvitina, ki jo izvede E1. Ubikvitin se veže na notranji cisteinski preostanek encima s tioestrsko vezjo in ga poveže z E2. V zadnji stopnji pride do prenosa aktiviranega ubikvitina na proteinski substrat, ki ga katalizira E3. To se ponavlja ciklično, vse do vezave poliubikvitinske verige na substrat. Proces lahko poteka tudi v obratni smeri. Katalizirajo ga deubikvitinirajoči encimi, ki pripadajo družinam Cys-proteaz in metaloproteaz [1, 4, 5].

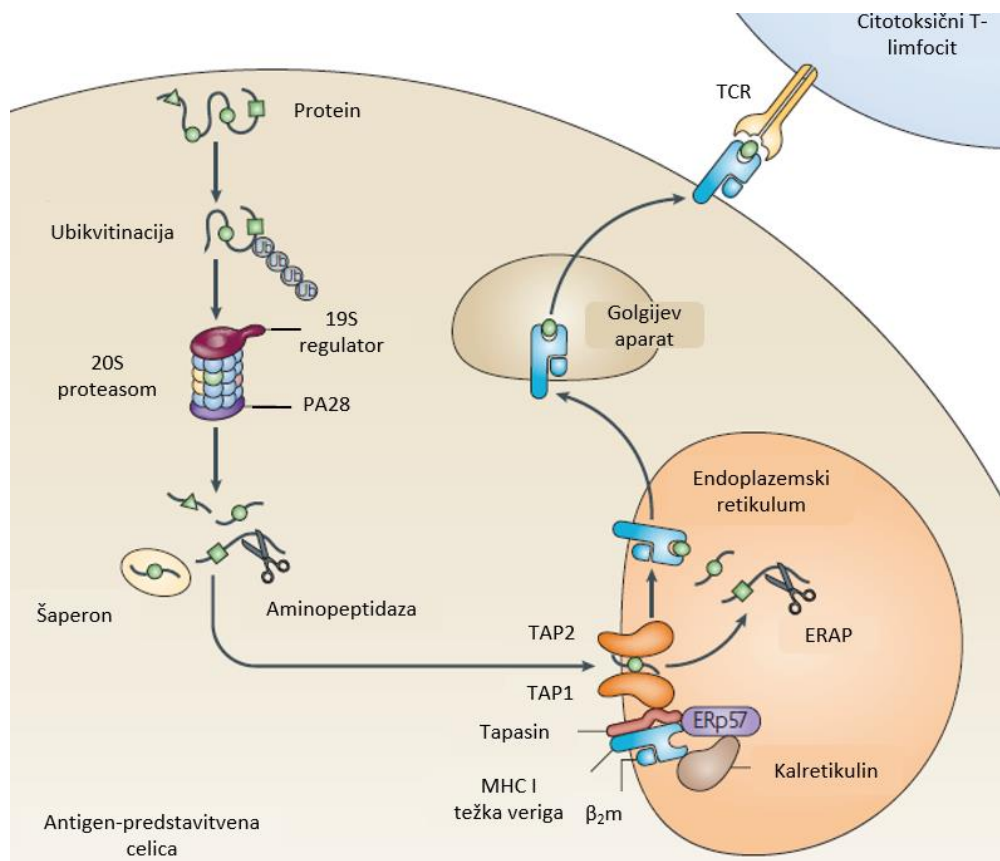


Slika 1: shema delovanja UPS (prirejeno po [4])

Pomen ustreznega ravnotežja med procesoma ubikvitinacije in deubikvitinacije je zagotavljanje normalne funkcije proteinov in sprožitve apoptoze, ko je to potrebno [4].

Daljšje peptide, ki nastanejo po razgradnji proteinov v proteasomu, razgradijo aminopeptidaze v citoplazmi. Šaperoni (*t. i. proteini toplotnega šoka*) imajo nalogo zaščite peptidov pred prehitro razgradnjo. Razgrajeni peptidi se iz citosola prenesejo v endoplazemski retikulum s pomočjo TAP1 in TAP2 (*»transporter associated with antigen processing« 1 in 2*), ki sta preko tapasina povezana s težko verigo MHC I molekule. V ER se peptidi naprej razgradijo z ERAP1 in ERAP2 (*t. i. ER aminopeptidaza 1 in 2*). V naslednji fazi pride do vezave peptidov na MHC I in sprostitve iz šaperona kalretikulina, ki je v lumnu ER. Nato vstopijo v Golgijev aparat in od tam skozi celično membrano na površino celice. Tam se peptidi povežejo s T-celičnim receptorjem (slika 2) [6].

Aktivnost UPS uravnava številni hormoni in signalne molekule, kot so ščitnični hormoni, glukokortikoidi, citokini in številni proteini, ki se izražajo v malignih celicah [1, 5].



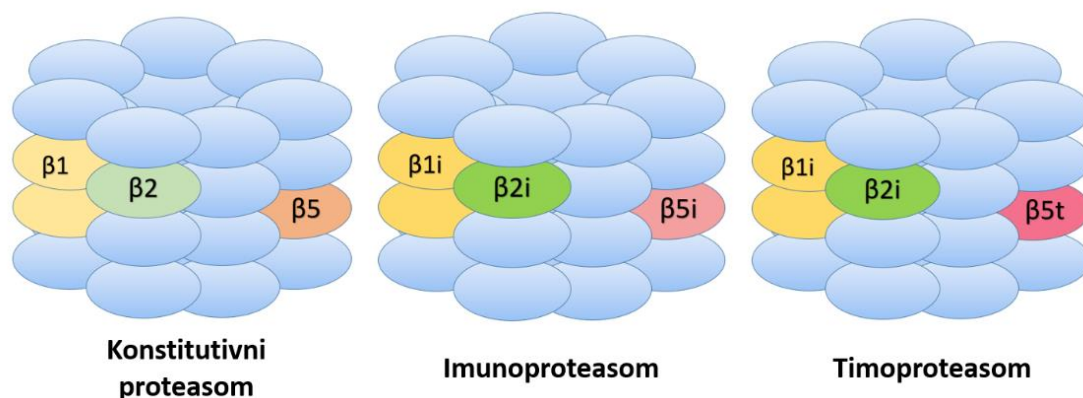
Slika 2: shematični prikaz procesiranja antigenov in njihove predstavitve na MHC I molekulah (prirejeno po [6])

1.2 PROTEASOM

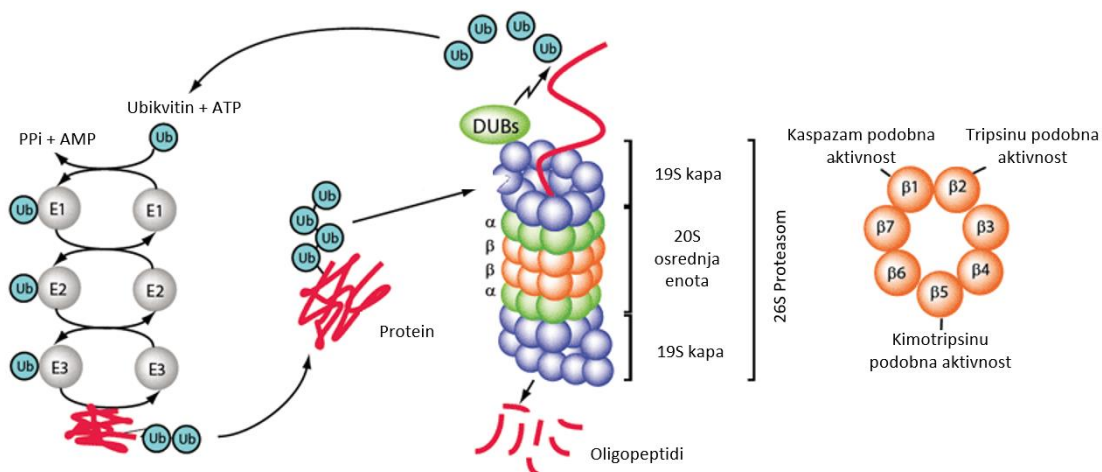
Osrednji element UPS predstavlja proteasom, ki prepozna z ubikvitinom označene proteine. Obstaja v treh izoformah (slika 3). Konstitutivni oziroma 26S proteasom je prisoten v večini celic, timoproteasom v timocitih, imunoproteasom pa se tvori v monocitih in limfocitih kot odgovor na signaliziranje citokinov [5].

26S ali konstitutivni proteasom je multikatalitični kompleks, sestavljen iz osrednje enote 20S proteasoma in dveh 19S regulatornih odsekov (slika 4). Celotna molekulska masa znaša okoli 2000 kD. 20S enota je votle cilindrične oblike, zgrajena iz 28 podenot, ki so med seboj povezane v 4 obročje, znotraj katerih poteka proteoliza. Dva zunanja obročja sta zgrajena iz 7 različnih α -podenot, njuna naloga pa je povezava z notranjima obročema in zunanjsima 19S podenotama. Notranja obročja sestavlja 7 različnih β -podenot, pri čemer so 3 katalitično aktivne [5]. 19S podenoti sta odgovorni za prepoznavanje proteinov, razvitje proteinov, odstranitev ubikvitina in kot najpomembnejše, omogočita odpiranje kanala na 20S enoti, da lahko proteini vstopijo v prostor, kjer se razgradijo [1]. Od razgradnje so

odvisni nadaljnji celični procesi, kot so apoptoza, celično signaliziranje in predstavitev antigenov [7].

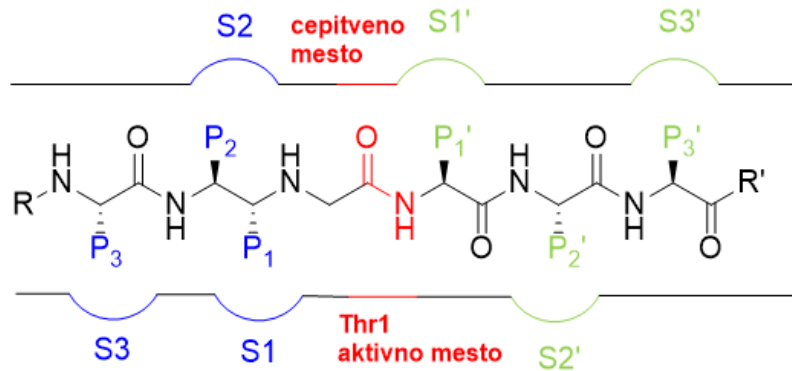


Slika 3: zgradba podenot različnih vrst proteasoma (prirejeno po [6])



Slika 4: shematični prikaz zgradbe in delovanja 26S proteasoma ter zgradbe β -obroča 20S podenote (prirejeno po [8])

Proteolitično aktivnost vsake β podenote lahko razdelimo v tri skupine glede na lokacijo cepitve (slika 4). Kimotripsinu podobno aktivnost (*»chymotrypsin-like«*, ChTL) ima podenota $\beta 5$, ki cepi peptidno verigo za hidrofobnimi ostanki. Enota $\beta 2$ cepi za bazičnimi aminokislinskimi ostanki in ima aktivnost podobno tripsinu (*»trypsin-like«*, TL), za aktivnost podobno kaspazam (*»caspase-like«*, CL), pa je odgovorna enota $\beta 1$, ki cepi peptidno vez za kislimi ostanki [3, 5]. Vezavno mesto na proteasomu (slika 5) je sestavljeno iz treh S-žepkov (S1, S2 in S3), v katere se prilegajo stranske P-verige substrata (P1, P2 in P3). Na drugi strani so trije S'-žepki (S1', S2' in S3'), v katere se prilegajo P'-verige substrata (P1', P2' in P3'). Med obema področjema je glavno katalitično mesto za cepitev peptidne vezi s Thr1 ostankom [7].



Slika 5: shema aktivnega mesta proteasoma, kamor se veže substrat (prirejeno po [7])

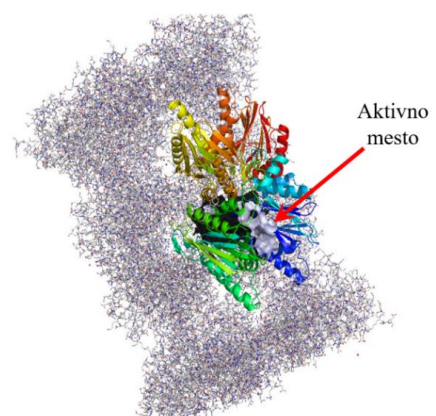
1.3 IMUNOPROTEASOM

Pri vretenčarjih je 20S katalitična enota zastopana v treh oblikah (slika 3), in sicer kot konstitutivni proteasom (cCP), ki je v večini tkiv, timoproteasom (tCP), ki je v epitelijskih celicah priželjca in imunoproteasom (iCP) (slika 6), značilen za monocite in limfocite. Za imunoproteasom je značilno, da ima v primerjavi s cCP močno zmanjšano kaspazno aktivnost in močno povečano kimotripsinsko [7].

V primerjavi s konstitutivnim proteasomom je imunoproteasom tkivno specifičen in zastopan v celicah imunskega sistema. Nastane kot odgovor na celično signaliziranje. V primeru, da so celice stimulirane s provnetnimi citokini, se začne izražati imunoproteasom, ki pospeši tvorbo peptidov za predstavitev na MHC I molekulah. Odstranitev antigena s pomočjo citotoksičnih T-limfocitov je možna le, če pride do interakcije T-celičnega receptorja in peptidov na MHC I molekuli (slika 2).

Večino peptidnih antigenov proizvaja ravno UPS, kar pomeni, da je ta sistem nepogrešljiv del imunskega sistema [1, 6, 9].

Glavna razlika v zgradbi imunoproteasoma, v primerjavi s konstitutivnim proteasomom, je zamenjava 19S z 11S podenoto. Namesto β -podenot imamo njihovo drugačno, inducibilno različico, torej $\beta 5i$ (LMP7), $\beta 2i$ (MECL1) in $\beta 1i$ (LMP2) katalitično podenoto (slika 3). Stimulacija celic z IFN- γ ali s TNF- α , ki se izločata v fazi imunskega



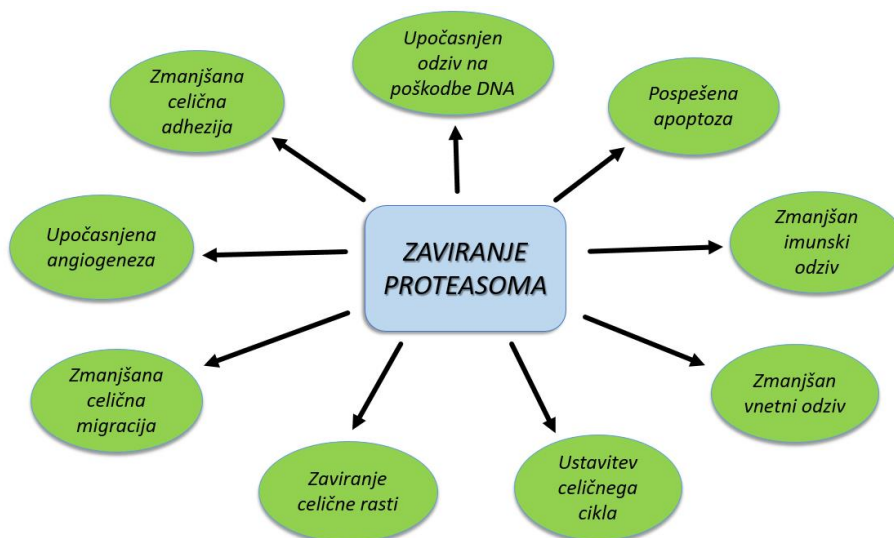
Slika 6: prikaz imunoproteasoma z aktivnim mestom $\beta 5i$ podenote (prirejeno po [7])

odziva in kot odgovor na stres, povzroči nastanek iCP v celicah nehematopoetskega izvora [10]. To močno pospeši hidrolizo proteinov in s tem nastanek manjših oligopeptidov s hidrofobnimi C-terminalnimi ostanki. Po cepitvi nastanejo od 8 do 10 aminokislin dolgi peptidi, ki se takoj vežejo na MHC I in se predstavijo citotoksičnim T-limfocitom, kar sproži imunski odziv (slika 2) [1, 7, 9].

1.4 PROTEASOM KOT TARČA ZDRAVILNIH UČINKOVIN

Raziskovalci so ugotovili, da se pri številnih, danes vse pogostejših boleznih, imunoproteasom izraža v večji meri kot pri zdravih posameznikih. Zato je proteasom lahko dobro prijemališče zdravil, ki zavirajo njegovo delovanje. Povečane koncentracije imunoproteasoma so ugotovili pri številnih neoplazmah (multipli mielom, rak debelega črevesja, pljuč, prostate...), avtoimunih boleznih (revmatoidni artritis, sistemski lupus eritematosus, psoriaza, Chronova bolezen...), pri progresivnih nevrodegenerativnih boleznih (Alzheimerjeva, Parkinsonova, Huntingtonova bolezen...) in pri številnih vnetnih boleznih. Če zaviramo delovanje 20S podenote proteasoma, pride do kopičenja poškodovanih in nepravilno zviti proteinov. To predstavlja velik oksidativni stres za celico in je lahko razlog, da pride do ustavitve delitve celice in apoptoze. Pri nadzorovanju tumorogeneze imajo zaviralci proteasoma ključno vlogo, ker preprečujejo razgradnjo tumor supresorskih proteinov, ti pa celice ščitijo, da se ne pretvorijo v tumorske celice [7, 10, 11].

Z zaviranjem imunoproteasoma zavremo tudi NF- κ B signalno pot, ki je odgovorna za nastanek vnetja in še številne druge procese (slika 7). Ni še povsem jasno ali je povišana koncentracija imunoproteasoma vzrok za nastanek in napredovanje bolezni ali je to le posledica prekomerne sinteze citokinov in celičnega stresa [7].



Slika 7: shematični prikaz različnih učinkov, ki so posledica zaviranja proteasoma (prirejeno po [9])

1.4.1 AVTOIMUNE IN VNETNE BOLEZNI

Pri patogenezi avtoimunih in vnetnih bolezni je imunoproteasom zelo pomemben dejavnik, ker je vključen v procesiranje antigenov in razvoj T-celic pomagalk, ki delujejo provnetno. Ko pride do stimulacije celic z IFN- γ ali TNF- α , se začnejo tvoriti velike količine inducibilnih β -podenot proteasoma, čemur sledi vgraditev le-teh v 20S podenoto in nastanek imunoproteasoma. Dokazano je bilo, da lahko z zaviranjem β 5i, β 2i in β 1i podenot zdravimo vnetne avtoimune bolezni, za katere so odgovorne CD8+ (*citotoksični T-limfociti*) in CD4+ (*T-celice pomagalk*) celice, saj te potrebujejo imunoproteasom za svoj obstoj v vnetnem okolju. V študijah, opravljenih na miših, so ugotovili, da z aplikacijo β 5i selektivnega zaviralca ONX-0914 lahko preprečimo nastanek in napredovanje številnih avtoimunih bolezni, kot so diabetes tipa I, SLE, revmatoidni artritis, vnetno črevesno bolezen, avtoimuni encefalomyelitis in celo preprečimo zavrnitvene reakcije transplantiranih organov (*»graft-versus-host disease«*) [12, 13].

Danes zelo aktualna avtoimuna bolezen je psoriza, katere vzrok je povezan s T-limfociti in aktivacijo NF- κ B. Po aplikaciji zaviralca proteasoma se je zmanjšala velikost psoriatičnih lezij na koži, zmanjšal pa se je tudi T-celični odziv in nastanek adhezijskih molekul. Podobno se dogaja pri revmatoidnem artritisu, kjer zaviralec proteasoma zavre aktivacijo NF- κ B, nastanek IL-6 in adhezijskih molekul ter tako zmanjša vnetje [1].

1.4.2 RAKAVE BOLEZNI

Tudi za razvoj nekaterih rakavih obolenj je v večji meri odgovoren dejavnik NF- κ B. Gre za transkripcijski faktor, ki je vključen v izražanje genov za citokine, kemokine, rastne faktorje, adhezijske molekule, odgovoren pa je tudi za nadzor imunskih in vnetnih procesov ter zaviranje apoptoze. V tumorskih celičnih linijah z zaviranjem proteasoma preprečimo aktivacijo tega faktorja in zaviramo angiogenezo, ki je ključna pri rasti novotvorb in njihovi invaziji v okoliška tkiva. Tako zmanjšamo preživetje in rast rakavih celic [9].

Vpletenost proteasoma v nastanek raka lahko pojasnimo tudi z razgradnjo regulatorjev celičnega cikla kot sta p53 in p27^{Kip1}. Odgovorna sta za nadzorovanje delitve celice. V primeru njune razgradnje v proteasomu se lahko sproži tumorogeneza, zato je zaviranje razgradnje teh proteinov pomembno za protitumorni učinek. Opazili so, da se je z zaviranjem proteasoma povišala raven p53 in s tem tudi apoptoza v nekaterih tumorskih celicah (ledvične tumorske celice, melanom, tumor debelega črevesa, multipli mielom) [9, 11].

1.4.3 NEVRODEGENERATIVNE BOLEZNI

V razvoj bolezni sta vpletena dva mehanizma. Prvi je mutacija v UPS encimih ali tarčnem substratu, ki vodi v izgubo funkcije proteina in lahko tudi v agregacijo proteinov. Drugi pa je pospešena razgradnja proteinov. Mnogo nevrodegenerativnih bolezni, ki se največkrat pojavijo v starosti, je povezanih z akumulacijo netopnih proteinskih ostankov oziroma agregatov, ki so sestavljeni večinoma iz nepravilno zviti proteinov (huntingtin, α -sinuklein, hiperfosforiliran tau-protein), različnih šaperonov in komponent UPS (E3-ligaze, 19S in 20S podenote 26S proteasoma). Pojavljajo se pri Alzheimerjevi in Pickovi bolezni, bolezni Lewyjevih telesc, Parkinsonovi bolezni, Huntingtonovi bolezni in številnih spinocerebralnih ataksijah. Eden od načinov zdravljenja je zaščita celic pred toksičnimi vplivi nepravilno zviti in poškodovanih proteinov, ki ga lahko dosežemo z uravnavanjem delovanja proteasoma. Ta odstrani poškodovane proteine iz citosola, jedra in ER, šaperoni pa se vežejo na hidrofobne regije proteinov. Na ta način jih zaščitijo pred agregacijo ter omogočijo pravilno zvitje. V primeru, da tega ne dosežejo, pride do razgradnje [14].

1.4.4 INFEKCIJSKE BOLEZNI

Z zaviralci proteasoma lahko ugodno vplivamo tudi na potek infekcijskih bolezni. Na področju terapije okužbe z virusom HIV so ugotovili, da zavrejo dozorevanje in sproščanje retrovirusov, in sicer posredno. Pride do zmanjšanja zalog ubikvitina, ki je nujno potreben za sprostitvev virusa iz celice. To bi lahko pomenilo nov pristop za zdravljenje bolnikov, okuženih s HIV [3].

1.5 ZAVIRALCI PROTEASOMA

Proteasom uvrščamo v družino endoproteaz. Aktivno mesto encima predstavlja treoninski ostanek 1 (Thr1), ki kot nukleofil napade elektrofilni karbonilni C-atom v peptidni vezi substrata. Posledica je nastanek acil-encima kot intermediata in nastanek novega peptidnega fragmenta s prostim N-koncem. V naslednjem koraku, zaradi dostopa vode v aktivno mesto, potече hidroliza acil-encima in s tem se ponovno regenerira treoninski ostanek. Mehanizem delovanja vseh zaviralcev je isti ne glede na vrsto podenote proteasoma. Selektivnost peptidomimetikov dosežemo z modifikacijo stranskih verig. Za zagotovitev specifičnosti in selektivnosti uvedemo reaktivne funkcionalne skupine, ki reagirajo s Thr1 reverzibilno ali ireverzibilno s tvorbo kovalentne vezi [7].

Zaviralce proteasoma lahko razvrstimo v dve skupini, in sicer zaviralce peptidne narave, ki posnemajo vezavo naravnih substratov in nepeptidne zaviralce, ki nimajo peptidne strukture. Strukturno ločimo več različnih tipov spojin glede na elektrofilno skupino, in sicer aldehide, peptide z vinil sulfonsko skupino, boronate, kamor spada prvi registriran zaviralec proteasoma-bortezomib ter $\alpha\beta'$ -epoksiketone, α -ketoaldehide, β -laktone in oksatiazol-2-one. Slednji spadajo med najnovejše zaviralce in so v zadnjem času tarča številnih raziskav [7].

Razdelimo jih lahko tudi glede na vrsto vezave v aktivno mesto. Ločimo reverzibilne in ireverzibilne zaviralce. Po selektivnosti jih opredelimo kot neselektivne in selektivne za vrsto proteasoma. Večina zaviralcev cilja $\beta 5$ podenoto tako konstitutivnega proteasoma, kot imunoproteasoma, kar se je izkazalo za učinkovito pri zdravljenju bolezni. iCP selektivni zaviralci so trenutno predmet raziskovanja kot učinkovine s protitumornimi učinki in potencialne učinkovine za zdravljenje avtoimunih bolezni [7].

1.5.1 NESELEKTIVNI ZAVIRALCI PROTEASOMA IN IMUNOPROTEASOMA

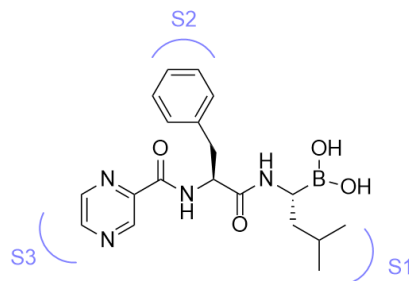
1.5.1.1 Bortezomib (Velcade®)

Bortezomib (slika 8), učinkovina dipeptidil boronatne strukture, je prvi zaviralec proteasoma s širokim spektrom delovanja na številne vrste neoplazem. Mehanizmi delovanja bortezomiba še niso povsem jasni, vključujejo pa motnje v celični adheziji, zaviranju angiogeneze, pozitivno regulacijo proapoptotičnih mehanizmov in negativno regulacijo antiapoptotičnih mehanizmov ter številne druge, ki so posledica zaviranja NF- κ B signalne poti.

Uporablja se za zdravljenje multiplega mieloma, akutne mieloične levkemije (AML), akutne limfoblastne levkemije (ALL), raka trebušne slinavke, ugodne učinke pa kaže tudi pri zdravljenju solidnih tumorjev, kot je na primer nedrobnocelični rak pljuč [7].

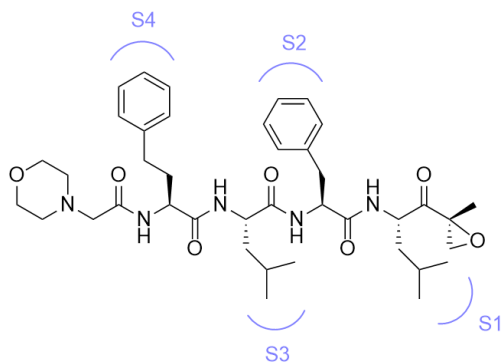
Veže se kovalentno in reverzibilno na β 5 podenoto 20S proteasoma, natančneje na N-terminalni Thr1 aktivnega mesta. Z enako jakostjo zavira tako β 5c kot β 5i podenoto, ima pa majhno afiniteto tudi do CL aktivnega mesta. Pirazinska skupina tvori ugodne interakcije z aminokislinami v S3 žepku aktivnega mesta [7].

Bortezomib se aplicira izključno parenteralno. Kljub velikemu uspehu na trgu, je njegova slabost širok nabor resnih neželenih učinkov, kot so trombocitopenija in gastrointestinalne težave. Pri več kot 30 % pacientov so se pojavili nevrodegenerativni učinki, ki vključujejo tremor in zmanjšanje hitrosti prevajanja živčnih impulzov. Pogosto pa se pojavljajo tudi hipotenzija, kongestivno srčno popuščanje, slabost in bruhanje. Opazili so tudi neodzivnost pacientov na zdravljenje in relaps bolezni [7, 9, 15].



Slika 8: Bortezomib (prirejeno po [7])

1.5.1.2 Karfilzomib (Kyprolis®)



Slika 9: Karfilzomib (prirejeno po [7])

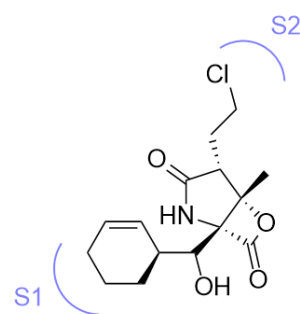
Karfilzomib (slika 9) je zaviralec proteasoma druge generacije s tetrapeptidno strukturo. Njegovi tarči sta $\beta 5c$ in $\beta 5i$, pri čemer je v primerjavi z bortezomibom malce bolj selektiven za $\beta 5c$ podenoto. Ireverzibilno se veže v S1 žepek, z višjo selektivnostjo za ChTL katalitično mesto. Primerjalno z bortezomibom izkazuje le minimalno navzkrižno reaktivnost z ostalimi mesti 20S podenote. Reagira s hidroksilno in

aminsko skupino Thr1 ostanka v aktivnem mestu [7].

V kliničnih študijah so dokazali učinkovitost pri zdravljenju multiplega mieloma, limfomov, AML, ALL in solidnih tumorjev. Podobno kot bortezomib ima tudi karfilzomib precej neželenih učinkov, primer sta nevtropenija in trombocitopenija. Ne učinkuje pa periferno nevrotoksično tako kot bortezomib. Slabost karfilzomiba je kratek razpolovni čas (približno 30 minut) in zelo slaba biološka uporabnost, kar pomeni, da je možna le parenteralna (intravenska) aplikacija. Glavna reaktivna skupina učinkovine je $\alpha'\beta'$ -epoksiketon, ki je odgovoren za bolj usmerjeno delovanje le na proteasom in manjšo verjetnost rezistence v primerjavi z bortezomibom [7, 9, 16].

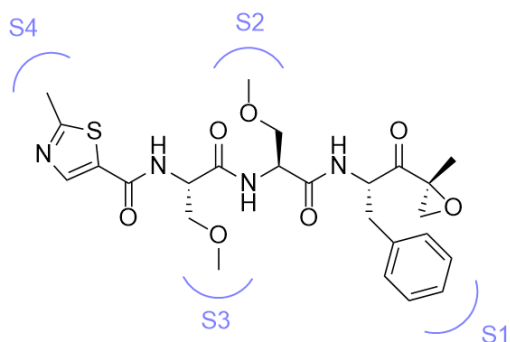
1.5.1.3 Marizomib

Gre za učinkovino naravnega izvora, natančneje za β -laktonski metabolit aktinomicet *Salinospora tropica* (slika 10). Do sedaj je to zaviralec proteasoma z najnižjo molekulsko maso. Klinične študije kažejo na podaljšano ireverzibilno zaviranje proteasoma, predvsem $\beta 2$ in $\beta 5$ podenot in s tem sproženje apoptoze [7]. Učinkovit je pri levkemijah, multiplem mielomu in solidnih tumorjih, predvsem v kombinaciji z bortezomibom ali lenalidomidom. Kljub možnosti peroralne aplikacije je slabost učinkovine izjemno kratek razpolovni čas (5 min), zato je terapevtsko precej omejena, prehaja pa tudi hematoencefalno bariero [5, 7].



Slika 10: Marizomib (prirejeno po [7])

1.5.1.4 Oprozomib (ONX 0912)



Slika 11: Oprozomib (prirejeno po [7])

Spojina je strukturno tripeptidni epoksiketonski zaviralec proteasoma (slika 11), podobno kot karfilzomib. Glavna prednost pred ostalimi, prej omenjenimi učinkovinami, je možnost peroralne aplikacije. Kot monoterapija je indiciran za zdravljenje solidnih tumorjev in hematoloških neoplazem, hkrati je močan induktor apoptoze v mielomskih celicah [7].

Iz strukture vidimo, da ima spojina fenilni obroč, ki predstavlja P1-stransko verigo, ki se lepo prilega S1-žepku. Z različnimi afinitetama se veže tako na $\beta 5i$, kot tudi na $\beta 5c$ podenoto proteasoma. Razlog za afiniteto do obeh podenot je ta, da je S3-žepak na $\beta 5i$ podenoti manjši od tistega na $\beta 5c$ podenoti, zato predstavlja P3 Ser(OMe) ostanek sterično oviro za vezavo v S3-žepak podenote $\beta 5i$. Se pa P3 izjemno lepo prilega v S3-žepak $\beta 5c$ podenote. Iz tega lahko povzamemo, da sta tako selektivnost kot afiniteta odvisna od vsote ugodnih in neugodnih interakcij P-verig z S-žepki [7].

1.5.2 SELEKTIVNI ZAVIRALCI IMUNOPROTEASOMA

Imunoproteasom se v večji meri izraža pri malignih celicah hematološkega izvora, pri ostalih pa bistveno manj. Glavna prednost selektivnega ciljanja imunoproteasoma je zmanjšanje resnih neželenih učinkov, kot so periferne nevropatije in gastrointestinalne težave. Ugotovili so tudi, da večje izražanje imunoproteasoma pripomore k večji odzivnosti levkemičnih celic na zaviralce. Zato raziskovalci usmerjajo svoje raziskave v razvoj učinkovin, ki so kovalentni in nekovalentni zaviralci ter selektivno zavirajo imunoproteasom [5].

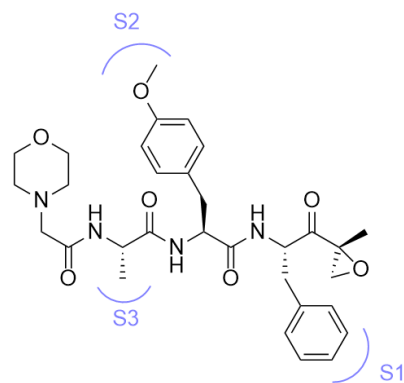
S kovalentnimi ireverzibilnimi zaviralci dosežemo ustrezno zaviranje imunoproteasoma, učinek pa je daljši kot pri reverzibilnih, pri katerih je vez šibkejša. Kovalentna vez se lahko tvori le na majhnih razdaljah, zato so tovrstni zaviralci bolj selektivni od nekovalentnih, pri katerih pride do povezave na večjih razdaljah. To lahko pomeni večjo verjetnost neselektivne vezave. Po drugi strani pa so kovalentni zaviralci zaradi svoje elektrofilne narave zelo reaktivni, kar tudi lahko privede do neselektivnosti in nespecifičnosti ter večje

verjetnosti za pojav toksičnih učinkov (na primer hepatotoksičnost, hipersenzitivnostne reakcije). Zato želimo, da imajo kovalentni zaviralci veliko afiniteto do želenega vezavnega mesta. Ti predstavljajo prednost pred nekovalentnimi, ker so bolj učinkoviti že pri nižjih odmerkih, zaradi mehanizma delovanja pa je pogostost aplikacije manjša kot pri nekovalentnih, kar posledično vodi v večjo complianco pacienta. Poleg naštetega, pa je prednost tudi manjše tveganje za razvoj rezistence na učinkovino [17, 18, 19]. Znano je, da se mora spojina sprva vezati v aktivno mesto reverzibilno (nekovalentno), šele nato pride do interakcije med elektrofilno »glavo« in Thr1 ter do podaljšanega zaviranja [10, 19]. Pri tem je pomembna lipofilnost molekule. Odkrili so, da so za vezavo na $\beta 5i$ podenoto pomembni lipofilni aminokislinski ostanki v molekuli, za razliko od preostalih podenot, pri katerih je preferenca drugačna. Za vezavo v S1 žep je ključen večji lipofilen fragment (na primer fenil), za interakcijo s Thr1 pa elektrofilni element.

V nadaljevanju so opisane le najpomembnejše učinkovine, ki so selektivni zaviralci imunoproteasoma.

1.5.2.1 ONX 0914

Učinkovina je prvi sintetizirani selektivni zaviralec $\beta 5i$ podenote, strukturno $\alpha'\beta'$ -epoksiketon (slika 12). S selektivnim in ireverzibilnim ciljanjem iCP zmanjšamo tvorbo vnetnih mediatorjev citokinov (IL-6, IL-23) in TNF- α , prav tako pa upočasnimo diferenciacijo Th1 in Th17 celic, ki so odgovorne za pojav avtoimunskih bolezni. Učinkovina zmanjša nastajanje MHC I receptorjev na površini celic do 50 % in prav tako



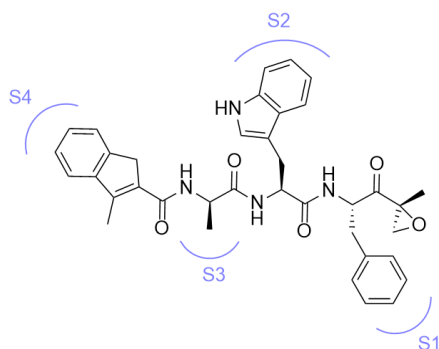
Slika 12: ONX 0914 (prirejeno po [7])

nastanek peptidov, ki se vežejo na MHC I. S tem se regulira odziv citotoksičnih T-celic, kar se je izkazalo za učinkovito pri zmanjšanju napredovanja vnetnih bolezni, kot so revmatoidni artritis, SLE in ulcerozni kolitis. Ugodna lastnost spojine je učinkovitost že v zelo majhnih koncentracijah, ki so še daleč od najvišje sprejemljive koncentracije [7].

Vzrok za selektivnost učinkovine je razlika v velikosti S1-žepa pri $\beta 5i$ in $\beta 5c$ podenoti. $\beta 5i$ podenota ima večji S1-žep kot $\beta 5c$ zaradi različne orientiranosti ostanka Met45. Reakcija ONX 0914 s Thr1 konstitutivnega proteasoma povzroči translokacijo Met45 in še

nekatero druge strukturne spremembe, kar privede do steričnih ovir pri vezavi učinkovine v S1-žep. Zato je učinkovina bolj selektivna za iCP. Z β -laktonskimi zaviralci, ki vsebujejo na P1 voluminozen in rigiden fenilni fragment, so pokazali, da se zmanjša inhibicijska aktivnost na cCP in yCP. Za β 5i selektivnost je potreben P1 aromatski obroč in P3 malo bolj polaren fragment [7].

1.5.2.2 PR-924

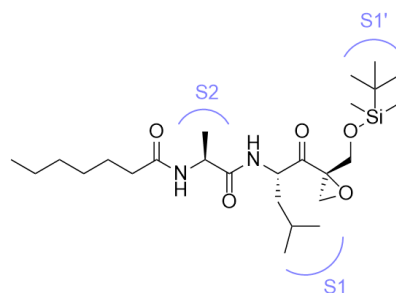


Slika 13: PR-924 (prirejeno po [7])

Poleg prejšnje učinkovine je tudi ta spojina selektivna za zaviranje β 5i podenote. Kemijsko gre za derivat epoksiketona (slika 13). Izkazal se je za selektivnega in učinkovitega pri uničenju celic multiplega mieloma [7].

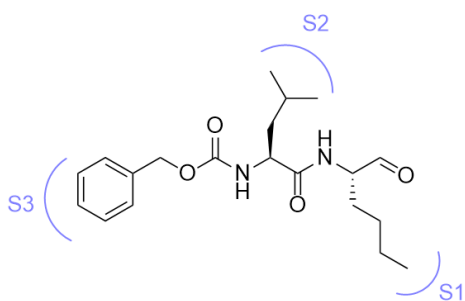
1.5.2.3 UK-101

Spojina je prvi zaviralec β 1i podenote (slika 14), strukturno pa je podobna dihidroeponeomicinu. Učinkuje predvsem na tumorske celice prostate, ki imajo prekomerno izraženo omenjeno podenoto. Za delovanje je potrebna dolga lipofilna heptanojska veriga na P3 mestu [7].



Slika 14: UK-101 (prirejeno po [7])

1.5.2.4 IPSI-001

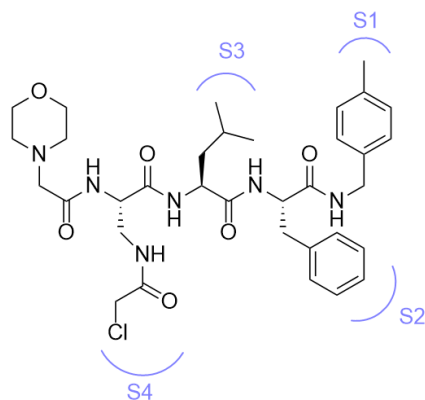


Slika 15: IPSI-001 (prirejeno po [7]) [7].

Zaviralec selektivno cilja β 1i podenoto, in sicer 100-krat močnejše kot β 1c. Je peptidni zaviralec z aldehydno skupino (slika 15). Sproži apoptozo hematoloških tumorskih celic, ki prekomerno izražajo iCP, pokazal pa se je za bistveno manj toksičnega za zdrave celice kot ostale učinkovine [7].

1.5.2.5 1-CA

Spojina 1-CA (slika 16) ima podoben peptidni skelet kot prvi selektivni zaviralec ONX 0914. Zanj je značilen α -kloroacetamidni fragment, ki vsebuje močan elektrofilni center. Deluje kot kovalentni zaviralec, ki selektivno cilja $\beta 5i$ podenoto imunoproteasoma, in sicer devetkrat bolj kot konstitutivno podenoto $\beta 5c$ [20].



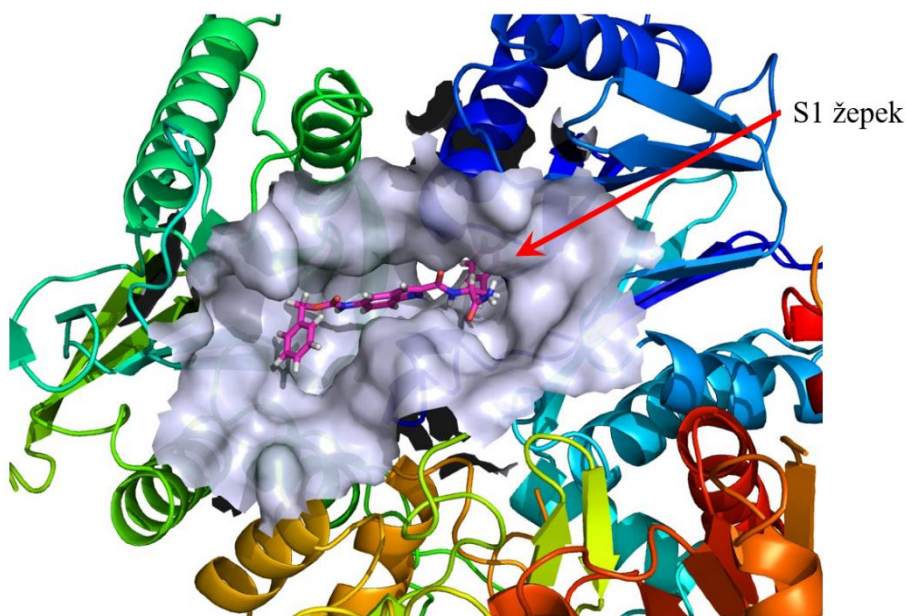
Slika 16: 1-CA (prirejeno po [20])

2 NAMEN IN POTEK DELA

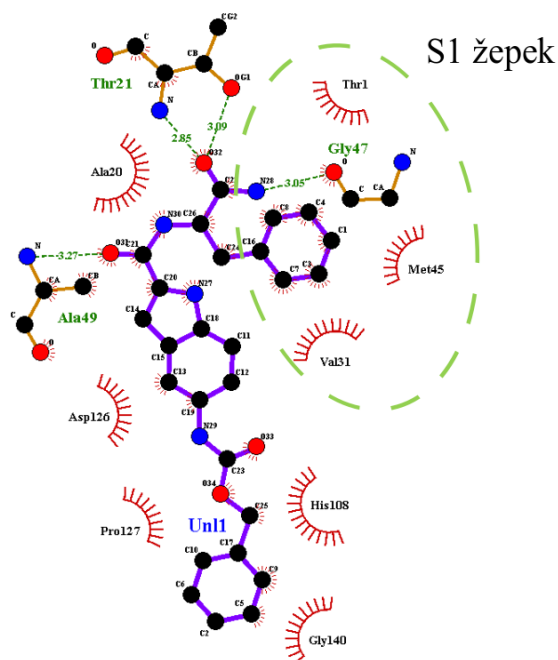
Za zdravljenje avtoimunih, vnetnih in rakavih bolezni so raziskovalci do sedaj razvili številne spojine, ki zavirajo imunoproteasom. Večinoma so peptidne strukture in posnemajo aminokisline, ki so sestavni del proteinov in se vežejo v imunoproteasom. Z metabolnega vidika te učinkovine niso najprimernejše za peroralno uporabo, ker dosegajo zelo slabo biološko uporabnost in imajo kratek razpolovni čas [21]. Primerne so le za parenteralno aplikacijo.

Namen magistrske naloge je sinteza nepeptidnih kovalentnih in nekovalentnih zaviralcev imunoproteasoma, ki bi bili selektivni in bi zavirali predvsem $\beta 5i$ -podenoto. S selektivnostjo bi zmanjšali pojav neželenih učinkov, ki so velika težava pri že sintetiziranih neselektivnih učinkovinah, ki se uporabljajo v *materii medici*.

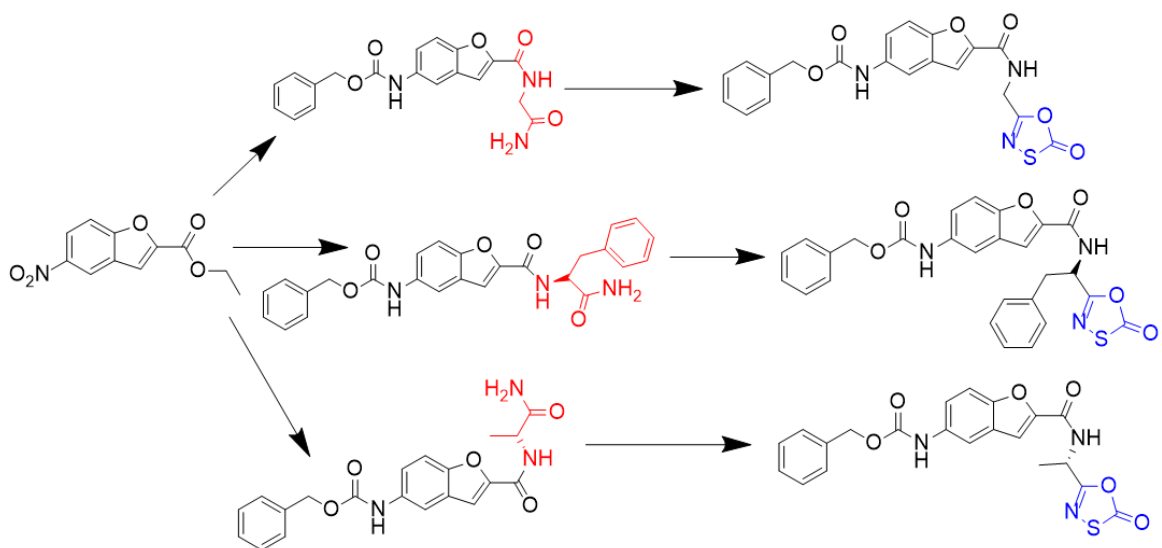
Razviti želimo spojine, ki bi se dobro prilegale v aktivno mesto imunoproteasoma (sliki 17, 18). Strukturne zahteve smo ugotovili z molekulskim sidranjem načrtovanih spojin v vezavno mesto konstitutivnega proteasoma. Ker ima le-ta manjše aktivno mesto od imunoproteasoma in predstavlja večjo oviro za vezavo spojin, smo ga izbrali za *in silico* testiranje.



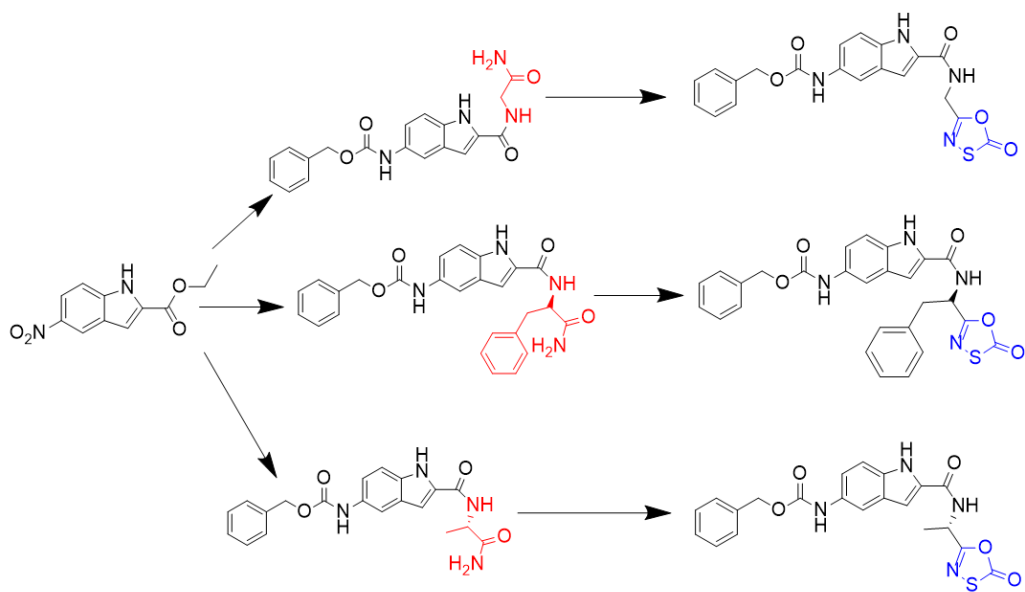
Slika 17: prikaz vezave sintetizirane spojine 18 v aktivno mesto imunoproteasoma ($\beta 5i$)



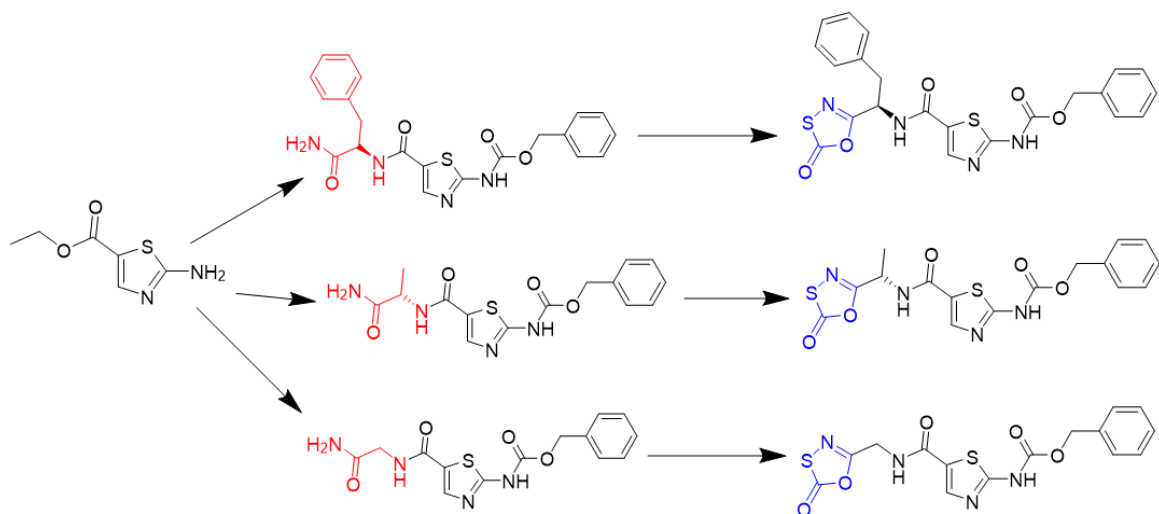
SINTEZNI NAČRT:



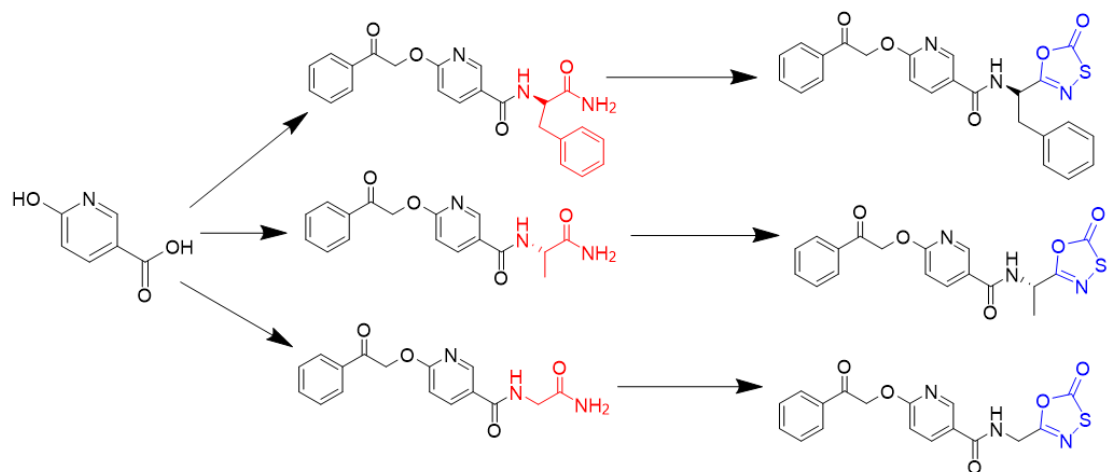
Slika 20: poenostavljena shema sinteze derivatov 1,3,4-oksatiazol-2-ona benzofuranskega tipa



Slika 21: poenostavljena shema sinteze derivatov 1,3,4-oksatiazol-2-ona indolnega tipa



Slika 22: poenostavljena shema sinteze derivatov 1,3,4-oksatiazol-2-ona tiazolnega tipa



Slika 23: poenostavljena shema sinteze derivatov 1,3,4-oksatiazol-2-ona piridinskega tipa

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

REAGENTI IN TOPILA:

Pri delu smo uporabljali topila in reagente različnih proizvajalcev, in sicer Sigma-Aldrich, Acros Organics, TCI, Apollo Scientific, Merck, Carlo Erba, Fluka, Panreac in AK Scientific. Vsi so bili ustrezne čistosti. Brezvodna topila smo pridobili z ustrežno metodo destilacije tik pred uporabo in jih shranjevali nad molekularnimi siti velikosti 4 Å. Uporabljali smo brezvodni THF, DMF, MeOH, trietilamin in acetonitril. Pri vseh postopkih sinteze in izolacije smo uporabili prečiščeno vodo.

LABORATORIJSKA OPREMA:

- magnetno mešalo IKAMAG® RET
- magnetno mešalo MM-510 Tehnica-Železniki
- tehnika SARTORIUS® MC1 Laboratory LC 620S
- UV svetilka CAMAG UV-cabinet II ($\lambda = 254\text{nm} / 366\text{ nm}$)
- rotavapor BÜCHI® R-111 Waterbath B-461

3.2 METODE

KROMATOGRAFSKE METODE:

Tankoplastna kromatografija (TLC):

TLC smo uporabljali za spremljanje poteka reakcij, identifikacijo in ugotavljanje čistosti produkta. Metodo smo uporabili tudi med kolonsko kromatografijo za identifikacijo eluirane spojine. Kot stacionarno fazo smo uporabili aluminijaste ploščice z nanešenim silikagelom proizvajalca Merck, TLC Silica gel 60 F254 z 0,2 mm debelim nanosom. Silikagelu je bil dodan fluorescenčni indikator. Kot mobilno fazo smo najpogosteje uporabljali kombinacijo EtOAc in heksana v različnih razmerjih (1:1, 1:2 in 1:3), čisti EtOAc in tudi kombinacije MeOH ter CH_2Cl_2 . Za detekcijo spojin na TLC ploščicah smo uporabljali UV svetilko pri valovni dolžini 254 nm, kot orositvene reagente pa ninhidrin, bromkrezolno zeleno, FeCl_3 in 2,4-dinitrofenilhidrazin. Končnim spojinam smo določili retencijski faktor (R_f).

Kolonska kromatografija:

Uporabljali smo jo kot separacijsko tehniko za čiščenje končnih spojin. Kolone, ki smo jih uporabljali so bile različnih dolžin in širin, odvisno od mase vzorca. Silikagel, ki smo ga uporabljali kot stacionarno fazo je bil proizvajalca Merck, Silica Gel 60 z velikostjo delcev 0,040-0,063 mm. Mobilne faze, ki smo jih uporabljali, so bile čisti EtOAc in zmesi EtOAc in heksana v različnih razmerjih (1:1, 1:2 in 1:3). Najustreznejšo mobilno fazo smo predhodno določili s pomočjo TLC in izračunom R_f . Pretok mobilne faze smo povečali z uvajanjem zračnega tlaka na kolono s pomočjo črpalke (*»flash« kromatografija*). Frakcije, ki so vsebovale našo končno spojino, smo združili in jim uparili topilo ter identiteto potrdili s spektroskopskimi metodami.

SPEKTROSKOPSKE METODE:

Jedrska magnetna resonanca (NMR):

^1H in ^{13}C spektri so bili posneti na spektrometru Bruker Avance DPX, 400 MHz na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Vzorci so bili raztopljeni v devteriranem topilu DMSO- d_6 , kot interni standard pa je bil uporabljen tetrametilsilan (TMS). Kemijski premiki (δ) so podani v ppm, sklopitvene konstante (J) pa v Hz.

Masna spektrometrija (MS):

Spektri so bili posneti na spektrometru Advion expression L na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Uporabljena tehnika ionizacije je bila ESI (*»electrospray ionisation«*). Spektri masne spektrometrije visoke ločljivosti (HRMS) so bili posneti na spektrometru Q-TOF Premier, proizvajalca Micromass v Centru za masno spektrometrijo na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani. Uporabljena tehnika ionizacije je bila ESI.

Infrardeča spektroskopija (IR):

Spektri so bili posneti na spektrometru Perkin Elmer, Spectrum BX System FT-IR na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

DOLOČANJE TALIŠČ:

Tališče smo spojinam določili na Koflerjevem talilnem mikroskopu z ogrevalno mizico, proizvajalca Leica. Tališča so nekorrigirana.

RAČUNALNIŠKA PROGRAMSKA OPREMA:

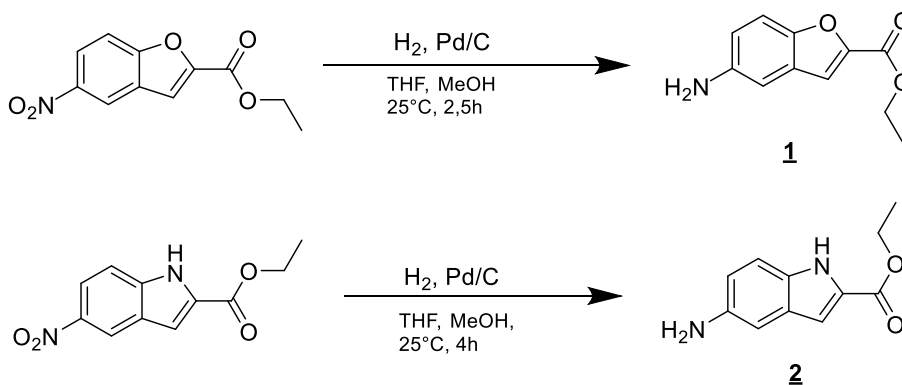
Za risanje kemijskih struktur, reakcij in poimenovanje spojin po IUPAC smo uporabili program ChemBioDraw Ultra 13.0 podjetja Perkin Elmer Informatics. Za procesiranje NMR spektrov smo uporabili program MestReC 4.8.6.0 podjetja Mestrelab Research SL. Sintezne postopke smo iskali s pomočjo programa SciFinder Scholar, znanstvene članke pa s pomočjo brskalnika ScienceDirect. Molekulsko sidranje smo izvedli s programom OEDocking 3.2.0.2 (OpenEye Scientific Software, Inc., Santa Fe, NM, USA).

4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 SINTEZA IZHODNIH SPOJIN ZA VEZAVO AMINOKISLINSKIH AMIDOV

4.1.1 Sinteza etil 5-aminobenzofuran-2-karboksilata (**1**) in etil 5-amino-*1H*-indol-2-karboksilata (**2**)

Reakciji:



Sintezni postopek:

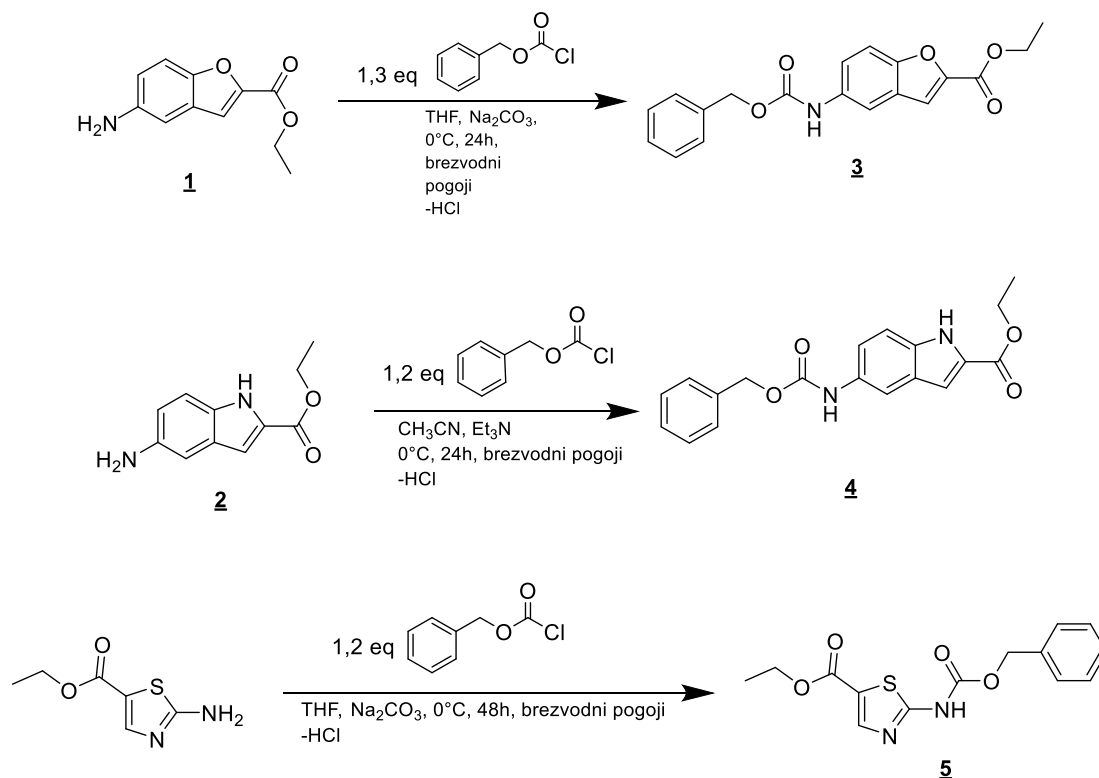
V bučki smo natehtali 1,007 g (4,25 mmol) etil 5-nitrobenzofuran-2-karboksilata in 1,009 g (4,27 mmol) etil 5-nitro-1*H*-indol-2-karboksilata. V vsako smo dodali 60 mL brezvodnega MeOH in 20 mL brezvodnega THF. Zaprli smo jih s septumom in uvajali 3 balone argona s pomočjo igle, da smo zagotovili inertno atmosfero. Ob konstantnem mešanju na magnetnem mešalu smo dodali približno 10 mg Pd/C, ki je služil kot katalizator. Za tem smo ponovno uvedli v sistem še 1 balon argona ter začeli previdno uvajati vodik in potek reakcije ves čas spremljali s TLC. Po končani reakciji smo Pd odfiltrirali in uparili topilo. V obeh primerih smo dobili temno olje, ki se je strdilo preko noči.

Tabela 1: lastnosti spojin 1 in 2

Spojina <u>1</u>	
Molekulska formula	C ₁₁ H ₁₁ NO ₃
Molekulska masa	205,21 g/mol
Izkoristek	879 mg, η = 100 % (rezultat nepopolnega sušenja)
Rf	0,22 (MF = heksan:EtOAc = 3:1)
Izgled	temna oljnata tekočina
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 1.32 (t, J = 6.8 Hz, 3H, CH ₂ -CH ₃), 4.33 (q, J = 7.2 Hz, 2H, CH ₂ -CH ₃), 5.08 (br, 2H, NH ₂), 6.80 (t, J = 1.2 Hz, 1H, Ar-H), 6.83 (d, J = 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.38 (td, J_1 = 8.0 Hz, J_2 = 1.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.51 (d, J = 1.2 Hz, 1H, Ar-H)
MS (ESI+)	m/z = 205.91 [M+H] ⁺ , 177.91 (100 %)
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 582, 658, 765, 1023, 1153, 1217, 1330, 1371, 1556, 1704, 3358, 3434
Spojina <u>2</u>	
Molekulska formula	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂
Molekulska masa	204,20 g/mol
Izkoristek	812 mg, η = 93 %
Rf	0,09 (MF = heksan:EtOAc = 3:1)
Izgled	temna oljnata tekočina
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 1.33 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH ₂ -CH ₃), 4.30 (q, J = 7.2 Hz, 2H, CH ₂ -CH ₃), 4.90 (br, 2H, NH ₂), 6.70 (dd, J_1 = 9.6 Hz, J_2 = 2.0 Hz, 2H, Ar-H), 6.84 (d, J = 2.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.17 (d, J = 8.4 Hz, 1H, Ar-H), 11.41 (s, 1H, NH-indol)
MS (ESI)	m/z = 205.09 [M+H] ⁺ , 191.05 (100 %)
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 504, 597, 769, 869, 1023, 1173, 1251, 1339, 1528, 1676, 3325

4.1.2 Sinteza etil 5-(((benziloksi)karbonil)amino)benzofuran-2-karboksilata (**3**), etil 5-(((benziloksi)karbonil)amino)-1*H*-indol-2-karboksilata (**4**) in etil 2-(((benziloksi)karbonil)amino)tiazol-5-karboksilata (**5**)

Reakcije:



Sintezni postopek:

V bučke smo natehtali 422 mg (2,056 mmol) spojine **1**, 500 mg (2,449 mmol) spojine **2** in 1,000 g (5,807 mmol) etil 2-amino-1,3-tiazol-5-karboksilata. V primeru sinteze spojin **3** in **5** smo dodali Na₂CO₃ (2 eq) za nevtralizacijo sproščene kisline in bučki prepihovali z argonom (15 min), da smo zagotovili inertne pogoje. Nato smo skozi septum z iglo dodali 30 mL brezvodnega THF in za tem še benzil kloroformat; v primeru spojine **3** 0,382 mL (2,674 mmol, 1.3 eq), v primeru spojine **5** pa 1 mL (6,994 mmol, 1.2 eq). V primeru benzofuranskega derivata se je reakcijska zmes obarvala vinsko rdeče, v primeru tiazola pa svetlo rumeno. Pri sintezi spojine **4** smo skozi septum dodali 20 mL brezvodnega acetonitrila, 2 mL (14,340 mmol) Et₃N in nato še 0,420 mL (2,938 mmol, 1.2 eq) benzil

kloroformata. Reakcijska zmes je bila oranžnorjave barve. Vse reakcije smo izvajali na ledu pri 0 °C ob konstantnem mešanju na magnetnem mešalu in brezvodnih pogojih.

Izolacija spojine 3:

Pod znižanim tlakom smo uparili THF in dobili trden vijoličen zaostanek. Raztopili smo ga v 25 mL EtOAc, prenesli v lij ločnik in ekstrahirali z 1 M HCl (1 x 10 mL). Organsko fazo smo nato sprali s 15 mL destilirane vode in nato še z nasičeno raztopino NaCl (1 x 15 mL). Na koncu smo dodali sušilno sredstvo Na₂SO₄. Po uparevanju topila smo dobili temno rdeč oljnat zaostanek, ki smo ga očistili s kolonsko kromatografijo (MF = heksan:EtOAc = 3:1). Končni produkt je bela kristalinična spojina 3.

Izolacija spojine 4:

Pod znižanim tlakom smo uparili acetonitril in dobili oranžnorjav kristaliničen zaostanek, ki smo ga raztopili v 100 mL CH₂Cl₂ in prenesli v lij ločnik. Organsko fazo smo ekstrahirali s citronsko kislino (2 x 50 ml), nato z nasičeno raztopino NaHCO₃ (1 x 50 mL) in na koncu še z nasičeno raztopino NaCl (1 x 20 mL). Za tem smo dodali Na₂SO₄. Po uparevanju topila smo dobili rjavo oborino, ki je bila spojina 4.

Izolacija spojine 5:

Topilo smo uparili do suhega in preostanek v bučki raztopili v 25 mL EtOAc. Ekstrahirali smo z destilirano vodo (1 x 20 mL), pri čemer je izpadla bela oborina (5), ki smo jo odfiltrirali.

Tabela 2: lastnosti spojin 3, 4 in 5

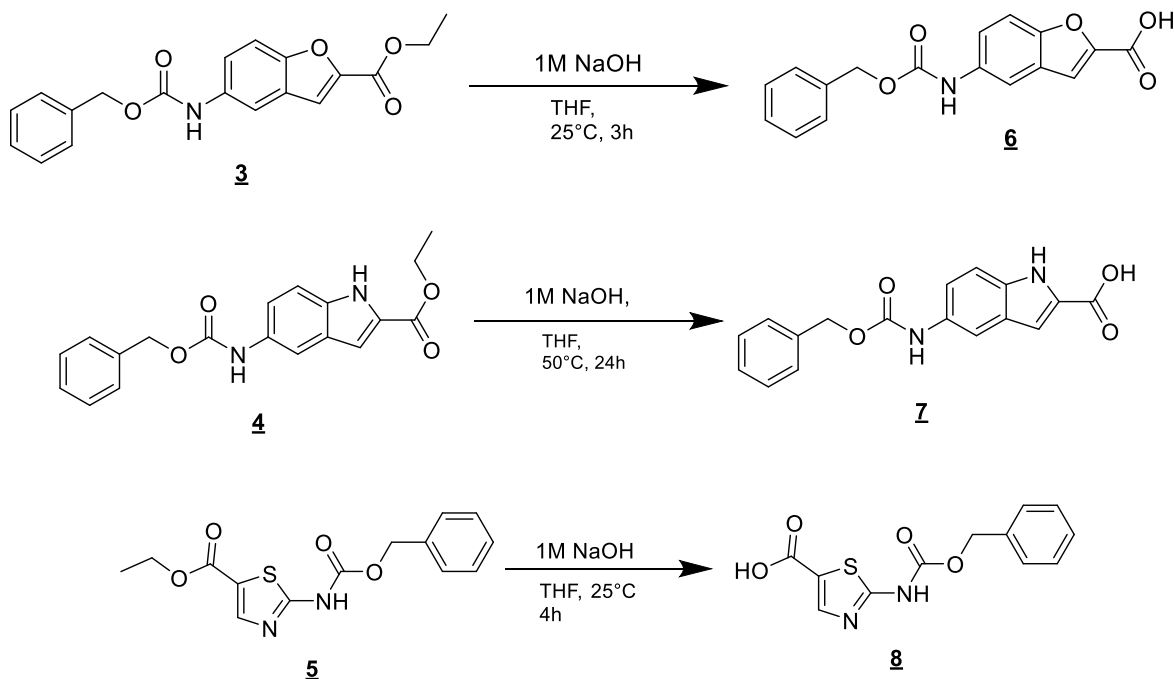
Spojina <u>3</u>	
Molekulska formula	C ₁₉ H ₁₇ NO ₅
Molekulska masa	339,35 g/mol
Izkoristek	537 mg, η = 77 %
R_f	0,47 (MF = heksan:EtOAc = 3:1)
Izgled	beli kristali
Tališče	84-88 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ [ppm] = 1.33 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H, CH ₂ -CH ₃), 4.36 (q, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H, CH ₂ -CH ₃), 5.18 (s, 2H, O-CH ₂), 7.33-7.46 (m, 5H, Ar-H), 7.51 (dd, <i>J</i> ₁ = 9.2 Hz, <i>J</i> ₂ = 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.64 (br, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.75 (d, <i>J</i> = 0.8 Hz, 1H, Ar-H), 8.00 (rs, 1H, Ar-H), 9.92 (s, 1H, NH)
MS (ESI+)	m/z = 362.13 [M+Na] ⁺ , 394.13 (100 %)
IR (KBr)	ν [cm⁻¹] = 735, 760, 1156, 1218, 1294, 1541, 1578, 1694, 1723, 3364
Spojina 4	
Molekulska formula	C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₄
Molekulska masa	338,36 g/mol
Izkoristek	672 mg, η = 81 %
Rf	0,88 (MF = heksan:EtOAc = 1:1)
Izgled	rjava oborina
Tališče	144-148 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ [ppm] = 1.30 (t, 3H, CH ₂ -CH ₃), 4.34 (q, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H, CH ₂ -CH ₃), 5.15 (s, 2H, O-CH ₂), 7.08 (dd, <i>J</i> ₁ = 2.0 Hz, <i>J</i> ₂ = 0.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.23-7.46 (m, 7H, Ar-H), 7.82 (br, 1H, Ar-H), 9.63 (br, 1H, NH), 11.79 (s, 1H, NH-indol)
MS (ESI+)	m/z = 361.23 [M+Na] ⁺ , 393.24 (100 %)
IR (KBr)	ν [cm⁻¹] = 552, 573, 671, 740, 770, 1022, 1064, 1177, 1230, 1248, 1453, 1541, 1686, 2361, 2974, 3328
Spojina 5	
Molekulska formula	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₄ S
Molekulska masa	306,34 g/mol
Izkoristek	1,849 g, η = 104 % (rezultat nepopolnega sušenja)
Rf	0,35 (MF = heksan:EtOAc = 3:1)
Izgled	bela oborina
Tališče	194-199 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ [ppm] = 1.29 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H, CH ₂ -CH ₃), 4.27 (q, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H, CH ₂ -CH ₃), 5.27 (s, 2H, O-CH ₂), 7.37-7.46 (m, 5H, Ar-H), 8.08 (s, 1H, Ar-H), 12.41 (s, 1H, NH)
MS (ESI+)	m/z = 329.13 [M+Na] ⁺ , 463.12 (100 %)
IR (KBr)	ν [cm⁻¹] = 735, 750, 1023, 1066, 1171, 1304, 1526, 1715, 1728, 2732, 2989

4.1.3 Sinteza 5-(((benziloksi)karbonil)amino)benzofuran-2-karboksilne kisline (**6**), 5-(((benziloksi)karbonil)amino)-1*H*-indol-2-karboksilne kisline (**7**) in 2-(((benziloksi)karbonil)amino)tiazol-5-karboksilne kisline (**8**)

Reakcije:



Sintezni postopek:

V bučke smo natehtali 343 mg (1,011 mmol) spojine **3**, 175 mg (5,713 mmol) spojine **5** in 406 mg (1,200 mmol) spojine **4**. V bučki s spojinama **3** in **5** smo dodali 20 mL THF, da se je vse raztopilo in nato še 1M NaOH (10 mL, 249,9 mmol). V prvem primeru se je reakcijska zmes obarvala svetlo rumeno, v drugem pa je bila brezbarvna. V bučko s

spojino **4** smo dodali 20 mL THF in reakcijsko zmes ohladili na ledu. Nato smo dodali še 1M NaOH (15 mL, 374,9 mmol) in nastala je raztopina rjave barve. Sintezo spojin **6** in **8** smo izvajali pri sobni temperaturi, spojine **7** pa pri povišani (50 °C). Reakcijo smo pustili potekati čez noč.

Izolacija spojin **6** in **8**:

Po končani reakciji smo THF uparili pod znižanim tlakom in dobili bel preostanek. Dodali smo 10 mL destilirane vode in nakisali s koncentrirano HCl, pri čemer je izpadla bela oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesalno erlenmajerico in s TLC potrdili, da gre za čisti spojin **6** in **8**.

Izolacija spojine **7**:

Pod znižanim tlakom smo uparili THF in dobili rjavo svetlečo oborino, ki smo jo odfiltrirali. Matičnico smo nakisali s koncentrirano HCl in izpadla je rjava oborina, ki smo jo prav tako odfiltrirali. Produkt reakcije **7** je bila oborina, ki je nastala v začetnem procesu uparivanja.

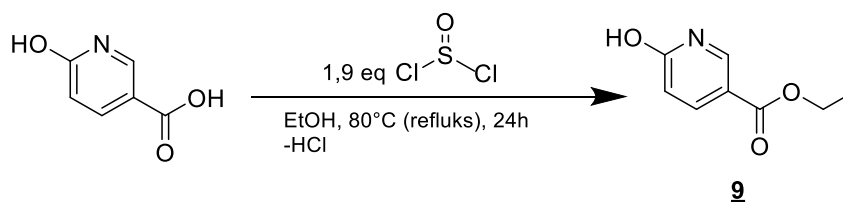
Tabela 3: lastnosti spojin **6**, **7** in **8**

Spojina 6	
Molekulska formula	C ₁₇ H ₁₃ NO ₅
Molekulska masa	311,29 g/mol
Izkoristek	284 mg, η = 90 %
Rf	0 (MF = heksan:EtOAc = 1:1)
Izgled	bela oborina
Tališče	> 300 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ [ppm] = 5.17 (s, 2H, O-CH ₂), 7.33-7.50 (m, 6H, Ar-H), 7.60-7.65 (m, 2H, Ar-H), 7.96 (br, 1H, Ar-H), 9.91 (s, 1H, NH), 13.53 (br, 1H, COOH)
MS (ESI+)	m/z = 312.27 [M+H] ⁺ , 299.32 (100 %)
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 656, 695, 705, 745, 1175, 1211, 1524, 1581, 1691, 1723, 2361, 2569, 2917
Spojina 7	
Molekulska formula	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₄

Molekulska masa	310,31 g/mol
Izkoristek	270 mg, $\eta = 73 \%$
Rf	0,77 (MF = EtOAc + 5 gtt AcOH)
Izgled	rjava svetleča oborina
Tališče	> 300 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ [ppm] = 5.13 (s, 2H, O-CH ₂), 6.43 (s, 1H, Ar-H), 7.06 (d, $J = 0.4$ Hz, 1H, Ar-H), 7.17-7.24 (m, 1H, Ar-H), 7.30-7.45 (m, 5H, Ar-H), 7.58 (br, 1H, Ar-H), 9.40 (br, 1H, NH), 10.70 (br, 1H, NH)
MS (ESI-)	$m/z = 309.4$ [M-H] ⁻ , 130.21 (100 %)
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 563, 607, 659, 731, 781, 879, 1056, 1235, 1309, 1407, 1531, 1701, 3312, 3551
Spojina <u>8</u>	
Molekulska formula	C ₁₂ H ₁₀ N ₂ O ₄ S
Molekulska masa	278, 28 g/mol
Izkoristek	105 mg, $\eta = 66 \%$
Rf	0,43 (MF = EtOAc + 5gtt AcOH)
Izgled	bela oborina
Tališče	> 300°C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ [ppm] = 5.27 (s, 2H, O-CH ₂), 7.35-7.46 (m, 5H, Ar-H), 7.99 (s, 1H, Ar-H), 12.33 (br, 1H, NH), 13.12 (br, 1H, OH)
MS (ESI-)	$m/z = 277.02$ [M-H] ⁻ , 174.95 (100 %)
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 513, 694, 705, 743, 810, 1059, 1173, 1206, 1303, 1522, 1578, 1688, 1721, 2577, 2694, 3035

4.1.4 Sinteza etil 6-hidroksinikotinata (9)

Reakcija:



Sintezni postopek:

V bučko smo natehtali 3,000 g (21,57 mmol) 6-hidroksinikotinske kisline in dodali 100 mL brezvodnega EtOH. Pri tem je nastala bela suspenzija. Bučko smo dali na magnetno mešalo, dodali 3 mL (41,13 mmol, 1.9 eq) tionil klorida in segrevali pri temperaturi 80 °C. Na vrh povratnega hladilnika smo namestili klorkalcijevo cevko, ki je preprečila dostop vlage v sistem. Opazili smo, da se kljub segrevanju še vedno ni raztopil ves izhodni reagent, zato smo dodali še 50 mL topila in po 45 min je nastala bistra brezbarvna raztopina. Reakcijo smo pustili potekati čez noč.

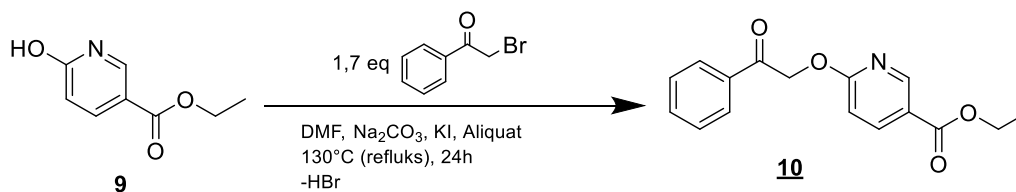
Po koncu reakcije smo uparili topilo in trdnemu preostanku dodali 120 mL EtOAc. Suspenzijo smo prenesli v lij ločnik in ekstrahirali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (3 x 50 mL), pri čemer se je večina raztopila. Nato smo organsko fazo spirali še z nasičeno raztopino NaCl (2 x 50 mL). V vodni fazi se je pojavila bela oborina. Vodno fazo smo nato reekstrahirali z EtOAc (3 x 50 mL). Organski frakciji smo dodali 50 mL nasičene raztopine NaCl in nato še sušili z Na₂SO₄. Nato smo združenim organskim fazam uparili topilo do belega zaostanka **9**.

Tabela 4: lastnosti spojine **9**

Spojina 9	
Molekulska formula	C ₈ H ₉ NO ₃
Molekulska masa	167,10 g/mol
Izkoristek	2,421 g, η = 67 %
Rf	0,52 (MF = EtOAc)
Izgled	beli kristali
Tališče	126-130 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ [ppm] = 1.27 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH ₂ -CH ₃), 4.23 (q, J = 7.2 Hz, 2H, CH ₂ -CH ₃), 6.37 (d, J = 9.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.79 (dd, J ₁ = 9.6 Hz, J ₂ = 2.8 Hz, 1H, Ar-H), 8.03 (d, J = 2.8 Hz, 1H, Ar-H), 12.14 (br, 1H, OH)
MS (ESI+)	m/z = 168.06 [M+H] ⁺ , 437.13 (100 %)
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 627, 659, 775, 1104, 1116, 1266, 1295, 1594, 1671, 2694, 2759, 2982

4.1.5 Sinteza etil 6-(2-okso-2-feniletoksi)nikotinata (**10**)

Reakcija:



Sintezni postopek:

V bučko smo natehtali 518 mg (2,992 mmol) spojine **9** in 1,024 g (5,140 mmol) 2-bromoacetofenona. Dodali smo katalizatorja Aliquat® (2 gtt) in kalijev jodid (konica spatule) ter Na₂CO₃ (506 mg, 4,770 mmol). Nato smo dodali 20 mL DMF in na oljni kopeli segrevali pri temperaturi 130 °C 24 ur. Na vrh povratnega hladilnika smo namestili klorkalcijevo cevko. Reakcijska zmes se je obarvala rumeno, po 30 minutah pa se je spremenila v temno rdečo.

Po zaključku reakcije smo uparili topilo pod znižanim tlakom in dobili temno rdeč oljnat zaostanek. Suh preostanek smo raztopili v 55 mL EtOAc in ga prenesli v lij ločnik, kjer smo izvedli ekstrakcijo z 10-odstotno raztopino citronske kisline (1 x 10 mL). V naslednji stopnji smo organsko fazo ekstrahirali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (3 x 20 mL) in na koncu še z nasičeno raztopino NaCl (1 x 30 mL). Dodali smo tudi sušilno sredstvo Na₂SO₄. Potek ekstrakcije smo spremljali s TLC. Uparili smo topilo in ponovno dobili temno rdečo oljnato tekočino. Izvedli smo kolonsko kromatografijo za čiščenje končnega produkta. Kot mobilno fazo smo uporabili heksan:EtOAc = 2:1, ki se je glede na izveden TLC izkazala za najprimernejšo. Izbranim frakcijam smo uparili topilo in dobili oranžnorjavo oborino **10**.

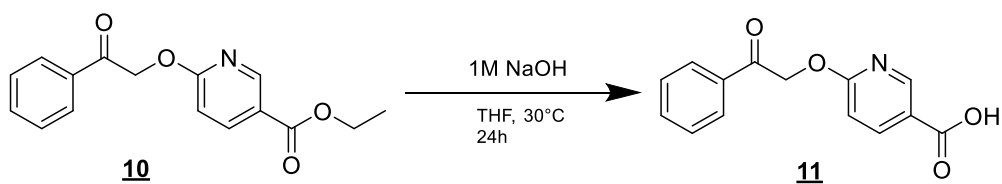
Tabela 5: lastnosti spojine **10**

Spojina 10	
Molekulska formula	C ₁₆ H ₁₅ NO ₄
Molekulska masa	285,30 g/mol
Izkoristek	592 mg, η = 67 %
R_f	0,51 (MF = EtOAc)
Izgled	oranžnorjava oborina
Tališče	122-124 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ [ppm] = 1.29 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H, CH ₂ -CH ₃), 4.26 (q, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H, CH ₂ -CH ₃), 5.63 (s, 2H, O-CH ₂), 6.50 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.56-7.66 (m, 2H, Ar-H), 7.73 (m, 1H, Ar-H), 7.88 (dd, <i>J</i> ₁ = 7.2 Hz, <i>J</i> ₂ = 2.1 Hz, 1H, Ar-H), 8.06 (m, 2H, Ar-H), 8.56 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H, Ar-H)
MS (ESI+)	m/z = 308.34 [M+Na] ⁺
IR (KBr)	ν [cm⁻¹] = 564, 641, 691, 756, 851, 1103, 1176, 1227, 1282, 1666, 1708, 2982, 3039, 3099

4.1.6 Sinteza 6-(2-okso-2-feniletoksi)nikotinske kisline (**11**)

Reakcija:



Sintezni postopek:

V bučko smo natehtali 770 mg (2,699 mmol) spojine **10** in dodali 25 mL THF ter 1M NaOH (25 mL, 624,84 mmol). Opazili smo, da se pri mešanju na sobni temperaturi ni popolnoma vse raztopilo, zato smo reakcijsko zmes segreli. Nastala je raztopina temno oranžne barve. Reakcija je potekala 24 ur pri temperaturi 30 °C. Po zaključku reakcije smo uparili topilo in dobili oranžno vodno raztopino, ki smo ji dodali 10 mL destilirane vode. Ko se je vse raztopilo, smo s koncentrirano HCl nakisali in izpadla je rumenooranžna oborina **11**, ki smo jo odfiltrirali.

Tabela 6: lastnosti spojine **11**

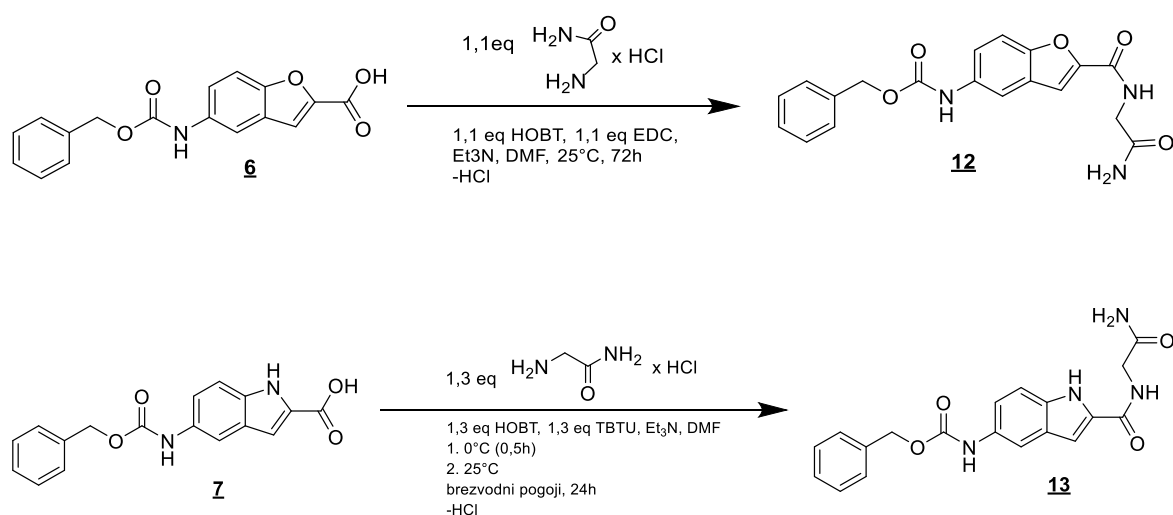
Spojina 11	
Molekulska formula	C ₁₄ H ₁₁ NO ₄
Molekulska masa	257,25 g/mol
Izkoristek	610 mg, η = 88 %
Rf	0,48 (MF = EtOAc + 5gtt AcOH)

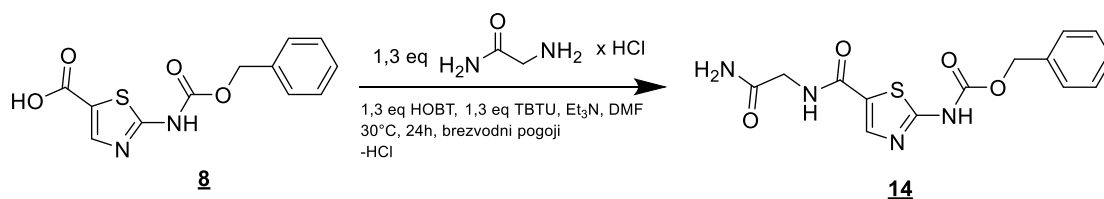
Izgled	rumenooranžna oborina
Tališče	216-223 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ [ppm] = 5.62 (s, 2H, O-CH ₂), 6.48 (d, <i>J</i> = 9.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.56-7.65 (m, 2H, Ar-H), 7.69-7.78 (m, 1H, Ar-H), 7.87 (dd, <i>J</i> ₁ = 9.6 Hz, <i>J</i> ₂ = 2.8 Hz, 1H, Ar-H), 8.06 (dd, <i>J</i> ₁ = 6.4 Hz, <i>J</i> ₂ = 1.2 Hz, 2H, Ar-H), 8.52 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz, 1H, Ar-H), 12.89 (br, 1H, OH)
MS (ESI+)	m/z = 258.24 [M+H] ⁺ , 302.26 (100 %)
IR (KBr)	ν [cm⁻¹] = 556, 632, 673, 751, 772, 1121, 1212, 1540, 1642, 1687, 1711, 2463, 2933, 3065

4.2 SINTEZA SPOJIN Z VEZANIM AMIDOM GLY, L-ALA IN L-PHE

4.2.1 Sinteza benzil (2-((2-amino-2-oksoetil)karbamoil)benzofuran-5-il)karbamata (**12**), benzil (2-((2-amino-2-oksoetil)karbamoil)-1H-indol-5-il)karbamata (**13**) in benzil (5-((2-amino-2-oksoetil)karbamoil)thiazol-2-il)karbamata (**14**)

Reakcije:





Sintezni postopek:

V bučke smo natehtali 150 mg (0,482 mmol) spojine **6**, 131 mg (0,422 mmol) spojine **7** in 860 mg (3,090 mmol) spojine **8**.

V primeru sinteze spojine **12** smo v bučko dodali glicinamid hidroklorid (0,534 mmol, 1.1 eq) in vse skupaj raztopili v 10 mL DMF. Nato smo dodali HOBT (0,470 mmol, 1.1 eq), EDC (0,423 mmol, 1.1 eq) in 0,5 mL Et₃N (3,585 mmol). Nastala je bela suspenzija, ki pa je čez čas postala bistra in brezbarvna. Reakcija je potekala 3 dni pri sobni temperaturi.

Pri sintezah spojin **13** in **14** smo reakciji izvajali v brezvodnih pogojih. K izhodnemu reagentu smo dodali glicinamid hidroklorid (1.3 eq), HOBT (1.3 eq) in TBTU (1.3 eq). Bučko z reagenti smo dobro prepihali z argonom in dodali 10 mL brezvodnega DMF v primeru sinteze **13** in 15 mL brezvodnega DMF v primeru sinteze **14**. Nato smo dodali še brezvodni Et₃N (1.3 eq). V obeh primerih je bila raztopina svetlo rumene barve. Reakcijsko zmes pri sintezi spojine **13** smo na ledeni kopeli mešali 1,5 ure, nato pa naprej pri sobni temperaturi. Sintezo spojine **14** smo ves čas izvajali pri temperaturi 30 °C ob konstantnem mešanju.

Izolacija spojine **12**:

Topilo smo uparili pod znižanim tlakom in dobili svetlo oranžno oljnato tekočino. Raztopili smo jo v 70 mL EtOAc in prenesli v lij ločnik. Dodali smo 10 mL 10-odstotne raztopine citronske kisline, raztopino kvantitativno prenesli v lij ločnik in nato izvedli ekstrakcijo organske faze s citronsko kislino (1 x 50 mL) in še z nasičeno raztopino NaHCO₃ (1 x 50 mL), pri čemer je nastala bela oborina **6**. Slednjo smo odfiltrirali in organsko fazo ekstrahirali z destilirano vodo (1 x 50 mL) ter z nasičeno raztopino NaCl (1 x 50 mL). Dodali smo sušilno sredstvo Na₂SO₄ in nato organski fazi uparili topilo. Dobili smo svetlo rumeno kristalinično substanco **12**.

Izolacija spojine **13**:

DMF smo uparili pod znižanim tlakom in dobili rumenorjavo oljnato tekočino. Dodali smo 20 mL CH₂Cl₂. Izpadla je oborina **13**, ki smo jo odfiltrirali.

Izolacija spojine **14**:

Uparili smo DMF in dobili svetlo rumeno oljnato tekočino, ki smo jo raztopili v 25 mL EtOAc in prenesli v lij ločnik. Izvedli smo ekstrakcijo z 10-odstotno raztopino citronske kisline (1 x 20 mL), pri tem pa je nastala bela oborina **14**. Organsko fazo smo ponovno ekstrahirali s citronsko kislino (1 x 20 mL) in nato še z nasičeno raztopino NaHCO₃ (3 x 15 mL). Ponovili smo ekstrakcijo organske faze tudi z destilirano vodo (1 x 15 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 x 15 mL) ter dodali sušilno sredstvo Na₂SO₄. Ponovno smo pridobili belo oborino, ki je bila spojina **14**.

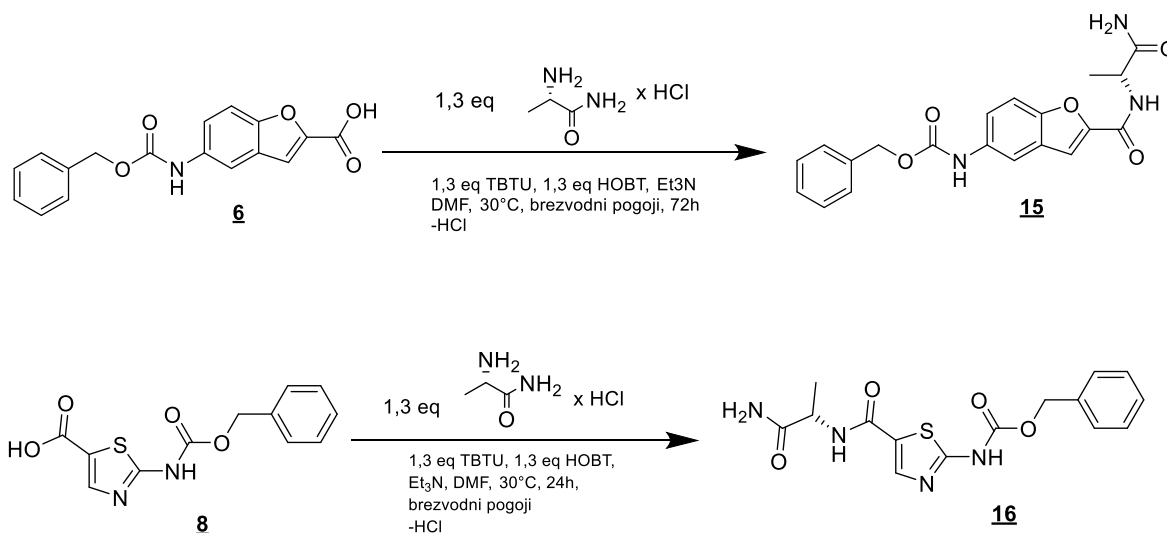
Tabela 7: lastnosti spojin **12**, **13** in **14**

Spojina 12	
Molekulska formula	C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O ₅
Molekulska masa	367,36 g/mol
Izkoristek	154 mg, η = 87 %
Rf	0,84 (MF = MeOH:EtOAc = 1:1)
Izgled	beli kristali
Tališče	190-196 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 3.82 (d, J = 6.0 Hz, 2H, NH-CH ₂), 5.18 (s, 2H, O-CH ₂), 7.10 (br, 1H, NH ₂), 7.35-7.61 (m, 9H, Ar-H), 7.94 (br, 1H, NH ₂), 8.76 (t, J = 4.0 Hz, 1H, NH-CH ₂), 9.90 (br, 1H, NH)
MS (ESI+)	m/z = 390.17 [M+Na] ⁺
HRMS (ESI-)	Izmerjen m/z = 366.1081 [M-H] ⁻ Izračunan m/z za C ₁₉ H ₁₆ N ₃ O ₅ = 366.1090 [M-H] ⁻
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 673, 740, 822, 879, 1052, 1234, 1294, 1478, 1562, 1658, 1707, 3292, 3474
Spojina 13	
Molekulska formula	C ₁₉ H ₁₈ N ₄ O ₄
Molekulska masa	366,38 g/mol

Izkoristek	122 mg, $\eta = 79 \%$
Rf	0,31 (MF = CH ₂ Cl ₂ :MeOH = 9:1)
Izgled	svetlo rjava amorfna snov
Tališče	113-115 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ [ppm] = 3.83 (s, 2H, NH-CH ₂), 5.15 (s, 2H, O-CH ₂), 7.07 (s, 2H, NH ₂), 7.21-7.45 (m, 8H, Ar-H), 7.76 (br, 1H, Ar-H), 8.65 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, NH-CH ₂), 9.58 (br, 1H, NH), 11.51 (s, 1H, NH)
MS (ESI+)	$m/z = 389.48$ [M+Na] ⁺ , 100.17 (100 %)
HRMS (ESI-)	Izmerjen $m/z = 365.1243$ [M-H] ⁻ Izračunan m/z za C ₁₉ H ₁₇ N ₄ O ₄ = 365.1250 [M-H] ⁻
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 636, 696, 739, 828, 1053, 1241, 1298, 1416, 1548, 1625, 1690, 3190, 3323, 3425
Spojina <u>14</u>	
Molekulska formula	C ₁₄ H ₁₄ N ₄ O ₄ S
Molekulska masa	334,35 g/mol
Izkoristek	745 mg, $\eta = 72 \%$
Rf	0,87 (MF = MeOH:EtOAc = 1:1)
Izgled	beli kristali
Tališče	> 300 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ [ppm] = 3.77 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, NH-CH ₂), 5.25 (s, 2H, O-CH ₂), 7.06 (br, 1H, NH), 7.35-7.46 (m, 5H, Ar-H), 8.03 (s, 1H, Ar-H), 8.69 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, NH-CH ₂)
MS (ESI+)	$m/z = 357.42$ [M+Na] ⁺ , 102.22 (100 %)
HRMS (ESI-)	Izmerjen $m/z = 333.0649$ [M-H] ⁻ Izračunan m/z za C ₁₄ H ₁₃ N ₄ O ₄ S = 333.0658 [M-H] ⁻
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 599, 629, 748, 765, 849, 1064, 1186, 1232, 1304, 1531, 1619, 1659, 1720, 2724, 3296, 3394

4.2.2 Sinteza benzil (R)-2-((1-amino-1-oksopropan-2-il)karbamoil)benzofuran-5-il)karbamata (**15**) in benzil (S)-5-((1-amino-1-oksopropan-2-il)karbamoil)tiazol-2-il)karbamata (**16**)

Reakciji:



Sintezni postopek:

V bučki smo natehtali 335 mg (1,076 mmol) spojine **6** in 826 mg (2,968 mmol) spojine **8**. V vsako smo dodali L-alaninamid hidroklorid (1.3 eq), HOBT (1.3 eq) in TBTU (1.3 eq). Nato smo ju dobro prepihali z argonom in dodali 10 mL brezvodnega DMF v primeru sinteze **15**, oziroma 15 mL v primeru sinteze **16**. Za tem smo dodali še brezvodni Et₃N (1.3 eq). V prvem primeru je bila barva reakcijske zmesi svetlo rumena, v drugem pa oranžna. Obe reakciji smo izvajali v brezvodnih pogojih pri temperaturi 30 °C. Prva reakcija je potekala 3 dni, druga pa 24 h.

Izolacija spojine **15**:

Pod znižanim tlakom smo uparili DMF do oljnatega zaostanka. Raztopili smo ga v 25 mL EtOAc, pri čemer je izpadla bela oborina (stranski produkt). Organsko fazo smo ekstrahirali z 10-odstotno raztopino citronske kisline (1 x 25 mL), nato z nasičeno raztopino NaHCO₃ (3 x 25 mL) in na koncu še z destilirano vodo (1 x 20 mL) ter nasičeno raztopino NaCl (1 x 20 mL). Organski fazi smo dodali sušilno sredstvo Na₂SO₄. Po uparevanju topila smo dobili oranžnorjavo kristalinično spojino **15**.

Izolacija spojine **16**:

Uparili smo DMF in dobili oranžen kristaliničen preostanek, ki smo ga suspendirali ter sprali s 25 mL CH₂Cl₂. Oborino smo odfiltrirali, organsko fazo pa ekstrahirali z 10-odstotno raztopino citronske kisline (1 x 20 mL), pri čemer je ponovno izpadla bela oborina, ki je bila glede na TLC nečista.

Poskus prekristalizacije:

K oborini smo dodali 7 mL MeOH in segreli, vendar se le-ta ni raztopila. Uparili smo del topila ter vsebino ohladili na sobno temperaturo. Izpadli so rumeni kristali, ki smo jih odfiltrirali z odsesavanjem in ugotovili, da ne gre za produkt. Spojina **16** je bila netopna, substanca, ki je nastala po poskusu raztapljanja in ekstrakcije.

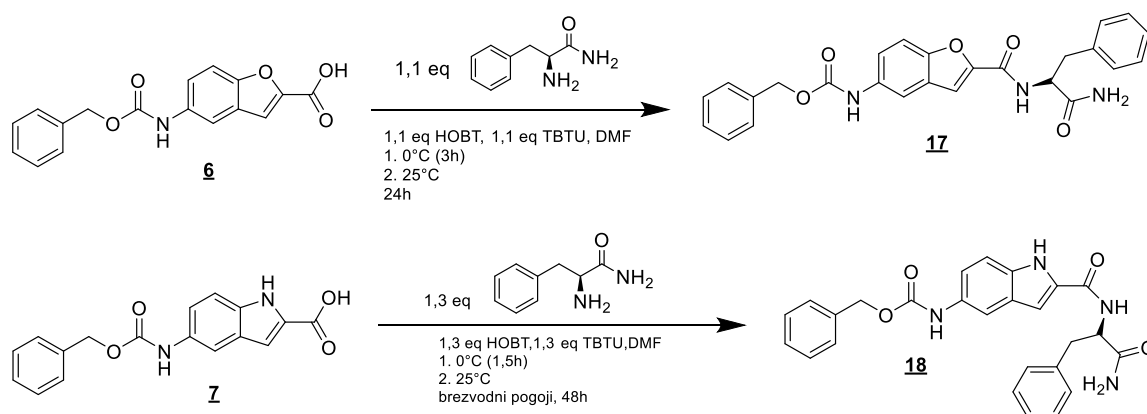
Tabela 8: lastnosti spojin **15** in **16**

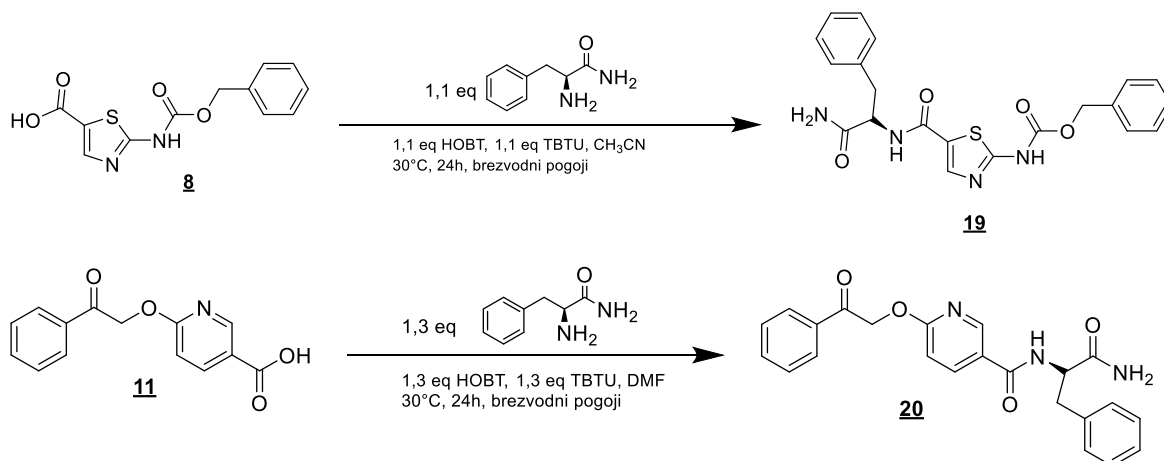
Spojina 15	
Molekulska formula	C ₂₀ H ₁₉ N ₃ O ₅
Molekulska masa	381,39 g/mol
Izkoristek	203 mg, η = 49 %
R_f	0,87 (MF = MeOH:EtOAc = 1:1)
Izgled	oranžnorjavi kristali
Tališče	173-177 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ [ppm] = 1.35 (d, J = 7.2 Hz, 3H, CH ₃ -CH), 4.41 (q, J = 7.2 Hz, 1H, CH ₃ -CH), 5.17 (s, 2H, O-CH ₂), 7.10 (br, 1H, NH ₂), 7.74-7.48 (m, 7H, Ar-H), 7.53-7.64 (m, 2H, Ar-H), 7.93 (br, 1H, NH ₂), 8.47 (d, J = 7.6 Hz, 1H, NH-CH), 9.88 (s, 1H, NH)
MS (ESI+)	m/z = 404.32 [M+Na] ⁺
HRMS (ESI-)	Izmerjen m/z = 380.1240 [M-H] ⁻ Izračunan m/z za C ₂₀ H ₁₈ N ₃ O ₅ = 380.1246 [M-H] ⁻
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 548, 695, 736, 857, 957, 1059, 1162, 1228, 1456, 1518, 1592, 1648, 2357, 3201, 3338
Spojina 16	
Molekulska formula	C ₁₅ H ₁₆ N ₄ O ₄ S
Molekulska masa	348,38 g/mol

Izkoristek	556 mg, $\eta = 54 \%$
Rf	0,80 (MF = MeOH:EtOAc = 1:2)
Izgled	umazana bela amorfna snov
Tališče	223-225 °C
^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)	δ [ppm] = 1.30 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}$), 4.36 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H, $\text{CH}_3\text{-CH}$), 5.25 (s, 2H, O- CH_2), 7.00 (br, 1H, NH_2), 7.37-7.46 (m, 6H, Ar-H, NH), 8.12 (s, 1H, Ar-H), 8.50 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, NH-CH), 12.12 (br, 1H, NH)
MS (ESI+)	$m/z = 371.47$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$
HRMS (ESI-)	Izmerjen $m/z = 347.0810$ $[\text{M-H}]^-$ Izračunan m/z za $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_4\text{S} = 347.0814$ $[\text{M-H}]^-$
IR (KBr)	ν [cm^{-1}] = 511, 572, 707, 1062, 1210, 1225, 1314, 1394, 1530, 1615, 1656, 1724, 2717, 3273

4.2.3 Sinteza benzil (R)-(2-((1-amino-1-okso-3-fenilpropan-2-il)karbamoil)benzofuran-5-il)karbamata (**17**), benzil (S)-(2-((1-amino-1-okso-3-fenilpropan-2-il)karbamoil)-1H-indol-5-il)karbamata (**18**), benzil (S)-(5-((1-amino-1-okso-3-fenilpropan-2-il)karbamoil)thiazol-2-il)karbamata (**19**) in (S)-N-(1-amino-1-okso-3-fenilpropan-2-il)-6-(2-okso-2-feniletoksi)nikotinamida (**20**)

Reakcije:





Sintezni postopek spojin **17** in **19**:

V bučki smo natehtali 134 mg (0,431 mmol) spojine **6** in 105 mg (0,377 mmol) spojine **8** ter ju raztopili v 10 mL brezvodnega DMF (**6**) in 10 mL brezvodnega acetonitrila (**8**). V vsako smo dodali L-fenilalaninamid (1.1 eq), HOBT (1.1 eq) in TBTU (1.1 eq). Reakcijo sinteze spojine **17** smo izvajali pri atmosferskih pogojih, prve 3 ure na ledu ter nato pustili, da se segreje na sobno temperaturo. Reakcijska zmes je bila bistra in svetlo rumene barve. Reakcijo sinteze spojine **19** smo izvajali v brezvodnih pogojih, kar smo zagotovili s predhodnim prepihanjem bučke z argonom. Po dodatku vseh reagentov je nastala bela suspenzija. Reakcijsko zmes smo segreli na 50 °C (1 ura), nato smo segrevanje izklopili ter pustili mešati do naslednjega dne.

Izolacija spojine **17**:

Reakcijski zmesi smo uparili topilo in dobili rumeno oljnato tekočino, ki smo jo raztopili v 20 mL EtOAc, prenesli v lij ločnik in ekstrahirali z 10-odstotno citronsko kislino (2 x 20 mL). Nato smo enako naredili še z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 x 20 mL), organsko fazo smo sprali z 20 mL destilirane vode ter sušili z 20 mL NaCl. Na koncu smo dodali Na₂SO₄. Po uparivanju topila je nastala svetlo rumena oborina, ki je bila čista spojina **17**.

Izolacija spojine **19**:

Acetonitril smo uparili pod znižanim tlakom in dobili belo oborino. Dodali smo 30 mL EtOAc, kjer se je skoraj vsa raztopila. Izvedli smo ekstrakcijo z 10-odstotno citronsko kislino (2 x 20 mL), nato z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 x 20 mL) in na koncu še z destilirano vodo (1 x 20 mL). Organsko fazo smo sušili z nasičeno raztopino NaCl (2 x 20 mL) ter Na₂SO₄. Nato smo uparili topilo do belega trdnega zaostanka **19**.

Sintezni postopek spojin **18** in **20**:

V bučki smo natehtali 217 mg (0,699 mmol) spojine **7** in 607 mg (2,360 mmol) spojine **11** ter v vsako dodali L-fenilalaninamid (1.3 eq), HOBT (1.3 eq) in TBTU (1.3 eq). Bučki smo dobro prepihali z argonom, da smo ustvarili brezvodne pogoje in dodali 10 mL (**18**), oziroma 15 mL (**20**) brezvodnega DMF. Reakcijo sinteze spojine **18** smo sprva izvajali na ledu (1,5 ure), nato pa naprej na sobni temperaturi, reakcijo sinteze spojine **20** pa ves čas pri 30 °C. V prvem primeru je bila reakcijska zmes bistra, svetlo rumene barve, v drugem pa rjave.

Izolacija spojine **18**:

Pod znižanim tlakom smo uparili DMF in dobili rjavo oljnato tekočino, ki smo jo raztopili v 20 mL EtOAc in prenesli v lij ločnik. Ekstrahirali smo najprej z 10-odstotno citronsko kislino (1 x 15 mL) in nato še z nasičeno raztopino NaHCO₃ (3 x 15 mL). Za odstranitev številnih nečistot v obliki soli smo sprali organsko fazo z destilirano vodo (1 x 15 mL) in sušili z nasičeno raztopino NaCl (1 x 10 mL). Nato smo dodali sušilno sredstvo Na₂SO₄. Po uparevanju topila smo trden zaostanek čistili s prekristalizacijo iz EtOAc do čiste spojine **18**.

Izolacija spojine **20**:

Po uparevanju topila smo dobili oranžnorjavo oljnato tekočino, ki smo jo raztopili v 20 mL EtOAc in ekstrahirali z 10-odstotno citronsko kislino (1 x 20 mL). Pri tem je izpadla bela oborina, ki smo jo odfiltrirali in shranili. Z ekstrakcijo organske faze smo nadaljevali in sicer z nasičeno raztopino NaHCO₃ (3 x 20 mL), destilirano vodo (1 x 20 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 x 20 mL). Organski fazi smo dodali tudi sušilno sredstvo Na₂SO₄. Ugotovili smo, da je bela oborina naša čista spojina **20**.

Tabela 9: lastnosti spojin **17**, **18**, **19** in **20**

Spojina 17	
Molekulska formula	C ₂₆ H ₂₃ N ₃ O ₅
Molekulska masa	443,50 g/mol
Izkoristek	188 mg, η = 95 %
R_f	0,71 (MF = EtOAc)
Izgled	rumeni kristali

Tališče	156-159 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ [ppm] = 3.03 (dd, $J_1 = 10.0$ Hz, $J_2 = 4.0$ Hz, 1H, Ar-CH ₂ -CH), 3.14 (dd, $J_1 = 13.6$ Hz, $J_2 = 4.4$ Hz, 1H, Ar-CH ₂ -CH), 4.61-4.72 (m, 1H, Ar-CH ₂ -CH), 5.17 (s, 2H, O-CH ₂), 7.14-7.52 (m, 12H, Ar-H), 7.52 (s, 1H, Ar-H), 7.54-7.63 (m, 1H, Ar-H), 7.64 (br, 1H, NH ₂), 7.92 (rs, 1H, NH ₂), 8.58 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, NH-CH-CH ₂), 9.88 (br, 1H, Ar-NH)
¹³C NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ [ppm] = 37.10, 38.83, 39.03, 39.24, 39.45, 39.66, 39.87, 40.08, 54.03, 65.74, 109.83, 111.89, 126.24, 127.28, 128.06, 128.11, 128.44, 129.10, 135.13, 136.60, 138.14, 149.21, 150.21, 153.56, 157.78, 172.70
MS (ESI+)	m/z = 480.47 [M+Na] ⁺
HRMS (ESI-)	Izmerjen m/z = 456.1553 [M-H] ⁻ Izračunan m/z za C ₂₆ H ₂₂ N ₃ O ₅ = 456.1559 [M-H] ⁻
IR (KBr)	ν [cm⁻¹] = 588, 631, 695, 731, 807, 1066, 1162, 1249, 1324, 1440, 1512, 1589, 1641, 1665, 1701, 3182, 3315
Spojina <u>18</u>	
Molekulska formula	C ₂₆ H ₂₄ N ₄ O ₄
Molekulska masa	456,50 g/mol
Izkoristek	186 mg, η = 58 %
R_f	0,79 (MF = heksan:EtOAc = 1:1)
Izgled	svetlo rjava oborina
Tališče	166-168 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ [ppm] = 2.98 (dd, $J_1 = 13.6$ Hz, $J_2 = 2.8$ Hz, 1H, Ar-CH ₂ -CH), 3.13 (dd, $J_1 = 14.0$ Hz, $J_2 = 4.4$ Hz, 1H, Ar-CH ₂ -CH), 4.64-4.72 (m, 1H, Ar-CH ₂ -CH), 5.15 (s, 2H, O-CH ₂), 7.12-7.46 (m, 14H, Ar-H), 7.60 (br, 1H, NH ₂), 7.62 (br, 1H, NH ₂), 8.48 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, NH-CH), 9.57 (br, 1H, NH), 11.41 (s, 1H, NH)
MS (ESI+)	m/z = 479.62 [M+Na] ⁺ , 299.38 (100 %)

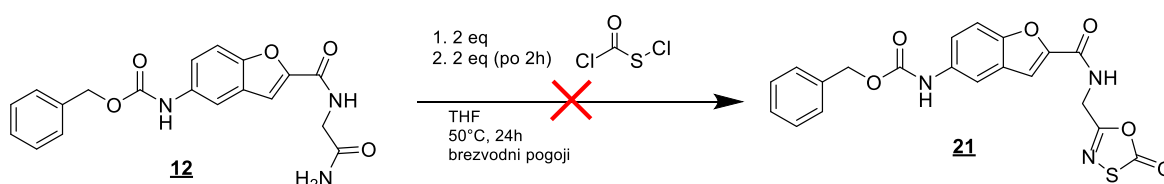
HRMS (ESI-)	Izmerjen m/z = 455.1710 [M-H] ⁻ Izračunan m/z za C ₂₆ H ₂₃ N ₄ O ₄ = 455.1719 [M-H] ⁻
IR (KBr)	ν [cm⁻¹] = 592, 696, 737, 808, 1056, 1222, 1317, 1537, 1632, 1661, 1709, 2357, 3182, 3311
Spojina <u>19</u>	
Molekulska formula	C ₂₁ H ₂₀ N ₄ O ₄ S
Molekulska masa	424,48 g/mol
Izkoristek	65 mg, η = 41 %
R_f	0,87 (MF = MeOH:EtOAc = 1:1)
Izgled	beli kristali
Tališče	> 300 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ [ppm] = 2.92 (dd, <i>J</i> ₁ = 9.2 Hz, <i>J</i> ₂ = 0.8 Hz, 1H, Ar-CH ₂ -CH), 3.08 (dd, <i>J</i> ₁ = 13.6 Hz, <i>J</i> ₂ = 4.4 Hz, 1H, Ar-CH ₂ -CH), 4.54-4.62 (m, 1H, Ar-CH ₂ -CH), 5.24 (s, 2H, O-CH ₂), 7.12-7.25 (m, 2H, Ar-H), 7.16-7.19 (m, 2H, Ar-H), 7.23-7.45 (m, 7H, Ar-H), 7.60 (br, 1H, NH), 8.09 (br, 1H, NH), 8.61 (br, 1H, NH), 12.30 (br, 1H, NH)
MS (ESI+)	m/z = 447.4 [M+Na] ⁺
HRMS (ESI-)	Izmerjen m/z = 423.1118 [M-H] ⁻ Izračunan m/z za C ₂₁ H ₁₉ N ₄ O ₄ S = 423.1127 [M-H] ⁻
IR (KBr)	ν [cm⁻¹] = 696, 745, 1060, 1224, 1312, 1531, 1626, 1666, 1727, 2921, 3190, 3281, 3372
Spojina <u>20</u>	
Molekulska formula	C ₂₃ H ₂₁ N ₃ O ₄
Molekulska masa	403,44 g/mol
Izkoristek	540 mg, η = 57 %
R_f	0,82 (MF = EtOAc:MeOH = 2:1)
Izgled	belorumeni kristali
Tališče	173-177 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ [ppm] = 2.92 (dd, <i>J</i> ₁ = 13.6 Hz, <i>J</i> ₂ = 8.8 Hz, 1H, Ar-CH ₂ -CH), 3.10 (dd, <i>J</i> ₁ = 13.6 Hz, <i>J</i> ₂ = 4.0 Hz, 1H, Ar-CH ₂ -CH), 4.59-4.65 (m, 1H, NH-CH), 5.55 (d, <i>J</i> = 3.6 Hz, 2H, O-CH ₂), 6.46 (d, <i>J</i> = 9.6 Hz, 1H, NH), 7.13 (br, 1H, NH), 7.15-7.36 (m, 4H, Ar-H), 7.56-7.65 (m, 3H, Ar-H), 7.69-7.79 (m, 1H, Ar-H), 7.96 (dd, <i>J</i> ₁ = 9.6 Hz, <i>J</i> ₂ = 2.8 Hz, 1H, Ar-H), 8.03-8.11 (m, 2H, Ar-H), 8.30 (d, <i>J</i> = 2.6 Hz, 1H, Ar-H), 8.35 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H, Ar-H), 12.26 (br, 1H, NH)
MS (ESI+)	m/z = 426.56 [M+Na] ⁺ , 234.33 (100 %)
HRMS (ESI-)	Izmerjen m/z = 402.1451 [M-H] ⁻ Izračunan m/z za C ₂₃ H ₂₀ N ₃ O ₄ = 402.1454 [M-H] ⁻
IR (KBr)	ν [cm⁻¹] = 525, 571, 664, 839, 938, 1229, 1315, 1345, 1529, 1597, 1668, 2365, 3205, 3375

4.3 SINTEZA DERIVATOV 1,3,4-OKSATIAZOL-2-ONA

4.3.1 Poskus sinteze benzil (2-(((2-okso-1,3,4-oksataiazol-5-il)metil)karbamoi)benzofuran-5-il)karbamata (**21**)

Reakcija:



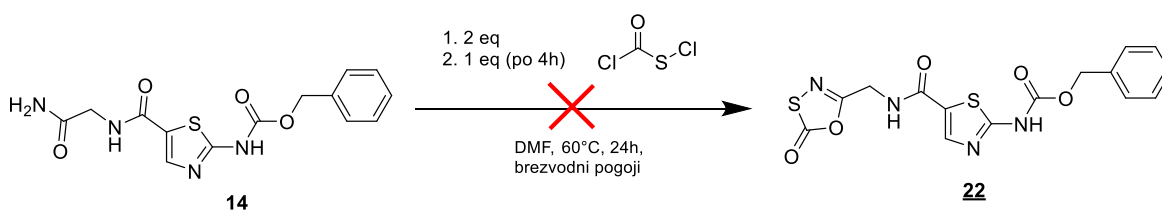
Sintezni postopek:

V bučko smo natehtali 154 mg (0,419 mmol) spojine **12** in jo učinkovito prepihali z argonom. Skozi septum smo s pomočjo igle dodali 10 mL brezvodnega THF, da se je vse raztopilo in nato še klorokarbonilsulfenil klorid (0,838 mmol, 2 eq). Reakcijska zmes se je obarvala svetlo rumeno. Ob konstantnem mešanju na magnetnem mešalu in inertnih pogojih smo reakcijsko zmes segreli na 50 °C. Po 2 urah smo dodali še 2 eq reagenta in reakcijo pustili potekati čez noč v brezvodnih pogojih. Barva reakcijske zmesi postala

temno oranžna. Po koncu reakcije smo uparili topilo in preostanek raztopili v EtOAc, pri čemer je izpadla rjava oborina, ki smo jo odfiltrirali. Prav tako smo matičnici uparili topilo in dobili rumenorjavo oljnato tekočino. S TLC analizo smo ugotovili, da je oborina čista, zaostanek iz matičnice pa smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = heksan:EtOAc = 1:1). S pomočjo NMR smo ugotovili, da želene spojine **21** nismo uspeli sintetizirati.

4.3.2 Poskus sinteze benzil (5-(((2-okso-1,3,4-oksatriazol-5-il)metil)karbamoi)tiazol-2-il)karbamata (**22**)

Reakcija:



Sintezni postopek:

V bučko smo natehtali 150 mg (0,449 mmol) spojine **14** in jo prepihali z argonom za zagotovitev brezvodnih pogojev. Nato smo dodali 5 mL brezvodnega DMF in nastala je bistra brezbarvna raztopina. Nato smo po kapljicah dodali klorokarbonilsulfenil klorid (0,897 mmol, 2 eq) ob konstantnem mešanju na magnetnem mešalu. Takoj po dodatku reagenta se je raztopina obarvala rumeno, barva pa se je glede na količino dodanega reagenta stopnjevala do rjave barve. Po 5 minutah mešanja na sobni temperaturi smo raztopino segreli na 60 °C. Po 4 urah smo dodali še 1 eq (0,449 mmol) reagenta in pustili reakcijo potekati 24 ur v brezvodnih pogojih. Nato smo uparili topilo do rjavega zaostanka, ki smo ga raztopili v 20 mL EtOAc in prenesli v lij ločnik. Ekstrahirali smo z 10-odstotno citronsko kislino (1 x 20 mL) in opazili pojav črne emulzije na meji obeh faz. Fazi smo ločili in organsko sprali z nasičeno raztopino NaCl (1 x 20 mL) ter dodali sušilno sredstvo Na₂SO₄. S pomočjo TLC analize smo ugotovili, da se predviden produkt nahaja v vodni fazi, zato smo izvedli ekstrakcijo z 20 mL EtOAc, pri čemer smo produkt uspeli reekstrahirati v organsko fazo. Uparili smo topilo in dobili rjav kristaliničen produkt. Prvotni organski fazi smo sušilno sredstvo odfiltrirali, topilo uparili in dobili temno oborino. Izvedli smo čiščenje produkta s kolonsko kromatografijo, pri kateri smo kot mobilno fazo uporabili EtOAc:heksan = 1:1. Po uparevanju topila izbranim frakcijam smo

dobili rumen kristaliničen zaostanek. Z NMR analizo smo potrdili, da nismo uspeli sintetizirati spojine 22.

4.4 BIOKEMIJSKO VREDNOTENJE POTENCIALNIH ZAVIRALCEV IMUNOPROTEASOMA

Uspeli smo sintetizirati devet spojin (12–20), ki smo jih načrtovali kot nekovalentne zaviralce imunoproteasoma. Na Katedri za farmacevtsko biokemijo Fakultete za farmacijo so jih tudi biokemijsko ovrednotili na izolirani $\beta 5i$ podenoti imunoproteasoma pri koncentraciji 25 μ M.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 KATALITSKO HIDROGENIRANJE AROMATSKIH NITRO SPOJIN (sinteza spojin 1 in 2)

Za uspešno vezavo benzil kloroformata na nitro skupino benzofuranskega in indolnega reagenta ter tvorbo benzil karbamata je bilo potrebno v prvi stopnji reducirati aromatsko nitro skupino v aminske. Uporabili smo dobro uveljavljeno metodo katalitskega hidrogeniranja s pomočjo vodika in katalizatorja paladija, vezanega na ogljik (Pd/C). Vodik se adsorbira na Pd/C in ob stiku z nitro skupino izhodnega reagenta pride do vezave vodikovih atomov na funkcionalno skupino ter do redukcije v amino skupino. Sintezi smo izvajali pri sobni temperaturi, ob konstantnem mešanju na magnetnem mešalu. Morali smo zagotoviti strogo inertne pogoje, ker je Pd izjemno reaktiven in ob stiku z zračnim kisikom lahko pride do vžiga. Prav tako vodik tvori z zrakom eksplozivno zmes in bi ob prisotnosti vira vžiga eksplodiral. Zato smo na začetku reakcije bučko dobro sprali z brezvodnim MeOH, jo posušili in nato dodali izhodni reagent ter brezvodna topila. Prepihali smo jo z argonom, da smo odstranili ves zrak, prisoten v bučki. Šele za tem smo dodali Pd/C, še enkrat prepihali z argonom in začeli uvajati vodik. Konec sinteze spojin 1 in 2 smo ugotovili s pomočjo TLC (MF = heksan:EtOAc = 3:1). Ker je nitro skupina bolj nepolarna od aminske, potuje na TLC ploščici dlje. Ploščico smo dodatno orosili z ninhidrinom, ki je specifičen orositveni reagent za aminske skupine. Lisa se je obarvala rdeče, kar je dokaz, da smo uspešno reducirali nitro skupino. Pridobili smo čist produkt, kar smo potrdili tudi z NMR analizo.

Glavni razlog, da smo se odločili za uporabo metode katalitskega hidrogeniranja s H_2 , Pd/C, je doseganje visokih izkoristkov (93-100 %) in hiter potek reakcije (2-4 ure). Po koncu smo zmes Pd/C odfiltrirali in topilo uparili, pri čemer smo dobili čist produkt. Pred izbiro te metode smo poskusili redukcijo z uporabo $SnCl_2 \times 2H_2O$, vendar smo dobili nizke izkoristke, poleg tega pa je bila spojina zelo onečiščena s stranskimi produkti. To so bili predvsem kompleksi, ki jih tvorijo kositrovi ioni. Želeli smo jih odstraniti s kolonsko kromatografijo, saj bi se glede na njihovo veliko polarnost zadržali na silikagelu, eluiral pa bi se čist produkt. Tega žal nismo uspeli doseči; dobili smo nečist produkt, in sicer zelo majhno količino, ker je prišlo do precejšnjih izgub zaradi retencije na silikagelu. Slabost

redukcije z $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ je tudi dolg čas reakcije in segrevanje pri visoki temperaturi (90 °C).

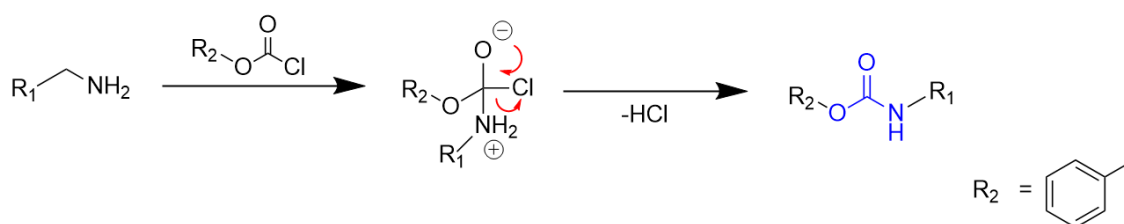
5.2 UVEDBA BENZILOKSIKARBONILNE SKUPINE NA AMINSKO SKUPINO DERIVATOV BENZOFURANA, INDOLA IN TIAZOLA (sinteza spojin 3, 4 in 5)

Po uspešni redukciji nitro skupine smo acilirali aminske skupine aromatskega obroča. V vseh treh primerih smo reakcijo izvajali v brezvodnih pogojih z uporabo brezvodnih topil THF (sinteza spojin 3 in 5) in acetonitrila (sinteza spojine 4). Bučko smo pred dodatkom reagentov prepihali z argonom, da smo ustvarili inertno atmosfero. S tem smo preprečili dostop vode in zraka v sistem, saj bi voda lahko hidrolizirala izhodni reagent, ki vsebuje estrsko skupino ali pa bi zreagirala z reaktivnim benzil kloroformatom. Posledično bi nastalo manj produkta. Na začetku smo reakcijo izvajali na ledu, s čimer smo zmanjšali verjetnost nastanka stranskih produktov, benzil kloroformat pa smo v vseh primerih dodali v presežku, da smo zagotovili zadostno količino za vezavo na amin. Potreben je bil dodatek baze za nevtralizacijo sproščene HCl. To smo storili z uporabo Na_2CO_3 (sinteza spojin 3 in 5) in Et_3N (sinteza spojine 4). Celotno reakcijo smo spremljali s TLC in uporabili orositveni reagent ninhidrin. Bistveno lepše se je barvala izhodna spojina, ker ima prosto aminske skupine, v primerjavi s produkti, pri katerih mora ob segrevanju šele poteči hidroliza karbamata do amina. K slabemu obarvanju produkta pa je prispeval tudi šibko kisel indolni dušik. Na TLC ploščici so imeli produkti bistveno višji R_f od izhodne spojine, ker so bolj lipofilni.

Pri izolaciji spojine 3 smo zaostanek, raztopljen v EtOAc nakisali z 1M HCl, da smo ionizirali aminske skupine izhodne spojine. Pri ekstrakciji smo se je tako lahko znebili z izločitvijo v vodno fazo. V organski fazi pa je ostal produkt, vendar je bil zelo nečist, saj se z nakisanjem zmesi nismo uspeli znebiti nastalih stranskih produktov in ostalih nečistot. Zato smo v naslednjem koraku izvedli kolonsko kromatografijo, pri kateri sprva nismo uspeli doseči dobre ločbe. Možna vzroka sta bila izbira preozke kolone ali nanos prevelikega volumna vzorca, pri čemer so se lise razširile in spojine se med seboj niso ločile. Proces smo ponovili s širšo kolono, pri kateri je bil stolpec vzorca manjši in tako dosegli dobro ločbo. Izolirali smo dokaj čist produkt z minimalno vsebnostjo nečistot. Pri izolaciji spojine 4 smo imeli manj težav. Namesto HCl smo uporabili 10-odstotno

raztopino citronske kisline, ki je prav tako dovolj močna za ionizacijo izhodne spojine. Ekstrahirali pa smo tudi z bazično raztopino NaHCO_3 , da je nevtralizirala sproščeno HCl . V organski fazi nam je ostal samo čist končni produkt. Pri spojini **5** nam je takoj po dodatku EtOAc in vode k suhemu preostanku, izpadel produkt kot bela oborina. Pri vseh reakcijah smo dosegli visoke izkoristke, kar je posledica reakcij v brezvodnih pogojih. Glavni razlog za najnižji izkoristek pri sintezi **3** (77 %), pa je kolonska kromatografija, pri kateri smo zaradi retencije na silikagelu izgubili nekaj produkta.

Reakcija je potekala po mehanizmu adicije s sledečo eliminacijo (slika 24). Amino skupina je dober nukleofil, ki se adira na elektrofilni C-atom karbonilne skupine benzil kloroformata, na katerega je vezan Cl . Le-ta je je dobra izstopajoča skupina, zato pride do cepitve vezi in izstopa Cl^- iz molekule. Produkt naše reakcije je stabilen ester karbamske kisline.



Slika 24: mehanizem adicije s sledečo eliminacijo (prirejeno po [22])

5.3 HIDROLIZA DERIVATOV BENZOFURANA, INDOLA IN TIAZOLA (sinteza spojin **6**, **7** in **8**)

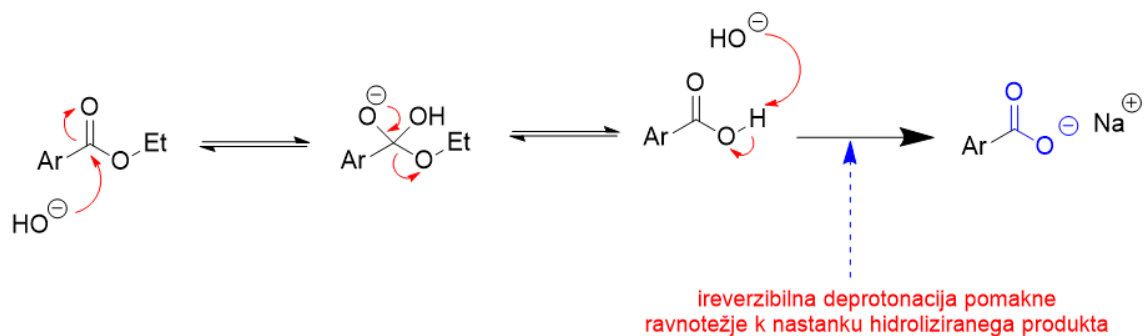
Po uspešni vezavi benzil kloroformata na aminske skupine smo v naslednji stopnji izvedli hidrolizo estrske skupine. Kot topilo za izhodne spojine smo uporabili THF, hidrolizo pa smo v vseh primerih izvedli z raztopino 1M NaOH (slika 25). Sintezo spojin **6** in **8** smo izvajali pri sobni temperaturi in reakcijo spremljali s TLC ($\text{MF} = \text{EtOAc}$). Reakcijsko mešanico pri sintezi spojine **7** smo na začetku ohladili na ledu, da bi ravnotežje pomaknili v desno v smer nastanka produkta, saj gre za eksotermno reakcijo. Ker smo ugotovili, da reakcija tudi po 4 urah ni potekla, smo temperaturo povišali na $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ in jo pustili do naslednjega dne. S povišano temperaturo smo pospešili reakcijo, saj se je povečalo število trkov med molekulami in so lažje zreagirale med seboj. Po 24 urah je hidroliza potekla, kar

smo dokazali s TLC (MF = EtOAc:heksan = 1:1). Izhodne spojine so imele na ploščici bistveno višji R_f, ker so bolj lipofilne od končnega produkta, ki je kislina. Zaradi polarnosti in ravnotežja med ionizirano ter neionizirano obliko kisline, se produkt zadrži na začetku oziroma potuje »z repom«. Po dodatku nekaj kapljic AcOH, smo opazili višji R_f, ker smo spojino pretvorili v protonirano obliko, ki je manj polarna.

Spojini **6** in **8** smo izolirali z nakisanjem reakcijske zmesi s koncentrirano raztopino HCl. S tem smo nastalo kislino protonirali in ji zmanjšali topnost, zato je izpadla oborina. S TLC smo potrdili čistost produktov, zato kolonska kromatografija ni bila potrebna. Pri izolaciji spojine **7** je oborina izpadla že ob uparevanju topila, zato smo jo le odfiltrirali. Ugotovili smo, da ni čista in da vsebuje malo izhodne spojine, v matičnici pa je ostalo še nekaj produkta. Da smo izolirali še preostanek spojine, smo tudi matičnico nakisali, zato je izpadla še dodatna količina oborine, ki pa ni bila produkt. To smo potrdili tudi z NMR analizo. Verjetno je šlo za nečistoto oziroma stranski produkt, saj je pri povišani temperaturi morda hidroliziral tudi karbamat.

S sinteznega vidika je zelo zanimivo, da je hidroliza relativno hitro potekla pri derivatih benzofurana in tiazola, pri indolu pa smo temperaturo morali povišati ter reakcijo pustiti potekati do naslednjega dne. Sterične ovire so pri vseh izhodnih spojinah približno enake in omogočajo enostaven dostop vode in NaOH do estrske vezi. Po vsej verjetnosti ima vpliv dušikov atom na indolu, ki je šibko kisel in mu baza odcepi proton. Tako nastane na dušiku negativen naboj, ki zaradi elektrostatskih odbojnih sil prepreči nadaljnji dostop OH⁻ iona k estrski vezi. To je najverjetnejši razlog, da hidroliza težje poteče. Največji izkoristek smo dosegli pri sintezi spojine **6** (90 %), nekoliko manjši pa pri ostalih dveh (66 % **8** in 73 % **7**). Presenetljivo je, da je sinteza spojine **7** potekla s precej visokim izkoristkom kljub začetnim težavam. Reakcija, ki je potekla je bazično-katalizirana hidroliza estra.

Kemijsko gre za reakcijo adicije s sledečo eliminacijo, ki je ireverzibilna in poteka po sledečem mehanizmu:



Slika 25: bazično-katalizirana hidroliza estra (prirejeno po [22])

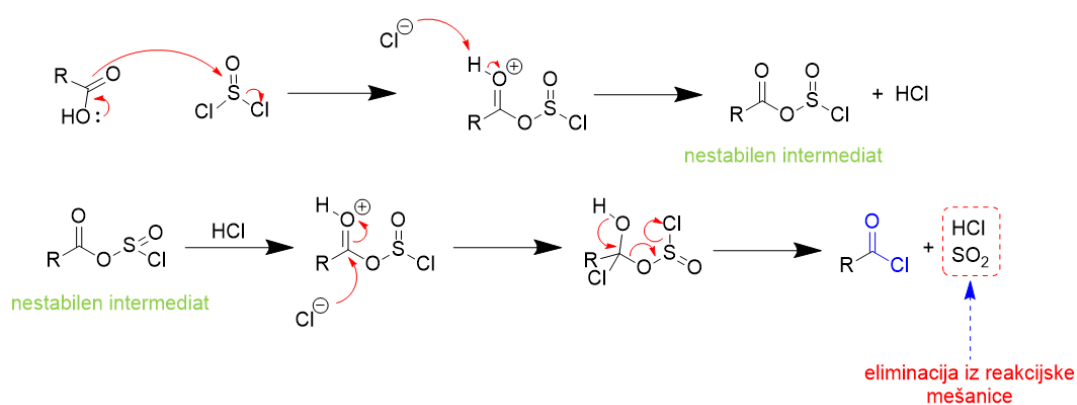
V našem primeru smo hidrolizo izvajali z NaOH, ki pospeši reakcijo, ker je boljši nukleofil od vode. OH^- napade elektrofilno karbonilno skupino [23], pri čemer izstopi etoksi skupina in nastane kislina, iz katere baza odcepi proton. Deprotonacija je ireverzibilen proces zaradi prisotnosti močne baze. Ravnotežje pomakne v smer hidroliziranega produkta [22].

5.4 TVORBA ESTRA KOT ZAŠČITA 6-HIDROKSINIKOTINSKE KISLINE (sinteza spojine 9)

Naš namen je bil uvedba 2-bromoacetofenona na fenolno skupino 6-hidroksinikotinske kisline in tvorba etra. Hidroksilna skupina predstavlja nukleofil, ki lahko zreagira z elektrofilnimi substancami. Zato je bilo potrebno predhodno zaščititi karboksilno skupino, ki bi prav tako lahko zreagirala in bi dobili precej neželenih stranskih produktov. Esterifikacijo smo izvedli z uporabo brezvodnega EtOH, ki je služil hkrati kot topilo in reagent za uvedbo etilne skupine. Želeli smo zagotoviti čim bolj brezvodne pogoje, zato smo uporabili brezvodno topilo. Reakcija v povsem inertnih pogojih ni bila možna, saj je potekala pri 80 °C, zato smo uporabili povratni hladilnik. Nanj smo dodali še klorkalcijevo cevko, ki je preprečila dostop vlage v sistem. Za reakcijo smo uporabili tionil klorid (SOCl_2), ki smo ga dodali v prebitku (1.9 eq), zaradi ravnotežne reakcije. Na začetku reakcije smo imeli po prvem dodatku topila nekaj težav s topnostjo izhodnega reagenta, saj je nastala suspenzija. Zato smo dodali še več topila, da smo zmanjšali koncentracijo topljenca in s tem povečali topnost. Povečali smo jo tudi z intenzivnim mešanjem, ker smo izboljšali stik spojine z molekulami topila. Reakcija se je končala po 24 urah, to pa smo določili s TLC (kislina je ostala na začetku). Kot orositveni reagent smo izbrali bromkrezolno zeleno, ki obarva vse kisle spojine rumeno, vendar izbira ni bila najboljša. Pričakovali smo obarvanje na začetku pred dodatkom reagenta in nato vedno manj zaradi

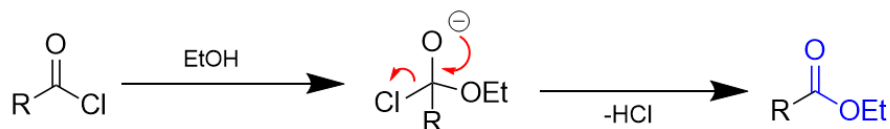
tvorbe estra, a ni bilo tako. Sama izhodna spojina pred dodatkom SOCl_2 vsebuje karboksilno in tudi šibko kislno fenolno skupino, zato bi se morala obarvati, vendar se ni. Tekom reakcije se je vedno bolj barvala lisa reakcijske zmesi, zaradi nastajanja HCl , ki je bil stranski produkt.

Produkt smo izolirali z ekstrakcijo z EtOAc in dodatkom NaHCO_3 , ki je ioniziral prisotno izhodno spojino (vsebuje COOH), da se je ekstrahirala v vodno fazo. Ker je tudi končni produkt šibko kisel zaradi fenolne OH skupine, smo ga nekaj izgubili v vodno fazo. Zato smo ekstrakcijo ponovili in izgubljeno spojino reekstrahirali nazaj v organsko fazo ter pridobili čist končni produkt. Reakcija je potekla z zadovoljivim izkoristkom 67 %. Razlog je, da celotna količina spojine sploh ni zreagirala, nekaj pa smo je tudi izgubili v vodno fazo pri izolaciji.



Slika 26: mehanizem tvorbe kislinskega klorida z SOCl_2 (prirejeno po [22])

Karboksilna kislina vsebuje OH fragment, ki je slaba izstopajoča skupina. Zato je bilo potrebno kislino pretvoriti v bolj reaktivno zvrst. V našem primeru smo *in situ* s pomočjo SOCl_2 tvorili kislinski klorid, ki je izjemno reaktiven, ta pa je nato hitro zreagirala s prisotnim EtOH v reakcijski zmesi in tvoril ester. Karboksilna skupina v prvi stopnji (slika 26) napade elektrofilen žveplov atom, iz katerega nastane nestabilen intermedijat. Ta po protonaciji reagira s šibko nukleofilnim Cl^- ionom in nastane acil klorid ter stranska plinasta produkta SO_2 in HCl , ki se eliminirata iz reakcijske mešanice. To je tudi vzrok za ireverzibilnost same reakcije [22]. V naslednji stopnji (slika 27) EtOH kot nukleofil napade močno elektrofilen karbonilni atom acil klorida, pri čemer se eliminira Cl^- , ki je dobra izstopajoča skupina in nastane ester. Gre za reakcijo adicije s sledečo eliminacijo.



Slika 27: mehanizem tvorbe estra iz acil klorida in EtOH (prirejeno po [22])

5.5 VEZAVA 2-BROMOACETOFENONA IN TVORBA ETRA (sinteza spojine 10)

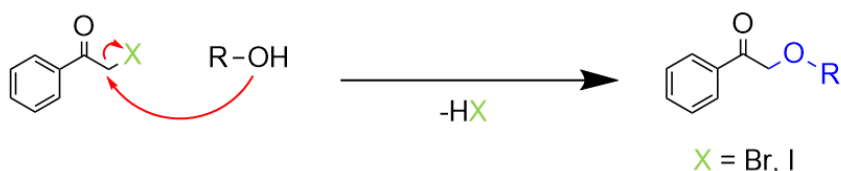
Po uspešni zaščiti karboksilne skupine na spojini 9 smo na hidroksilno skupino vezali 2-bromoacetofenon in tvorili eter. Kot topilo za izhodno spojino smo uporabili DMF, saj se je eksperimentalno pokazalo, da DMF raztoplja mnoge spojine, ki jih ostala topila ne. Reagent smo dodali v prebitku (1.7 eq), da smo povečali izkoristek reakcije. Dodali pa smo tudi Na_2CO_3 , ki je odcepil proton hidroksilne skupine ter s tem povečal njeno nukleofilnost. Pri reakciji se je sproščal HBr, zato je baza nevtralizirala medij. Da je sinteza potekala uspešno, smo dodali dva katalizatorja, in sicer kalijev jodid in Aliquat®. Reakcija je potekala na 130 °C preko noči, na vrh povratnega hladilnika smo dodali klorkalcijevo cevko, da smo preprečili dostop vode v sistem, saj le-ta moti reakcijo. Zagotovitev popolnoma brezvodnih pogojev ni bila možna zaradi segrevanja ob temperaturi vrenja. Konec reakcije smo določili s TLC. Tokrat je bila identifikacija lise produkta težja kot v prejšnjih sintezah, saj se je izkazalo, da že začetna reakcijska zmes vsebuje še nekaj reagentov, ki imajo podobne R_f kot 2-bromoacetofenon in izhodna spojina. Identifikacijo nam je olajšal dodatek standardov dodanih reagentov in izhodne spojine na TLC ploščico.

Produkt smo izolirali z ekstrakcijo. Z dodatkom 10-odstotne raztopine citronske kisline v prvi stopnji smo nevtralizirali dodano bazo, sledil pa je dodatek NaHCO_3 , ki je ioniziral izhodno spojino, da se je ekstrahirala v vodno fazo. V organski je ostal produkt, ki smo ga sprva sušili z nasičeno raztopino NaCl in nato še s sušilnim sredstvom Na_2SO_4 . Po končani izolaciji nismo uspeli pridobiti čiste spojine, kar pomeni, da z dodanim NaHCO_3 nismo dobro odstranili vseh reagentov, saj je verjetno prešibka baza. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo, pri kateri pa smo naleteli na zelo slabo topnost produkta v EtOAc, ki je najprimernejše topilo za nanos vzorca na kolono. Le s težavo smo ga uspeli raztopiti s segrevanjem, a je po ohladitvi delno izpadla oborina, ki je bila čist produkt.

Preostanek smo nanegli na kolono, vendar je bil volumen nanosa prevelik, zato so se lise razširile in se je čas ločbe bistveno podaljšal. Kljub temu smo uspeli eluirati produkt.

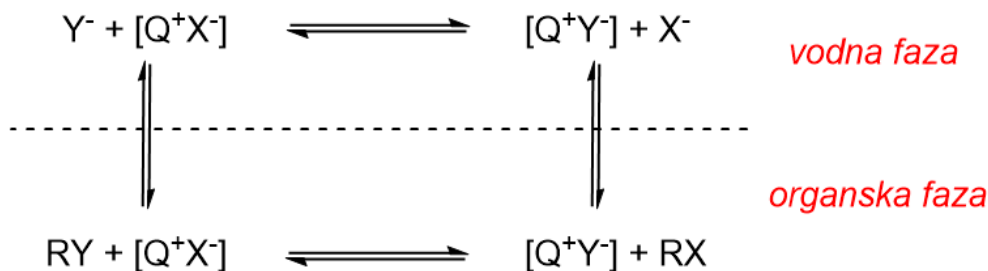
Za potek reakcije in višji izkoristek je bil potreben dodatek katalizatorjev Aliquata® in kalijevega jodida. Aliquat®, ki je kemijsko kvaterna amonijeva spojina, je katalizator faznega prenosa. Netopen Na_2CO_3 predstavlja trdno polarno fazo, ki je dispergirana v organski (topilo). V našem primeru Aliquat® izboljša stik med Na_2CO_3 in organsko fazo.

Reakcija je potekala po mehanizmu nukleofilne substitucije tipa 2 ($\text{S}_{\text{N}}2$), ker gre za reakcijo na sp^3 hibridiziranem primarnem C-atomu, za katerega je značilen $\text{S}_{\text{N}}2$ mehanizem (slika 28). Pri tem ni nastanka intermediata. OH skupina kot nukleofil napade elektrofilen C-atom na katerega je vezan Br. Zaradi dodanega KI pride do izmenjave broma z atomom joda, ki je boljša izstopajoča skupina, zato reakcija lažje poteče. Pride do cepitve vezi in izstopa I^- iz molekule ter tvorbe etra.



Slika 28: mehanizem tvorbe etra ($\text{S}_{\text{N}}2$) (prirejeno po [22])

Cilj faznega prenosa (slika 29) je prehod nukleofila Y^- iz vodne v organsko fazo, kjer običajno potekajo reakcije. Zaradi svoje polarnosti je v njej netopen, zato potrebujemo katalizator faznega prenosa. Večinoma so v uporabi kvaterni amonijeve soli $[\text{Q}^+\text{X}^-]$ (Aliquat®), ki z Y^- tvorijo ionski par $[\text{Q}^+\text{Y}^-]$, ta pa je zaradi izenačenja naboja sposoben premestitve v organsko fazo, kjer lahko poteče nukleofilna substitucija. Katalizator se v organski fazi poveže z disociiranim ionom X^- in tvori ionski par $[\text{Q}^+\text{X}^-]$, ki se ponovno prenese v vodno fazo. Tako se proces ciklično ponavlja, vse dokler se ne prenese celotna količina nukleofila Y^- v organsko fazo [24].



Slika 29: mehanizem delovanja katalizatorja faznega prenosa (prirejeno po [24])

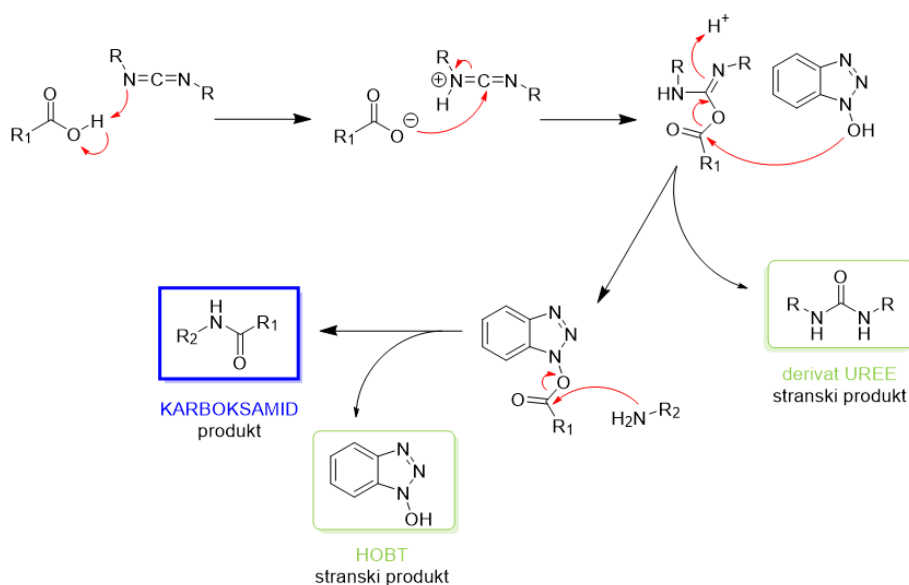
5.6 HIDROLIZA DERIVATA PIRIDINA (sinteza spojine 11)

Podobno kot pri ostalih derivatih, smo tudi pri piridinu hidrolizirali ester, ki je v prejšnji sintezni stopnji služil kot zaščita. Uporabljeni reagenti, topilo in čas poteka reakcije so bili podobni kot v ostalih primerih (1M NaOH, THF, 24 ur), razlika je bila le v temperaturi (30 °C). Za hidrolizo načeloma ni potrebna visoka temperatura, saj reakcija poteče že pri sobnih pogojih, odvisna pa je tudi od same strukture spojine. V našem primeru smo reakcijsko zmes le malo segreli, v nasprotju z derivatom indola, pri katerem je bila potrebna višja temperatura (50 °C), da je hidroliza potekla. Konec reakcije smo določili s TLC, pri čemer je produkt ostal na začetku, saj zaradi ionizacije in polarnosti ni potoval z mobilno fazo. Izolacija je potekala brez težav. Reakcijsko zmes smo po uparevanju topila nakisali s HCl, da smo kislino pretvorili v nedisocirano obliko, ki je zaradi slabe topnosti izpadla kot oborina. Mehanizem hidrolize je opisan pod točko 5.3.

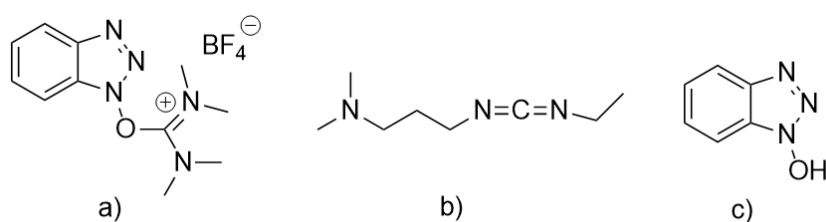
5.7 SKLOPITVENE REAKCIJE NA DERIVATIH BENZOFURANA, INDOLA, TIAZOLA IN PIRIDINA (sinteza spojin 12-20)

V predzadnji stopnji sinteze smo na vse tipe osnovnih skeletov uvedli amide različnih aminokislin. Na spojine smo vezali glicinamid, L-alaninamid in L-fenilalaninamid. Reakcije smo izvajali s pomočjo sklopitvenega reagenta, ki ga nujno potrebujemo za tvorbo karboksamida iz karboksilne skupine in amina (slika 30). Karboksilna skupina je zelo slabo reaktivna, saj OH ni dovolj dobra izstopajoča skupina. Zato je za reakcijo z

nukleofilno amsko skupino potrebna aktivacija COOH skupine. Pri sintezah smo uporabljali dva komercialno dostopna reagenta TBTU in EDC (slika 31) [25]. Aminokislini alanin in fenilalanin sta lahko v dveh stereoizomernih oblikah; kot L-enantiomer in D-enantiomer. V naravi so skoraj vse aminokislino v obliki L-enantiomera, zato smo jih tudi mi uporabili pri sintezi. Med reakcijami bi lahko prišlo do racemizacije in bi dobili kot produkt določen delež ene in druge oblike. To težavo smo rešili z uporabo HOBT (slika 31), ki prepreči racemizacijo.



Slika 30: prikaz sklopitvene reakcije med karboksilno kislino in aminom z uporabo sklopitvenega reagenta EDC in zaviralca racemizacije HOBT (prirejeno po [26])



Slika 31: a) TBTU [29], b) EDC [27], c) HOBt [28]

V skoraj vseh primerih smo reakcije izvajali v strogo inertni argonovi atmosferi, da smo preprečili vpliv kisika. Poleg tega smo uporabljali sveže destilirana brezvodna topila. Voda bi oteževala potek reakcije, ker bi kot nukleofil lahko reagirala s posameznimi reagenti in

posledično bi dobili nižje izkoristke. Najpogosteje uporabljena topila so bila THF, acetonitril in DMF, odvisno od topnosti izhodne spojine. Večina naših spojin je bila težko topnih, zato smo za medij izbrali DMF. Slabost DMF je nizek parni tlak, zato je bil čas uparevanja po reakciji bistveno daljši kot pri ostalih topilih. Pri sintezi spojin **12** in **17** smo opazili zanimiv pojav. Obe reakciji smo izvajali pri standardnih pogojih, kjer smo sicer uporabili brezvodno topilo, vendar v bučki nismo imeli prisotnega argona. Izkoristek obeh reakcij je bil nekoliko višji (87 % in 95 %) kot v večini primerov, pri katerih smo imeli inertno atmosfero. Glede na to, da je znano, da so za reakcijo boljši brezvodni pogoji, lahko pojav razložimo le z večjo natančnostjo našega dela pri danih pogojih. Pri reakcijah z glicinamidom in L-alaninamidom se pri reakciji sprošča HCl, zato smo za nevtralizacijo medija dodali šibko bazo Et₃N. Vse reagentne smo dodajali v 1,1 do 1,3-kratnem prebitku, da smo zagotovili čim boljši izkoristek reakcije. Pri sintezah spojin **13** in **18** smo reakcijsko mešanico sprva ohladili na ledu, da bi ravnotežje pomaknili v smer nastanka produktov in šele nato dodali reagentne. Ugotovili smo, da izkoristki niso bili nič višji v primerjavi z ostalimi reakcijami, pri katerih mešanice nismo ohladili na ledu. Iz tega sklepamo, da morda ohlajanje ni nujen pogoj za dober izkoristek reakcije ter da so pomembnejši ostali parametri, kot so fizikalno-kemijske lastnosti same molekule in natančnost izvedbe reakcije. Reakcije smo izvajali pri sobni temperaturi oziroma ob rahlem segrevanju (30 °C) in so potekle v 24 do 72 urah, odvisno od posamezne reakcije. Reakcije smo spremljali s TLC in produkt identificirali s pomočjo standardov reagentov. Produkti so imeli zaradi večje lipofilnosti višji R_f kot izhodna spojina in reagenti. Uporabili pa smo tudi ninhidrin za orositev TLC ploščice.

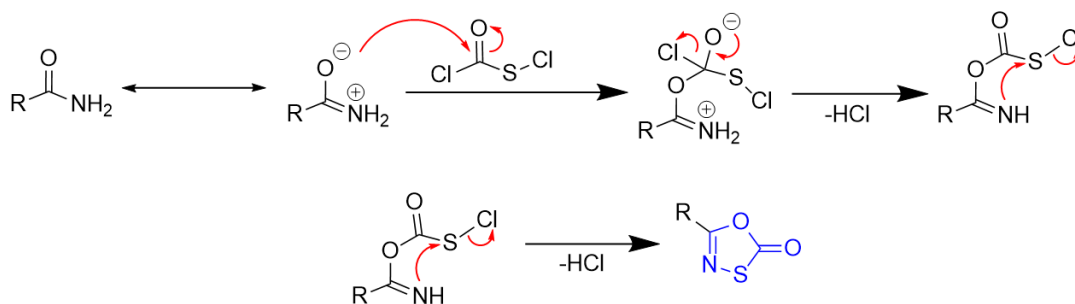
Vse spojine smo izolirali na podoben način. Po uparitvi topila smo preostanek v bučki raztopili v EtOAc in nato dodali 10-odstotno raztopino citronske kisline, ki je nevtralizirala bazičen medij (v primerih dodatka baze) ter ionizirala presežni amid aminokisline, da se je med ekstrakcijo ekstrahirala v vodno fazo. Sledil je dodatek NaHCO₃, ki je ioniziral nezreagirano izhodno spojino (karboksilna kislina), ki se je tudi ekstrahirala v vodno fazo. V organski fazi je tako ostal le produkt in morebitne soli, ki smo jih odstranili s spiranjem z destilirano vodo. Organsko fazo smo sprva sušili z nasičeno raztopino NaCl in na koncu še s sušilnim sredstvom Na₂SO₄. V večini primerov smo uspeli izolirati čisto spojino zaradi slabe topnosti, v ostalih pa je bilo potrebno čiščenje s kolonsko kromatografijo.

5.8 CIKLIZACIJA AMINOKISLINSKIH DERIVATOV DO 1,3,4-OKSATIAZOL-2-ONA (poskus sinteze spojin 21 in 22)

V zaključni stopnji sinteze potencialnih zaviralcev imunoproteasoma smo želeli sintetizirati ključen fragment za kovalentno vezavo v aktivno mesto encima. Tega predstavlja obroč 1,3,4-oksataiazol-2-ona, ki smo ga poskusili sintetizirati iz spojin z vezanimi amidi aminokislin. Za ciklizacijo smo izbrali spojini 12 (skelet benzofurana) in 14 (skelet tiazola), ki sta derivata glicinamida in L-fenilalaninamida. Reakcije smo izvajali v inertni atmosferi, poleg tega smo uporabili brezvodna topila (THF in DMF) in sistem segreli na temperaturo 50 °C (sinteza 21), oziroma 60 °C (sinteza 22). Z zvišanjem temperature smo pospešili kinetiko reakcije (večje število trkov molekul, višja kinetična energija). Kot reagent za ciklizacijo smo uporabili klorokarbonilsulfenil klorid v velikem presežku. Dodajali smo ga počasi po kapljicah, da ne bi prišlo do prenasičenja. V prvem primeru smo pri spremljanju reakcije s TLC ugotovili, da je pozicija lis na ploščici tudi po nekaj urah še vedno enaka, kar pomeni, da reakcija ni potekala kot bi morala. V drugem primeru pa smo zaznali nekaj dodatnih lis z visokim R_f, iz česar smo sklepali, da so nastali produkti, ki so bolj lipofilni in zato potujejo na ploščici dlje od izhodne spojine.

Pri izolaciji domnevne spojine 21 smo se ponovno srečali s slabo topnostjo. Po poskusu raztapljanja v EtOAc je izpadla rjava oborina, ki je bila praktično netopna v vseh topilih, zato izvedba NMR analize ni bila mogoča. Reakcijsko zmes smo očistili s kolonsko kromatografijo, pri čemer smo dobili izjemno majhne mase posameznih frakcij. Za edino frakcijo, ki smo ji lahko posneli NMR spekter in hkrati tudi najverjetnejšo za vsebnost produkta, smo dokazali, da ne vsebuje naše spojine. Pri izolaciji domnevne spojine 22 smo poskusili s standardnim postopkom izolacije (10-odstotna citronska kislina, NaHCO₃, NaCl). Ker smo preveč spojine izgubili v vodno fazo, smo izvedli postopek reekstrakcije v organsko fazo. Organska faza 2 (po reekstrakciji) je glede na NMR analizo vsebovala izhodno spojino, organska faza 1 (pred reekstrakcijo) pa je bila precej nečista, zato smo izvedli čiščenje s kolonsko kromatografijo. Tudi tokrat smo dobili zelo majhne količine posameznih frakcij, zato NMR analize ni bilo mogoče izvesti.

Glede na mehanizem, bi reakcijo, če bi uspela, razdelili na dva dela (slika 32). V prvem bi potekla adicija s sledečo eliminacijo. Nukleofilni kisikov atom terminalne amidne skupine bi napadel karbonilni ogljik klorokarbonilsulfenil klorida, pri čemer bi se iz molekule odcepil Cl^- , ki je dobra izstopajoča skupina. Kot stranski produkt bi nastal HCl . V drugem delu bi nato nukleofilna iminska skupina napadla elektrofilen žveplov atom, Cl^- bi izstopil iz reakcije in prišlo bi do ciklizacije ter nastanka 1,3,4-oksataiazol-2-ona.



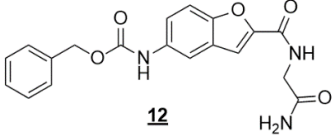
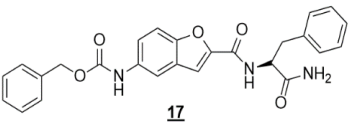
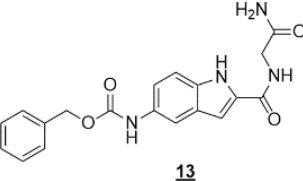
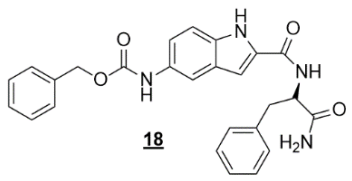
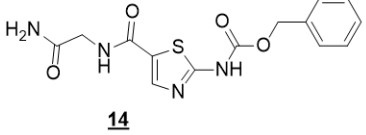
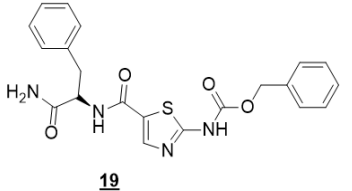
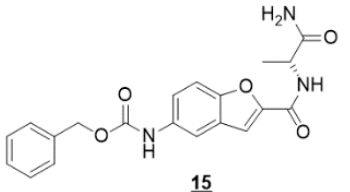
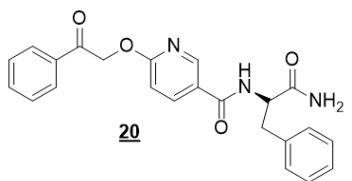
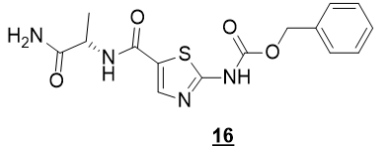
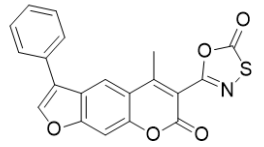
Slika 32: predpostavljjen mehanizem ciklizacije do 1,3,4-oksataiazol-2-ona (prirejeno po [22])

Glavnih spojin, ki bi bile potencialno uporabne kovalentne učinkovine, torej nismo uspeli sintetizirati. Kljub natančni izvedbi reakcije in zagotovitvi ustreznih pogojev ciklizacija ni potekla. Razlogov za neuspeh je verjetno več. Klorokarbonilsulfenil klorid je zelo reaktivna entiteta in lahko takoj ob stiku z zrakom reagira. To se je verjetno zgodilo zaradi počasnega dodajanja, saj nismo želeli, da pride do prenasíčenja. Težava je bila morda tudi ta, da reagent ni bil povsem svež ali da je bila igla za injiciranje reagenta kontaminirana in je le-ta zreagiral še pred dodatkom v bučko. Obstaja tudi velika možnost neselektivne reakcije na ostalih NH fragmentih v molekuli, kar je posledica visoke reaktivnosti klorokarbonilsulfenil klorida. Torej lahko zaključimo, da sta glavna vzroka za neuspelo sintezo reagent ali potek stranskih reakcij na ostalih mestih z NH fragmentom. V prihodnje bi bila potrebna natančna analiza ali modifikacija postopka.

5.9 BIOKEMIJSKO VREDNOTENJE POTENCIALNIH ZAVIRALCEV IMUNOPROTEASOMA

Sintetizirane spojine so ovrednotili na Katedri za farmacevtsko biokemijo. Rezultati so podani v spodnji tabeli kot rezidualna aktivnost (RA) encima. RA je definirana kot razmerje med aktivnostjo encima ob dodatku zaviralca in njegovi odsotnosti. Aktivnost 0 % pomeni, da je encim povsem neaktiven, oziroma da gre za popolno zaviranje encima. Nasprotno pa 100 % aktivnost pomeni, da je spojina povsem neučinkovita in encim ostaja v polni meri aktiven. V primeru naših spojin so ravno to dokazali. Nobena izmed sintetiziranih spojin ni zavrla $\beta 5i$ podenote, kar pomeni, da so naše spojine neučinkovite. Kot pozitivno kontrolo so pri testiranju uporabili spojino **42**, ki je odličen selektivni zaviralec in je podrobneje predstavljen v članku, ki so ga objavili raziskovalci z naše fakultete [10]. Morda bi bila zgodba drugačna v primeru, da bi testirali kovalentne zaviralce, če bi uspeli izvesti ciklizacijo do 1,3,4-oksatazola-2-ona, ki smo jo med drugim načrtovali. Ta bi se po že znanih podatkih iz literature lepo prilegal v S1 žep in kovalentno zavrl encim, saj bi prišlo do močne povezave med nukleofilnim Thr1 in elektrofilnim fragmentom 1,3,4-oksatazola-2-ona.

Tabela 10: sintetizirane spojine s prikazano rezidualno aktivnostjo (RA) encima v prisotnosti zaviralca

SPOJINA	RA [%] (25 μ M)	SPOJINA	RA [%] (25 μ M)
 12	100 %	 17	100 %
 13	100 %	 18	100 %
 14	100 %	 19	100 %
 15	100 %	 20	100 %
 16	100 %	 42	1 %

6 SKLEP IN ZAKLJUČEK

Namen magistrske naloge je bil sintetizirati nepeptidne spojine, ki bi bile učinkoviti selektivni zaviralci β 5i podenote imunoproteasoma. Do sedaj so v literaturi opisane večinoma peptidne učinkovine, ki pa iz različnih vidikov niso najugodnejše zdravilne učinkovine. Načrtovali smo sintezo nekovalentnih in kovalentnih zaviralcev, saj imajo oboji svoje prednosti. Pri tem smo izvedli tudi molekulsko sidranje v aktivno mesto in kot najobetavnejše so se izkazale spojine z ogrođjem benzofurana ter indola z vezanimi derivati aminokislin. Sinteze smo izvedli v 4 oziroma 5 stopnjah, odvisno od tipa izhodnega reagenta. Na spojine z različnimi strukturnimi ogrođji (benzofuran, indol, tiazol in piridin) smo uspešno vezali amide različnih aminokislin (Gly, L-Ala in L-Phe) in tako pripravili potencialne nekovalentne zaviralce. Nadaljnji cilj je bila ciklizacija terminalnega amida do 1,3,4-oksotiazol-2-ona, ki bi predstavljal »bojno glavo« (ang. »warhead«) in bi zaradi elektrofilnosti reagiral z nukleofilnim Thr1 v vezavnem mestu in tvoril kovalentno vez.

Spojine, ki bi bile nekovalentni zaviralci, smo uspešno sintetizirali z izvedbo različnih reakcij, ki so brez večjih težav potekle. Dosegli smo zadovoljive izkoristke glede na težave s topnostjo določenih spojin in izgube pri izolaciji in čiščenju. Spojin z želenim obročem, ki bi bile kovalentni zaviralci pa nismo uspeli sintetizirati. Poleg prej omenjenih težav, reakcija s klorokarbonilsulfenil kloridom v zadnji stopnji ni potekla, kljub večkratnim poskusom in zagotovitvi strogo brezvodnih pogojev. Sinteza je bila neuspešna zaradi različnih vzrokov, najverjetnejša pa sta bila neustrezna čistota reagenta in potek stranskih reakcij na ostalih NH fragmentih v molekuli.

Glede na rezultate biokemijskih testiranj lahko zaključimo, da naše spojine niso učinkovite kot zaviralci β 5i podenote imunoproteasoma. Glede na relativno enostavnost sinteze, dostopnost reagenta in v literaturi opisane dosežene uspehe pri sintezi obroča, bi bilo metodo smiselno optimizirati in ponovno poskusiti s ciklizacijo z uporabo enakega reagenta.

7 LITERATURA

1. Wang J, Maldonado M. A: The Ubiquitin-Proteasome System and Its Role in Inflammatory and Autoimmune Diseases. *Cell. Mol. Immunol.* 2006; 3 (4): 255-61.
2. Boyer R: Temelji biokemije, 2. izdaja, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 324-325.
3. Kisselev A. F, Goldberg A. L: Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem. Biol.* 2001; 8: 739-58.
4. Vucic D, Dixit V. M, Wertz I. E: Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nat. Rev.* 2011; 12: 439-52.
5. Crawford L. J, Irvine A. E: Targeting the ubiquitin proteasome system in haematological malignancies. *Blood Rev. Elsevier Ltd.* 2013; 27: 297-304.
6. Groettrup M, Kirk C. J, Basler M: Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? *Nat. Rev.* 2010; 10: 73-8.
7. Huber E. M, Groll M: Inhibitors for the Immuno- and Constitutive Proteasome: Current and Future Trends in Drug Development. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012; 51: 8708-20.
8. Biomol. Ubiquitin and Proteasome Research. Dostop 5. 7. 2016: <https://www.biomol.com/ubiquitin-and-proteasome-research.html?id=1374>
9. Frankland-Searby S, Bhaumik S. R: The 26S proteasome complex: An attractive target for cancer therapy. *Biochim. et Biophys. Acta* 2011; 1825 (12): 64-76.
10. Sosič I, Gobec M, Brus B, Knez D, Živec M, Konc J, Lešnik S, Ogrizek M, Obreza A, Žigon D, Janežič D, Mlinarič-Raščan I, Gobec S: Nonpeptidic Selective Inhibitors of the Chymotrypsin-Like ($\beta 5i$) Subunit of the Immunoproteasome. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016; 55:5745-5748.
11. Bellavista E, Andreoli F, Parenti M. D, 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? *Current Pharmaceutical Design* 2013; 19: 702-718.
12. Kisselev A. F, Groettrup M: Subunit specific inhibitors of proteasomes and their potential for immunomodulation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2014; 23: 16-22.
13. Zilberberg J, Matos J, Dziopa E, Dziopa E, Yang Z, Kirk C. J, Assefnia S, Korngold R: Inhibition of the Immunoproteasome Subunit LMP7 with ONX 0914 Ameliorates

- Graft-versus-Host Disease in an MHC-Matched Minor Histocompatibility Antigen-Disparate Murine Model. *Biol. Blood Marrow Transplant* 2015; 1-10.
14. Chen J. J, Lin F, Qin Z-H: The roles of the proteasome pathway in signal transduction and neurodegenerative diseases. *Neurosci. Bull.* 2008; 24 (3): 183-94.
 15. Gryder B. E, Guerrant W, Chen C. H, Oyelere A. K: Oxathiazole-2-one derivative of bortezomib: Synthesis, stability and proteasome inhibition activity. *Med. Chem. Commun.* 2011; 2: 1083-6.
 16. Khan M. L, Steward K: Carfilzomib: a novel second-generation proteasome inhibitor. *Future. Oncol.* 2011; 7 (5): 607-612.
 17. Bauer R. A: Covalent inhibitors in drug discovery: from accidental discoveries to avoided liabilities and designed therapies. *DDT* 2015; 20 (9): 1061-1073.
 18. Gonzales-Bello C: Designing Irreversible Inhibitors-Worth the Effort? *ChemMedChem* 2016; 11: 22-30.
 19. Singh J, Petter R. C, Baillie T. A, Whitty A: The resurgence of covalent drugs. *Nat. Rev.* 2011; 10: 307-317.
 20. Dubiella C, Baur R, Cui H, Huber E. M, Groll M: Selective Inhibition of the Immunoproteasome by Structure-Based Targetting of a Non-catalytic Cysteine. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015; 54: 1-5.
 21. Kasam V, Lee N, Kim K, Zhan C: Selective immunoproteasome inhibitors with non-peptide scaffolds identified from structure-based virtual screening. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014; 1-4.
 22. Clayden J, Greeves N, Warren S, Wothers P: *Organic Chemistry*, 1. izdaja, Oxford University Press, New York, 2001: 291, 295.
 23. Tišler M: *Organska kemija*, 2. izdaja, DZS, Ljubljana, 1988: 242.
 24. Jones R. A: *Quaternary ammonium salts; Their use in Phase-Transfer Catalysis*, Academic Press, London, 2001: 8-10.
 25. Sehgal D, Vijay I. K: A Method for the High Efficiency of Water-Soluble Carbodiimide-Mediated Amidation. *Analytical Biochemistry* 1994; 218: 87-91.
 26. CommonOrganicChemistry. Dostop: 6.9.2016
http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Amine_to_Amide_Coupling/Amine_to_Amide_Coupling_HOBt_EDC_Mech.htm
 27. Sigma - Aldrich. Dostop: 6.9.2016
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/161462?lang=en®ion=SI>

28. Sigma - Aldrich. Dostop: 6.9.2016

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=hobt&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=en®ion=SI&focus=product>

29. Sigma - Aldrich. Dostop: 6.9.2016

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=125700-67-6&interface=CAS%20No.&N=0&mode=partialmax&lang=en®ion=SI&focus=product>

8 PRILOGA

SEZNAM UPORABLJENIH REAGENTOV:

- 6-hidroksinikotinska kislina: TCI, > 97 %, 5006-66-6, HO633
- Etil 2-amino-1,3-tiazol-5-karboksilat: Apollo Scientific, 98 %, 32955-21-8, OR5612
- Etil 5-nitroindol-2-karboksilat: Acros Organics, 95 %, 16732-57-3, 424660025
- Etil 5-nitrobenzofuran-2-karboksilat: Acros Organics, 97 %, 69604-00-8, 359430050
- L-fenilalaninamid: AKSci, 98 %, 5241-58-7, JL31331
- L-alaninamid hidroklorid: AKSci, 98 %, 33208-99-0, 60228B
- Glicinamid hidroklorid: AKSci, 98 %, 1668-10-6, 9071917P
- Benzil kloroformat: Acros Organics, > 98 %, 501-53-1, STBD5229V
- EDC: Acros Organics, > 99 %, 25952-53-8, OR5163, AS448322
- HOBt: Sigma-Aldrich, > 99,0 %, 123333-53-9, 24879008
- TBTU: Acros Organics, > 97 %, 125700-67-6, PC0921, AS452864
- Klorokarbonilsulfenil klorid: Sigma-Aldrich, 96 %, 2757-23-5
- 2-bromoacetofenon: Sigma-Aldrich, 98 %, 70-11-1, 606474, 24887194
- Tionil klorid: Sigma-Aldrich, 97 %, 7719-09-7, 1209273, 24868330