

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BARBARA BORŠTNIK

MAGISTRSKA NALOGA
MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA
FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



BARBARA BORŠTNIK

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA AMINOPIPERIDINSKIH
ZAVIRALCEV TREONINSKIH PROTEAZ**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF AMINOPIPERIDINE
THREONINE PROTEASE INHIBITORS**

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko kemijo 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.

Zahvala

Najlepše se zahvaljujem mentorju prof. dr. Alešu Obrezi, mag. farm ter somentorju asist. dr. Marku Jukiču, mag. farm za vso pomoč pri eksperimentalnem delu in pisanju naloge. Zahvaljujem se tudi Anji Mihelčič ter Ani Baumgartner za vse nasvete in pomoč

Izjava

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

Ljubljana 2018

Barbara Borštnik

Predsednik magistrske komisije: prof. dr. Stanko Srčič, mag. farm.

Član magistrske komisije: doc. dr. Jurij Trontelj, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

1. UVOD	1
1.1. Ubikvitin-proteasomski sistem	1
1.2. Struktura proteasoma	2
1.3. Struktura imunoproteasoma	4
1.3.1. Imunoproteasom in bolezni	5
1.4. Zaviralci proteasoma	6
1.4.1. Neselektivni zaviralci proteasoma in imunoproteasoma	6
1.4.2. Selektivni zaviralci imunoproteasoma	9
2. NAMEN DELA	12
3. MATERIALI IN METODE	14
3.1. Materiali	14
3.2. Metode	14
3.2.1. Kromatografske metode	14
3.2.2. Spektroskopske metode	14
4. EKSPERIMENTALNO DELO	16
4.1. Sinteza bifetil-3-acetamidnih derivatov	16
4.1.1. Sinteza <i>terc</i> -butil (1-([1,1-bifenil]-3-karbonil)piperidin-3-il)karbamata (1)	17
4.1.2. Sinteza <i>terc</i> -butil (1-[1,1'-bifenil]-3-karbonil)piperidin-4-il)karbamata (5)	18
4.1.3. Sinteza 1-([1,1'-bifenil]-3-karbonil)piperidin-3-amin-2,2,2-trifluoroacetata (2)	19
4.1.4. Sinteza 1-([1,1'-bifenil]-3-karbonil)piperidin-4-amin-2,2,2-trifluoroacetata (6)	19
4.1.5. Sinteza <i>N</i> -(1-([1,1'-bifenil]-3-karbonil)-piperidin-3-il)-2-cianoacetamida (3)	20
4.1.6. Sinteza <i>N</i> -(1-([1,1'-bifenil]-3-karbonil)piperidin-4-il)-2-cianoacetamida (7)	20
4.1.7. Sinteza <i>N</i> -(1-([1,1'-bifenil]-3-karbonil)piperidin-3-il)akrilamida (4)	22
4.1.8. Sinteza <i>N</i> -(1-([1,1'-bifenil]-3-karbonil)piperidin-4-il)akrilamida (8)	22
4.2. Sinteza bifetil-4-metilpiperidinskih derivatov	24
4.2.1. Sinteza <i>terc</i> -butil (1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-3-il)karbamata (9 in 9.A)	25

4.2.2.	Sinteza <i>terc</i> -butil(1-[1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-4-il)karbamata (13)	27
4.2.3.	Sinteza 1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-3-amin-2,2,2-trifluoroacetata (10 in 10.A)	28
4.2.4.	Sinteza 1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-4-amin-2,2,2-trifluoroacetata (14)	28
4.2.5.	Sinteza <i>N</i> -(1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-3-il)-2-cianoacetamida (11 in 11.A)	30
4.2.6.	Sinteza <i>N</i> -(1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-4-il)-2-cianoacetamida (16)	30
4.2.7.	Sinteza <i>N</i> -(1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)-piperidin-3-il)akrilamida (12)	32
4.2.8.	Sinteza <i>N</i> -(1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-4-il)akrilamida (15)	32
4.3.	Sinteza bifenil-4-acetamidnih derivatov	34
4.3.1.	Sinteza <i>terc</i> -butil(1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-3-il)karbamata (17 in 17.A)	35
4.3.2.	Sinteza <i>terc</i> -butil (1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-4-il)karbamata (21)	37
4.3.3.	Sinteza 1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-3-amin-2,2,2-trifluoroacetata (18/18.A)	38
4.3.4.	Sinteza 1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-4-amin-2,2,2-trifluoroacetata (22)	38
4.3.5.	Sinteza <i>N</i> -(1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-3-il)-2-cianoacetamida (19)	40
4.3.6.	Sinteza <i>N</i> -(1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-4-il)-2-cianoacetamida (23)	40
4.3.7.	Sinteza <i>N</i> -(1([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-3-il)akrilamida (20)	42
5.	REZULTATI IN RAZPRAVA	43
5.1.	Reduktivno aminiranje zaščitenih aminopiperidinov	43
5.2.	Sinteza amidov	44
5.2.1.	<i>N</i> -aciliranje z uporabo sklopitvenih reagentov	44
5.2.2.	Sinteza amidov z uporabo kislinskega klorida	46
5.3.	Odstranitev <i>terc</i> -butilkarbamatne zaščite z amino skupine	46
5.4.	Uvajanje elektrofilnega centra oz. nitrilne/akrilamidne »bojne glave« na aminopiperidinski skelet	47
6.	SKLEP	48
7.	VIRI IN LITERATURA	49

KAZALO SLIK

Slika 1: Ubikvitin-proteasomski sistem (prirejeno po 4)	2
Slika 2: Vezavni žepki v aktivnem mestu proteasoma (prirejeno po 9)	3
Slika 3: Oblike proteasoma, ki jih najdemo v evkariontih (prirejeno po 3)	4
Slika 4: Shematski prikaz konstitutivnega proteasoma in imunoproteasoma (prirejeno po 11)	5
Slika 5: Struktura humanega imunoproteasoma (povzeto po 15)	5
Slika 6: Strukturna formula bortezomiba (prirejeno po 9)	7
Slika 7: Strukturna formula karfilzomiba (prirejeno po 9)	8
Slika 8: Strukturna formula oprozomiba (prirejeno po 9)	8
Slika 9: Strukturna formula iksazomiba (prirejeno po 9)	8
Slika 10: Strukturna formula marizomiba (prirejeno po 9)	8
Slika 11: Strukturna formula UK-101 (prirejeno po 9)	10
Slika 12: Strukturna formula IPSI-001 (prirejeno po 9)	10
Slika 13: Strukturna formula ONX-0914 (prirejeno po 9)	11
Slika 14: Strukturna formula PR-924 (prirejeno po 9)	11
Slika 15: Strukturne formule načrtovanih končnih spojin	13
Slika 16: Reakcijska shema sinteze N-(1-([1,1'-bifenil]-3-karbonil)-piperidin-3-il)-2-cianoacetamida (3) ter N-(1-([1,1'-bifenil]-3-karbonil)piperidin-3-il)akrilamida (4)	16
Slika 17: Reakcijska shema sinteze N-(1-([1,1'-bifenil]-3-karbonil)piperidin-4-il)-2-cianoacetamida (7) in N-(1-([1,1'-bifenil]-3-karbonil)piperidin-4-il)akrilamida (8)	17
Slika 18: Reakcijska shema sinteze N-(1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-3-il)-2-cianoacetamida (11/11.A) in N-(1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)-piperidin-3-il)akrilamida (12)	24
Slika 19: Reakcijska shema sinteze N-(1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-4-il)akrilamida (15) in N-(1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-4-il)-2-cianoacetamida (16)	25
Slika 20: Reakcijska shema sinteze N-(1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-3-il)-2-cianoacetamida (19) in N-(1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-4-il)-2-cianoacetamida (20)	34
Slika 21: Reakcijska shema sinteze N-(1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-4-il)-2-cianoacetamida (23)	35
Slika 22: Mehanizem reakcije reduktivnega aminiranja za tvorbo spojine 9 (prirejeno po 22)	44
Slika 23: Mehanizem sklopitvene reakcije med karboksilno kislino in aminom z uporabo EDC in HOBt (prirejeno po 27)	45
Slika 24: Sklopitveni reagent EDC ter zaviralec racemizacije HOBt (prirejeno po 26)	45
Slika 25: Mehanizem tvorbe amida (spojina 17) (prirejeno po 25, 26)	46
Slika 26: Mehanizem odstranitve Boc zaščite s TFA (prirejeno po 30)	47

POVZETEK

26S proteasom razgradi več kot 80 % proteinov v celicah sesalcev, vključno s hitro razgradnjo nepravilno zviti in regulatornih proteinov ter počasnejšo razgradnjo večine drugih celičnih proteinov. Zato je vloga proteasoma bistvena za homeostazo proteinov in vpliva na regulacijo večine celičnih procesov (1).

Imunoproteasom (iCP) igra pomembno vlogo pri nastanku ustreznih peptidov, ki jih lahko prepoznajo molekule MHC razreda I, modulaciji citokinov in diferenciaciji T celic ter predstavlja pomembno tarčo za zdravljenje avtoimunskih bolezni in raka.

Namen magistrske naloge je bila sinteza aminopiperidinskih kovalentnih zaviralcev treoninskih proteaz, ki bi se selektivno vezali v aktivno mesto $\beta 5i$ -podenote imunoproteasoma. Kovalentne zaviralce smo sintetizirali s pripenjanjem akrilamidnih in nitrilnih »bojnih glav« na aminopiperidinski skelet. Pričakujemo, da se naše spojine nekovalentno vežejo na tarčo – $\beta 5i$ -podenoto humanega imunoproteasoma in s svojo elektrofilno »bojno glavo« pridejo blizu nukleofilnega aminokislinskega ostanka encima. Nato naj bi sintetizirane spojine tvorile kovalentno vez s katalitičnim treoninom (Thr1), ki je v aktivnem mestu imunoproteasoma.

Kot osnovo za sintezo smo uporabili Boc zaščitena 3-aminopiperidin in 4-aminopiperidin. Z različnimi reakcijami smo sintetizirali amide in amine. Eno skupino amidov smo sintetizirali s pomočjo sklopitvenih reagentov, drugo pa z uporabo kislinskega klorida. Za sintezo aminov smo uporabili reakcijo reduktivnega aminiranja z ustreznimi aldehidi. Nato smo pripravljenim spojinam odstranili Boc zaščitno skupino in na amski del molekule uvedli različne substituentne v obliki amidov (pripenjali smo akrilno in cianoacetno kislino). Uspešno smo sintetizirali osem potencialnih kovalentnih zaviralcev imunoproteasoma. Končne spojine bodo biokemijsko vrednotene na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani.

Ključne besede: imunoproteasom, $\beta 5i$ -podenota, aminopiperidinski zaviralci

ABSTRACT

The 26S proteasome is responsible for degradation of more than 80 % of proteins in mammalian cells, including the rapid degradation of regulatory and misfolded proteins and slower degradation of most other cellular proteins. Therefore the function of proteasome is essential for protein homeostasis and regulates many cellular processes.

Immunoproteasome (iCP) has an important role of antigen presentation on MHC class I molecules, modulation of cytokines, T cell differentiation and represents important target for treatment of autoimmune diseases and cancer.

In the master thesis we have focused on the synthesis of aminopiperidine covalent inhibitors of threonine proteases, that would selectively bind in the active site of $\beta 5i$ subunit of immunoproteasome. We have synthesized covalent inhibitors by attaching acrylamide and nitrile »warheads« on aminopiperidine skeleton. We expected that our compounds would non-covalently bind to the target - $\beta 5i$ subunit of human immunoproteasome and approach the desired nucleophilic amino acid residue of the enzyme with its electrophilic »warhead«. Subsequently, the synthesized compounds should covalently interact with the catalytic threonine (Thr1) located in the active site of the immunoproteasome.

We started our synthetic pathways with Boc-protected 3-aminopiperidine and 4-aminopiperidine. With different reactions we prepared amides and amines. Amides were synthesized by the use of carboxylic acids with coupling reagents or with acid chlorides. For the synthesis of amines we used reductive amination with corresponding aldehydes. In the next step the Boc-protecting group was removed in acidic milieu. The compounds with free amino group were coupled with carboxylic acids containing various electrophilic »warhead«. We successfully synthesized eight potential covalent inhibitors of immunoproteasome, which will be biologically evaluated on the Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana.

Keywords: immunoproteasome, $\beta 5i$ subunit, aminopiperidine inhibitors

SEZNAM OKRAJŠAV

ATP	adenozin trifosfat
br	razširjeni signal (<i>jedrska magnetna resonanca</i>)
br s	široki singlet (<i>jedrska magnetna resonanca</i>)
Boc	<i>t</i> -butiloksikarbonilna skupina
cCP	konstitutivni proteasom
CDCl₃	devteriran kloroform
d	dublet (<i>jedrska magnetna resonanca</i>)
dd	dublet dubleta (<i>jedrska magnetna resonanca</i>)
DMF	dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
ER	endoplazemski retikulum
Et₃N	triethylamin
EtOAc	etilacetat
Et₂O	dietileter
E1	ubikvitin-aktivirajoči encim
E2	ubikvitin-konjugirajoči encim
E3	ubikvitin ligaza
FDA	Ameriška agencija za hrano in zdravila
HOBt	1-hidroksibenzotriazol
iCP	imunoproteasom
IFN-γ	interferon gama
IL	interleukin
IR	infrardeča spektroskopija
<i>J</i>	sklopitvena konstanta (<i>jedrska magnetna resonanca</i>)
m	multiplet (<i>jedrska magnetna resonanca</i>)
MeOH	metanol
MF	mobilna faza
MHC	poglavitni kompleks tkivne skladnosti
MHz	megahertz
MS	masna spektrometrija
NMR	jedrska magnetna resonanca
q	kvartet (<i>jedrska magnetna resonanca</i>)

R_f	retencijski faktor
s	singlet (<i>jedrska magnetna resonanca</i>)
t	triplet (<i>jedrska magnetna resonanca</i>)
TFA	trifluoroocetna kislina
THF	tetrahidrofuran
Thr	treonin
TLC	tankoplastna kromatografija
TNF-α	dejavnik tumorske nekroze alfa
Ub	ubikvitin
δ	kemijski premik (<i>jedrska magnetna resonanca</i>)
η	izkoristek reakcije
λ	valovna dolžina

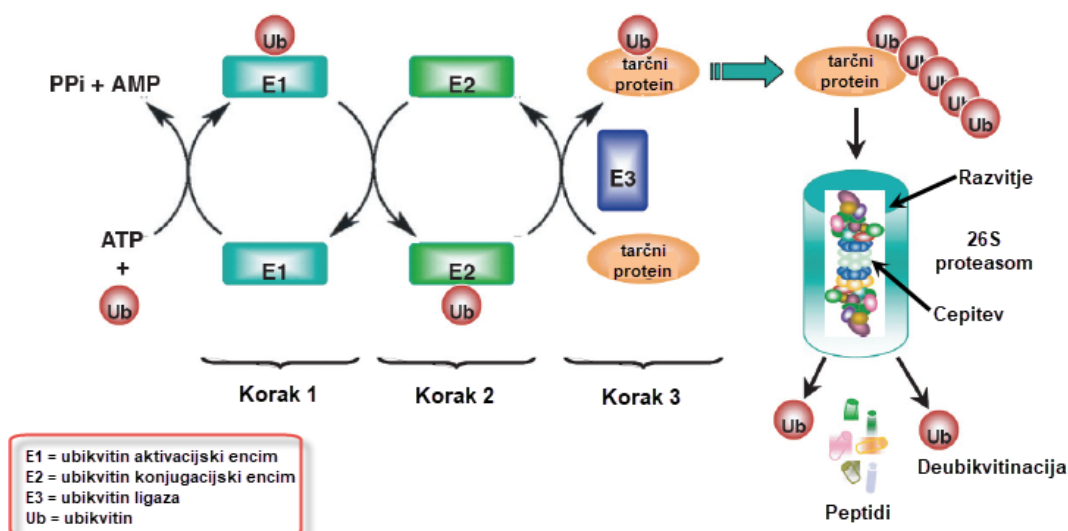
1. UVOD

Vsi znotrajcelični in številni zunajcelični proteini so podvrženi nenehni razgradnji in resintezi. Celice vsebujejo več proteolitičnih sistemov in zapletenih mehanizmov, ki zagotavljajo, da je proces razgradnje natančno uravnavan in da je preprečena prekomerna razgradnja celičnih sestavin. Evkariontske celice razgrajujejo proteine preko dveh sistemov. Zunajcelične in membranske proteine razgradijo lizosomi preko endocitoze, fagocitoze ali pinocitoze. Večina znotrajceličnih proteinov pa se razgradi preko ubikvitin-proteasomskega sistema (2). Tukaj ima ključno vlogo 26S proteasom, ki razgradi več kot 80 % proteinov v celicah sesalcev, vključno s hitro razgradnjo nepravilno zviti in regulatornih proteinov ter počasnejšo razgradnjo večine drugih celičnih proteinov. Zato je vloga proteasoma bistvena za homeostazo proteinov in vpliva na regulacijo večine celičnih procesov (1). Motnje v teh procesih vodijo v številne bolezni, pri katerih je bilo ugotovljeno povečano izražanje proteasoma in/ali imunoproteasoma, zato predstavljata proteasom, še posebej pa imunoproteasom pomembno tarčo za razvoj novih zdravilnih učinkovin.

1.1. Ubikvitin-proteasomski sistem

26S proteasom je zelo velik multikatalitični kompleks, ki razgrajuje ubikvitinirane proteine na majhne peptide. Ubikvitin (Ub) je majhen protein, ki je sestavljen iz 76 aminokislin. Ko je tarčni protein označen z ubikvitinom, je to signal za proteasom, da razgradi protein. Pri označevanju sodelujejo trije encimi, ki vežejo verige ubikvitina na proteine, namenjene za razgradnjo: E1 (*ubikvitin-aktivirajoči encim*), E2 (*ubikvitin-konjugirajoči encim*) ter E3 (*ubikvitin ligaza*). Ubikvitinacija se začne z aktivacijo ubikvitina preko aktivacijskega encima E1 v od ATP-odvisni reakciji. Terminalna karboksilna skupina ubikvitina se preko tioestrne vezi poveže s cisteinskim ostankom E1 (slika 1 - korak 1). Ubikvitin se nato prenese na eno od oblik konjugacijskega encima E2 (slika 1 - korak 2). Ključni encim v celotnem procesu pa je ubikvitin ligaza E3, ker prepozna specifični proteinski substrat in katalizira prenos aktiviranega ubikvitina iz E2 na tarčni protein (slika 1 - korak 3) (2, 3, 4). C-terminalni glicinski ostanek aktiviranega ubikvitina se preko izopeptidne vezi kovalentno veže na stransko NH₂ skupino lizina na substratu. Z zaporednim dodajanjem še več molekul Ub na isti protein, se sintetizira poliubikvitinska veriga (slika 1) (5). Na označen protein morajo biti vezane vsaj štiri molekule Ub, da proteasom prepozna protein. Označeni proteini se nato vežejo na 19S regulatorni del proteasoma, kjer se deubikvitinirajo in razvijejo.

Razviti proteini vstopijo v katalitični del kompleksa 20S, kjer se razgradijo na peptide velike od 3 do 22 aminokislin (2, 3, 4). Razcepljeni peptidi se nato sprostijo skupaj s prostim in ponovno uporabnim ubikvitinom. Peptide nadalje razgradijo citosolne amino- in karboksipeptidaze, majhen delež peptidov pa se prenese v membrane endoplazemskega retikuluma (ER), kjer se vežejo na molekule poglavitnega kompleksa tkivne skladnosti (MHC) razreda I in so predstavljene citotoksičnim T-celicam, ki sprožijo imunski odgovor (5).

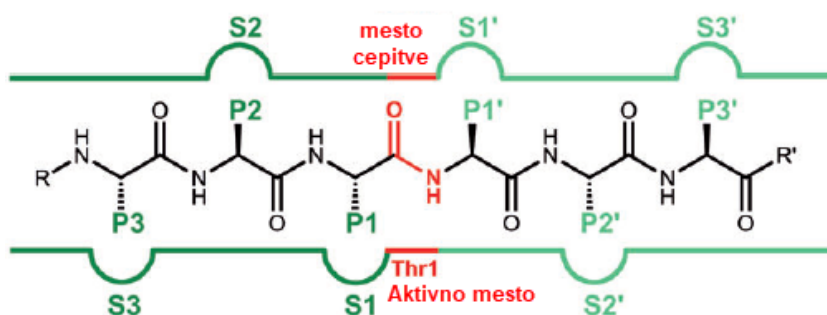


Slika 1: Ubikvitin-proteasomski sistem (prirejeno po 4)

1.2. Struktura proteasoma

26S proteasom (konstitutivna oblika) je multiproteinski kompleks, velik okoli 2,5 MDa, sestavljen iz jedrnega 20S dela (CP), ki je povezan z dvema regulatornima 19S deloma, vsakim na svoji strani (6). 19S regulatorna podenota prepozna ubikvitinirane proteine in depolimerizira ubikvitinsko verigo. Hkrati odpre odprtino v α -obroču, ki omogoči vstop substrata v proteolitični del. Ker odpiranje kanala in razvitje substrata zahtevata metabolno energijo, 19S podenota vsebuje šest različnih podenot ATPaz, ki razvijejo substrat in ga prenesejo v osrednji del (5). Osrednji del predstavlja 20S jedro. To je 720 kDa velika struktura v obliki sodčka, ki je sestavljena iz štirih zloženih obročev; dveh zunanjih α -obročev in dveh notranjih β -obročev. Vsak obroč je sestavljen iz sedmih podenot. Zunanja α -obroč nimata katalitične aktivnosti, zagotavljata pa strukturno celovitost proteina ter tvorita kanal skozi katerega vstopi substrat. Notranja β -obroč pa sta nosilca proteolitične aktivnosti. Vsak obroč vsebuje po tri podenote z katalitično aktivnostjo, ki razgrajujejo proteine ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$). Ker imamo dva β -obroč je v osrednjem delu šest aktivnih mest. $\beta 1$,

$\beta 2$, $\beta 5$ podenote so imenovane po encimih, ki imajo podobno proteolitično aktivnost (7, 8). $\beta 5$ -podenota ima kimotripsinu podobno proteolitično aktivnost, in cepi vezi za hidrofobnimi ostanki. $\beta 1$ -podenota cepi vezi kislih ostankov in ima kaspazi podobno aktivnost, $\beta 2$ -podenota pa ima tripsinu podobno proteolitično aktivnost in cepi vezi bazičnih ostankov. Za razliko od kimotripsina, tripsina in kaspaze, vse katalitične β -podenote vsebujejo *N*-terminalni treoninski ostanek znotraj njihovega aktivnega mesta, s katerim napadejo karbonilni C-atom v peptidni vezi, pri čimer se tvori intermediat acil-encim (7, 8, 9). Le-ta razpade po adiciji molekule vode in sprostijo se treoninski preostanek in peptida z novim C- in N-koncem. Trije žepki S1, S2, in S3, v katere se prilegajo stranske verige substrata P1, P2 in P3, predstavljajo vezavno mesto na proteasomu (slika 2). Na drugi strani pa so trije S'-žepki v katere se prilegajo P'-verige substrata. Med obema področjema je katalitično mesto za cepitev peptidne vezi (slika 2) (9).



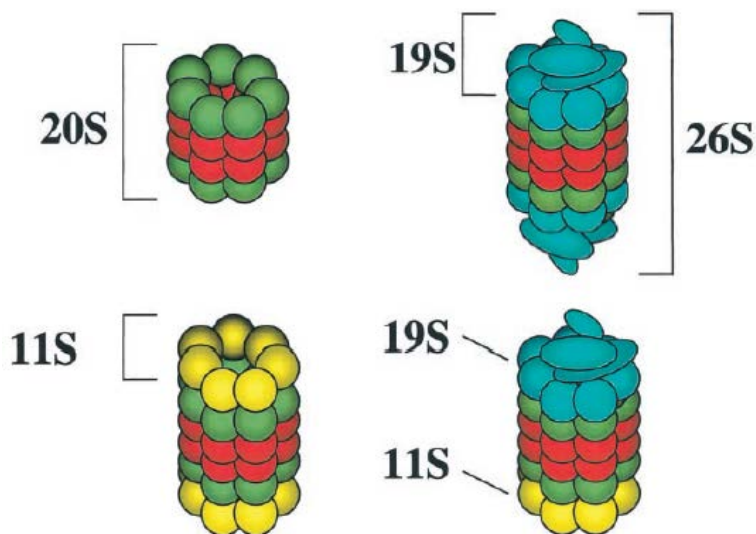
Slika 2: Vezavni žepki v aktivnem mestu proteasoma (prirejeno po 9)

Pri vretenčarjih najdemo tri vrste jedrnega dela (*CP*) in sicer *timoproteasom* (*tCP*), ki ga najdemo samo v epitelijskih celicah skorje timusa, *konstitutivni proteasom* (*cCP*), ki se nahaja v vseh tipih celic, ter *imunoproteasom* (*iCP*), ki ga najdemo v imunskih celicah, torej limfocitih in monocitih (9).

Kot smo že omenili, je konstitutivna oblika proteasoma 26S, (ki igra ključno vlogo v ubikvitin-proteasomskem sistemu) sestavljena iz 20S jedra, ki ima na oba konca vezana regulatorna 19S dela. Nekaj proteasomov v organizmu pa obstaja tudi v prosti 20S obliki. Ta oblika nima pripetega regulatornega dela, vendar lahko vseeno razgrajuje kratko živeče regulatorne proteine, nepravilno zvite proteine ali proteine poškodovane zaradi oksidativnega stresa (5, 10).

Poleg 19S regulatornega dela poznamo še 11S (PA28), ki obstaja v dveh oblikah odvisno od tega, ali je v jedru ali citoplazmi. Posledično ima 20S del lahko na eni strani vezan 19S del

na drugi pa 11S (PA28). Ta organizacija lahko zagotovi nastanek ustreznih peptidov, ki jih lahko prepoznajo molekule MHC razreda I in citotoksične T celice (5).



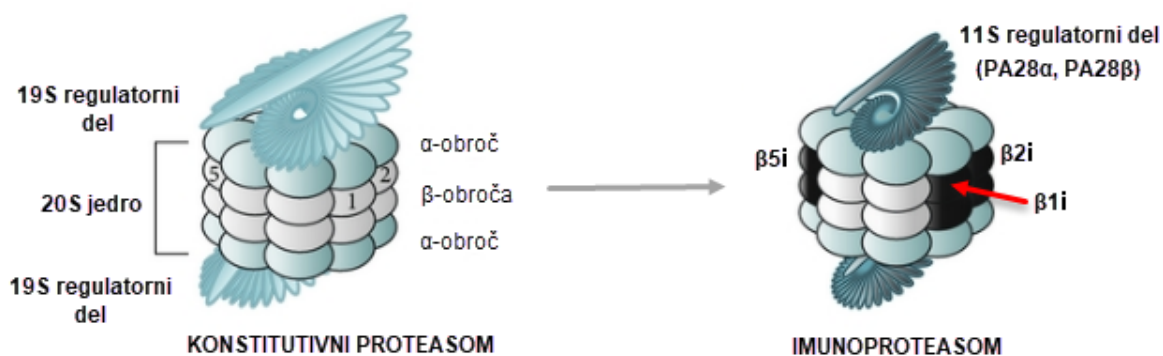
Slika 3: Oblike proteasoma, ki jih najdemo v evkariontih (prirejeno po 3)

1.3. Struktura imunoproteasoma

Imunoproteasom se izraža pretežno v celicah organov imunskega izvora, kot so vranica, timus, kostni mozeg, bezgavke, v manjšem deležu pa ga najdemo tudi v možganih, pljučih, jetrih ter debelem in tankem črevesu.

Ko je celica izpostavljena vnetnim dejavnikom, kot sta IFN- γ in TNF- α , se pet proteasomskih podenot konstitutivnega proteasoma zamenja z učinkovitejšimi podenotami: $\beta 1$ se nadomesti z $\beta 1i$ (LMP-2, PSMB-9), $\beta 2$ z $\beta 2i$ (LMP-10, MECL-1), $\beta 5$ z $\beta 5i$ (LMP7, PSMB8), regulatorni 19S del pa se nadomesti s regulatornim 11S delom (PA28) (slika 4). 11S je aktivator peptidazne aktivnosti 20S proteasoma, ki je sestavljen iz proteasomskih aktivatorjev PA28 α in PA28 β . Ta spremenjeni proteasom opravlja svoje proteolitske funkcije bolj učinkovito kot cCP, saj ne razgrajuje le ubikvitiniranih proteinov, ampak tudi virusne ter oksidirane proteine (4, 11).

Za razliko od cCP, ima iCP močno zmanjšano kaspazno aktivnost ter povečano kimotripsinsko in tripsinsko proteolitično aktivnost; posledično ima večjo afiniteto za cepitev peptidov s hidrofobnimi in bazičnimi ostanki. Rezultat tega je nastanek peptidnih fragmentov, optimiziranih za vezavo na MHC-I in predstavitev citotoksičnim T-celicam, kar vodi v sprožitev imunskega odziva (12).

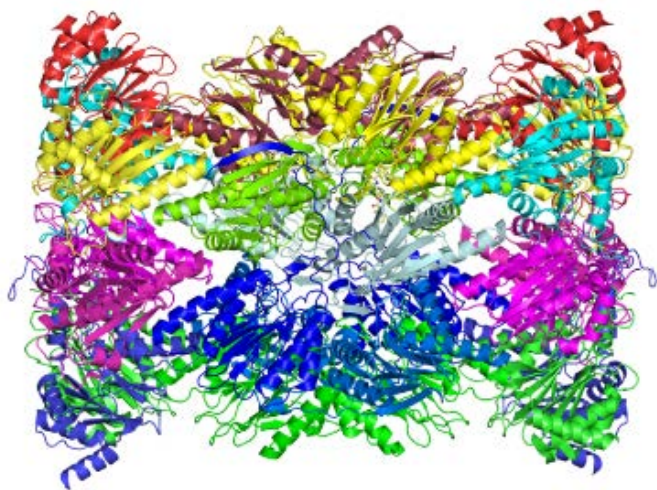


Slika 4: Shematski prikaz konstitutivnega proteasoma in imunoproteasoma (prirejeno po 11)

1.3.1. Imunoproteasom in bolezni

Povečano izražanje imunoproteasoma je bilo ugotovljeno pri številnih boleznih, kot so:

- *infekcije*
- *vnetne in avtoimunske bolezni (ulcerozni kolitis, Crohnova bolezen, vnetna črevesna bolezen, hepatitis, revmatoidni artritis, multipla skleroza)*
- *rakava obolenja (rak pljuč, debelega črevesa, multipli mielom, rak prostate)*
- *bolezni centralnega živčnega sistema (Alzheimerjeva bolezen, Huntingtonova bolezen, amiotrofična lateralna skleroza)*
- *degeneracija rumene pege, miofibrilarne miopatije, miozitis inkluzijskih telesc (13, 14).*



Slika 5: Struktura humanega imunoproteasoma (povzeto po 15)

1.4. Zaviralci proteasoma

Proteasom razgrajuje veliko regulatornih molekul celičnega cikla, vključno s ciklinom B1, zaviralci od ciklina-odvisnih kinaz, ter supresorjev tumorja. Zaviranje proteasoma vodi h kopičenju teh regulatornih celičnih proteinov, kar povzroči celično krizo in sproži apoptozo (programirana celična smrt). Ker je proteasom tako učinkovit, bi morda pomislili, da bi bilo najbolje povečati njegovo aktivnost v tumorskih celicah. V resnici je ravno nasprotno; raziskovanje je usmerjeno v zaviranje njegovega delovanja. Utemeljitev je v tem, da proteasom odstranjuje tudi regulatorne proteine, ki so »dobro opravili svoje delo« (7, 16). Pomembno pa je tudi dejstvo, da so rakave celice veliko bolj občutljive na zaviranje proteasoma kot normalne zdrave celice, saj so bolj odvisne od visoke ravni proteasomske aktivnosti, da ohranijo dinamično homeostazo proteinov, ki je potrebna za povečano presnovo in neomejeno proliferacijo (1). Zaviralci proteasoma so se izkazali za pomembne zdravilne učinkovine, ki so podaljšale življenje številnim bolnikom z multiplim mielomom. S strani Ameriške agencije za hrano in zdravila (FDA) so trenutno odobrene protirakave učinkovine bortezomib, karfilzomib in iksazomib. Oprozomib in delanzomib pa sta v kliničnih študijah (17).

Zaviralci so večinoma majhne peptidne molekule, ki imajo na C-terminalnem koncu elektrofilno »bojno glavo« in posnemajo vezavo naravnih substratov v aktivnem mestu proteasoma. »Bojna glava« se lahko reverzibilno ali ireverzibilno veže na nukleofilno hidroksilno skupino Thr β 1, β 2, β 3 podenot. Nastane intermediat acil-encim ter nov peptidni fragment, ki ima prosti N-konec. Nato poteče hidroliza acil-encima v prisotnosti vode in treoninski ostanek se ponovno regenerira.

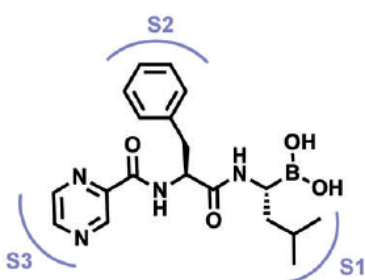
Zaviralci večinoma delujejo tako na iCP kot tudi na cCP, glede na njihov elektrofilni center pa jih razdelimo na: aldehide, vinil sulfone, vinil amide, boronate, β -laktone ter α ' β '-epoksiketone in α -ketoaldehide (9).

1.4.1. Neselektivni zaviralci proteasoma in imunoproteasoma

1.4.1.1. Bortezomib

Bortezomib je prvi selektivni, reverzibilni zaviralec proteasoma, ki ga je leta 2003 odobrila FDA. Je dipeptid boronske kisline, ki se uporablja za zdravljenje multipleg mieloma in limfoma plaščnih celic. Poleg tega se bortezomib testira v kliničnih študijah za zdravljenje solidnih tumorjev, vključno z nedrobnoceličnim pljučnim rakom, dokazal pa je tudi terapevtsko učinkovitost pri transplantaciji ledvic. Bortezomib se v enaki meri kovalentno

reverzibilno veže na podenoti $\beta 5i$ in $\beta 5c$, ima pa tudi majhno afiniteto do aktivnega mesta $\beta 1$ -podenote proteasoma. To nespecifičnost glede podenot $\beta 5i$ in $\beta 5c$ lahko razložimo z ugodnimi interakcijami N-terminalnega pirazinskega dela bortezomiba z aminokislinami, ki obdajajo žep S3. Bortezomib deluje preko tvorbe boronatne vezi s treoninom v aktivnem mestu proteasoma. Terapija z bortezomibom ima več pomanjkljivosti, vključno z intravensko uporabo in neželenimi učinki, kot so trombocitopenija, nevtropenija ter gastrointestinalne težave. Več kot 30 % bolnikov, zdravljenih z bortezomibom, trpi tudi zaradi hudih, vendar reverzibilnih nevrodegenerativnih učinkov, vključno z nevrotoksičnostjo, in zmanjšanjem hitrosti prevajanja živčnih impulzov (9).



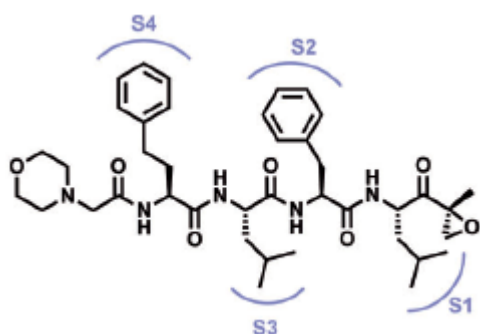
Slika 6: Strukturna formula bortezomiba (prirejeno po 9)

Druga generacija zaviralcev proteasoma

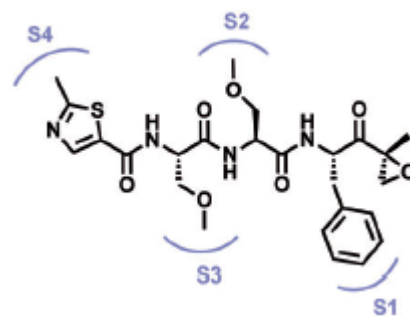
1.4.1.2. Karfilzomib in oprozomib

Karfilzomib je drugi zaviralec proteasoma, ki ga je 2012 odobrila FDA za zdravljenje multipleg mieloma in solidnih tumorjev. Je tetrapeptidni derivat epoksomicina (naravnega produkta), ki bolj selektivno zavira $\beta 5i$ in $\beta 5c$ kot bortezomib. Zaradi unikatnega mehanizma delovanja preko tvorbe morfolinskega obroča, je tako kot ostali epoksiketoni selektiven za Ntn hidrolaze. Z elektrofilno epoksiketonsko »bojno glavo« se ireverzibilno veže na katalitični ostanek Thr1 proteasoma. Povzroča podobne neželene učinke kot bortezomib z izjemo nevrotoksičnosti. Slaba biološka uporabnost po peroralni aplikaciji (zato se aplicira intravensko) in kratka razpolovna doba sta vodili do razvoja zaviralca, ki se lahko aplicira peroralno – oprozomib, ki se trenutno testira v kliničnih študijah za zdravljenje solidnih tumorjev in hematoloških rakavih obolenj (9).

Pri ponovitvi multipleg mieloma, se je za zelo učinkovito izkazala kombinacija karfilzomiba z lenalidomidom in deksametazonom. Znatno se je izboljšalo preživetje brez napredovanja bolezni (18).



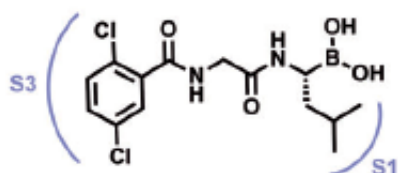
Slika 7: Strukturna formula karfilzomiba (prirejeno po 9)



Slika 8: Strukturna formula oprozomiba (prirejeno po 9)

1.4.1.3. Iksazomib

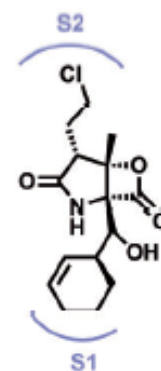
Borinat iksazomib je reverzibilni zaviralec proteasoma, katerega glavna prednost je peroralna aplikacija. Uporablja se v obliki predzdravila iksazomibcitrata, ki v plazmi hidrolizira do biološko aktivne kisline. Le-ta zavira kimotripsinu podobno β 5-podenoto. V primerjavi z bortezomibom ima boljše farmakokinetične in farmakodinamske lastnosti. Študije, izvedene na bolnikih z multiplim mielomom, so pokazale, da ima iksazomib izraženo protirakavo delovanje, zato ga je 2015 FDA odobrila za zdravljenje te bolezni, tudi v kombinacijah z drugimi učinkovinami, kot so lenalidomid in deksametazon. Novejše raziskave so pokazale, da je učinkovit tudi pri drugih vrstah tumorskih celic (19).



Slika 9: Strukturna formula iksazomiba (prirejeno po 9)

1.4.1.4. Marizomib

Marizomib, sekundarni metabolit morske aktinomicete *Salinispora tropica* je najmanjši do zdaj znani zaviralec proteasoma. V primerjavi z ostalimi β -laktoni dlje ireverzibilno zavira proteasom, predvsem β 2 in β 5-podenoto. Čeprav ga lahko apliciramo peroralno, ker se dobro absorbira iz prebavnega trakta, je njegova slabost kratka biološka razpolovna doba.



Slika 10: Strukturna formula marizomiba (prirejeno po (9))

Deluje tako, da Thr napade karbonilni C-atom marizomiba, kar vodi v odprtje β -laktonskega obroča, nastanek hidroksilne skupine ter acil-encimskega estera. Nato kloroetilni del marizomiba reagira s hidroksilno skupino, ob tem pa izstopi klorid in nastane tetrahidrofuranski obroč. Klinične študije kažejo dobre rezultate pri zdravljenju multiplegga mieloma, levkemije in solidnih tumorjev (9).

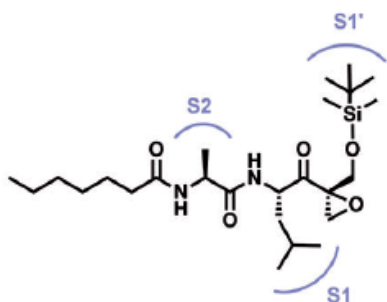
1.4.2. Selektivni zaviralci imunoproteasoma

Zelo obetaven pristop pri zdravljenju avtoimunskih bolezni in različnih vrst raka, je uporaba zaviralcev, ki specifično zavirajo iCP, ki je pretežno v celicah hematološkega izvora, z zelo majhnim izražanjem v drugih vrstah celic. Specifično delovanje na iCP zagotavlja možnost za zmanjšanje neželenih učinkov, kot so periferna nevropatija in gastrointestinalne težave. Poleg tega višja raven izražanja iCP vodi v večjo občutljivost levkemičnih celic na zaviralce, kar kaže na to, da je ciljanje samo na iCP lahko učinkovito pri hematoloških malignih obolenjih (20).

Čeprav so razlike v delovanju med iCP in cCP še vedno nekoliko nejasne, so bile nekatere od njih vseeno izkoriščene za razvoj selektivnih zaviralcev (21). Na specifičnost vplivajo predvsem razlike v vezavnih žepih (S) med posameznimi podenotami proteasoma, v katere se vežejo različne stranske skupine P zaviralcev oziroma substratov. Razliko, najpomembnejšo za razgradnjo proteinov, najdemo predvsem pri S1 vezavnem žepu. β 5i podenota ima večji vezavni žep S1 kot β 5c, zato lahko veže večjo stransko verigo P1. Najpomembnejše pa je, da je S1 vezavni žep β 5i bolj hidrofoben v primerjavi z β 5c, zato lahko veže razne lipofilne fragmente (npr. fenil). Razliko najdemo tudi pri S3 vezavnem žepu med β 5i in β 5c; β 5i za razliko od β 5c, veže na tem mestu majhne polarne ostanke. β 1-podenoti tako konstitutivnega kot tudi imunoproteasoma, imata manjši vezavni žep S1 kot β 5 podenoti. β 1i-vezavni žep S1 je bolj hidrofoben od β 1c, S3 žep iCP pa je polarnejši in manjši kot pri β 1c. Selektivnosti med β 2i in β 2c ne moremo doseči, saj so razlike v vezavnih žepih minimalne (21).

1.4.2.1. UK-101

UK-101 je bil s kemijsko strukturo osnovano na dihidroeponeomicinu, prvi β 1i-selektivni zaviralec. Povzroči smrt tumorskih celic prostate, katerih lastnost je prekomerno izražanje β 1i podenote. Selektivnost za omenjeno podenoto je dosežena z dolgo lipofilno heptanojsko verigo na P3 mestu, ki se veže v S3 vezavni žep (9).

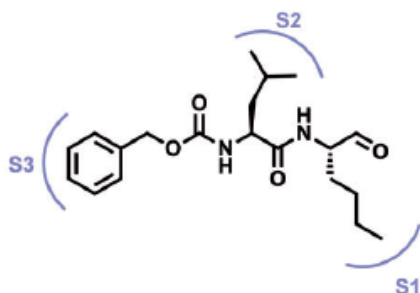


Slika 11: Strukturna formula UK-101 (prirejeno po 9)

1.4.2.2. IPSI-001

IPSI-001 je peptidni aldehyd in β 1i-selektivni zaviralec. Njegov elektrofilni karbonilni ogljik reagira z N-terminalnim treoninskim ostankom proteolitične β -podenote, pri čemer nastane hemiacetal. V hematoloških tumorskih celicah inducira apoptozo in je bistveno manj citotoksičen za zdrave celice. Ker je kot aldehyd občutljiv na oksidacijo, se zlahka inaktivira, zato ima omejen terapevtski potencial.

In vitro so peptidni aldehydi uspešni zaviralci, vendar imajo veliko slabosti, kot so slabe farmakokinetične lastnosti, slaba selektivost (ciljajo tudi serinske in cisteinske proteaze) ter inaktivacija z oksidacijo (7).

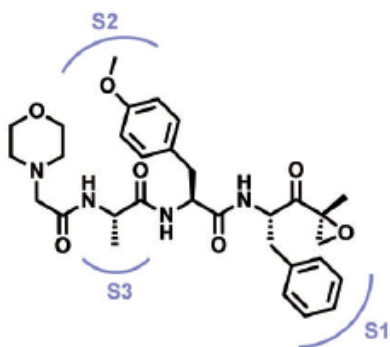


Slika 12: Strukturna formula IPSI-001 (prirejeno po 9)

1.4.2.3. ONX-0914

ONX-0914 je prvi znan β 5i-selektivni ireverzibilni zaviralec, ki s 40-krat večjo jakostjo zavira β 5i kot β 5c podenoto. Je α,β -epoksiketon in je bil prvotno razvit kot protirakava učinkovina, a se je kasneje bolj izkazal pri zdravljenju avtoimunskih bolezni. Ta selektivni zaviralec je v kliničnih preskušanjih za zdravljenje sistemskega eritematoznega lupusa, vnetne črevesne bolezni in revmatoidnega artritisa. Ima imunosupresivni učinek, saj zavira nastanek protivnetnih citokinov interlevkina 1 (IL-1), IL-6 in dejavnika tumorske nekroze α (TNF- α). Prav tako zavira nastanek interferona- γ , IL-2 ter IL-23 v aktiviranih monocitih (9,

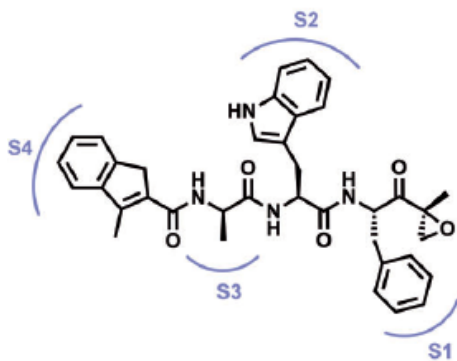
12). Razlika v velikosti S1-žepka med $\beta 5i$ in $\beta 5c$ je razlog za selektivnost učinkovine. $\beta 5i$ -podenota ima večji S1-žep kot $\beta 5$ -podenota konstitutivnega proteasoma, zaradi drugačne orientiranosti Met45 ostanka. Reakcija ONX-0914 s Thr konstitutivnega proteasoma povzroči translokacijo Met45; pride do steričnih ovir in učinkovina se ne more vezati v S1 žep konstitutivnega proteasoma, zato je selektivna za iCP. ONX-0914 je selektiven, ker se z aromatskim obročem veže v S1-vezavni žep in ker ima nekoliko bolj polaren fragment, ki se veže v S3-vezavni žep $\beta 5i$ -podenote (9).



Slika 13: Strukturna formula ONX-0914 (prirejeno po 9)

1.4.2.4. PR-924

PR-924 je tripeptidni epoksiketon, ki selektivno zavira $\beta 5i$. Do $\beta 5i$ -podenote ima 100-krat večjo selektivnost kot karfilzomib in dokazano zavira rast humanih celic multiplega mieloma in primarnih tumorskih celic ter zavira rast tumorjev na živalskih modelih (20).

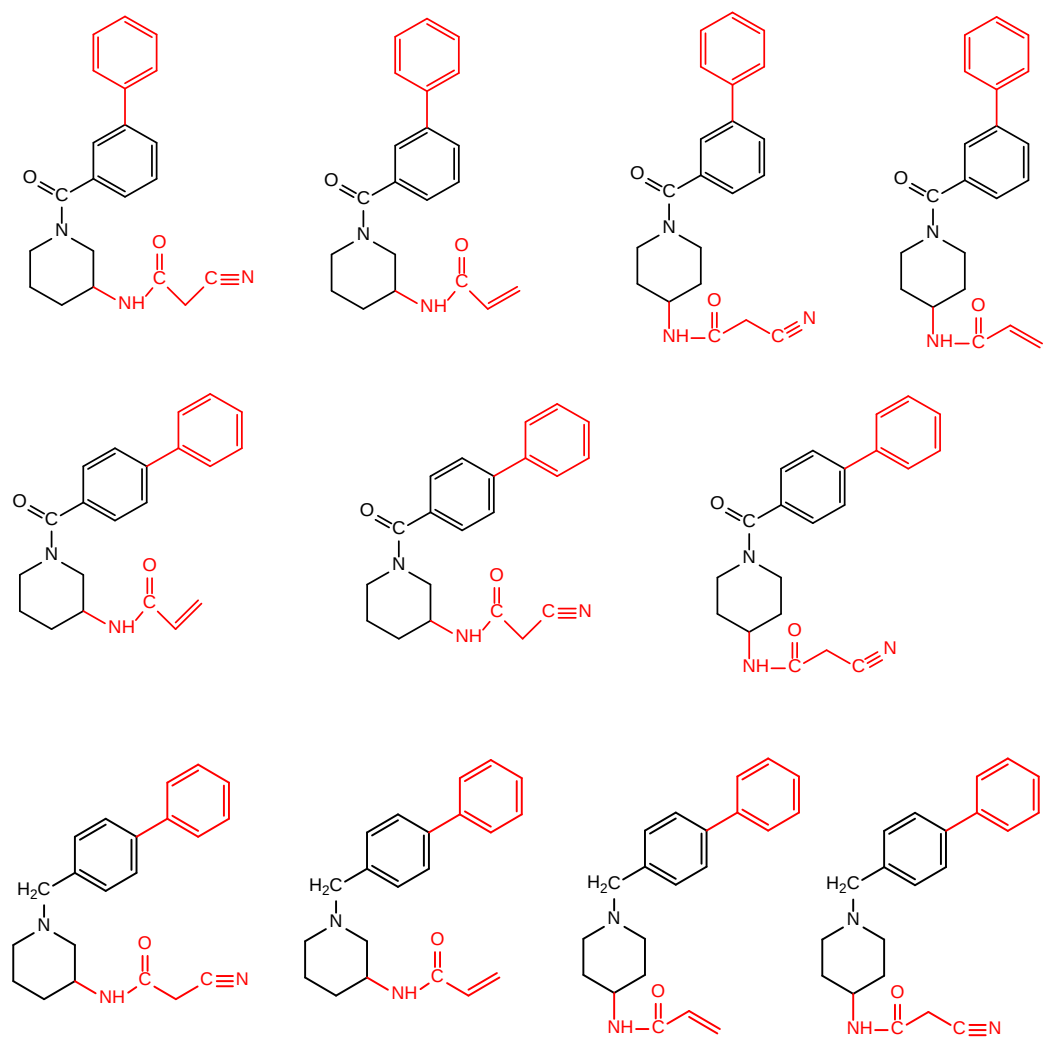


Slika 14: Strukturna formula PR-924 (prirejeno po 9)

2. NAMEN DELA

Zelo obetaven pristop pri zdravljenju avtoimunskih bolezni in različnih vrst raka je uporaba specifičnih zaviralcev imunoproteasoma. Na trgu je že nekaj učinkovin, ki pa so neselektivne, saj zavirajo tako podenote proteasoma kot tudi imunoproteasoma. Specifično delovanje na iCP zagotavlja možnost zmanjšanja neželenih učinkov, kot so periferna nevropatija in gastrointestinalne težave. Namen dela je sinteza zaviralcev, ki bi bili selektivni in bi zavirali samo $\beta 5i$ -podenoto humanega imunoproteasoma. V magistrski nalogi se bomo posvetili načrtovanju in sintezi kovalentnih zaviralcev treoninskih proteaz. Le-tem bo skupen aminopiperidinski skelet, ki ga bomo substituirali z različnimi fragmenti. Najprej želimo, da se naša spojina nekovalentno veže na tarčo – $\beta 5i$ -podenoto humanega imunoproteasoma in s svojo elektrofilno »bojno glavo« pride v bližino nukleofilnega aminokislinskega ostanka proteina. Nato naj bi sintetizirane spojine kovalentno reagirale s katalitičnim treoninom (Thr1), ki je v aktivnem mestu imunoproteasoma. Sicer sta akrilamidna in ciano skupina bolj tipični »bojni glavi« za cisteinske proteaze in ne toliko za treoninske proteaze, vendar bomo vseeno preverili, če to velja tudi za imunoproteasom.

Kot osnovo za sintezo spojin bomo uporabili Boc (*t*-butiloksikarbonilna skupina) zaščitena 3-aminopiperidin in 4-aminopiperidin. Z različnimi reakcijami bomo sintetizirali amide in amine s planarnim aromatskim obročem. Eno skupino amidov bomo sintetizirali s pomočjo sklopitvenih reagentov, drugo pa z uporabo kislinskih kloridov. Za sintezo aminov bomo uporabili reakcijo reduktivnega aminiranja. V naslednji stopnji sinteze bomo pripravljenim spojinam odstranili Boc zaščitno skupino in na amski del molekule uvedli različne substituentne s tvorbo amidne vezi (pripenjali bomo akrilno in cianoacetno kislino). Dobili bomo potencialne kovalentne zaviralce treoninskih proteaz, ki jim bomo določili zaviralno aktivnost na izolirani $\beta 5i$ -podenoti imunoproteasoma.



Slika 15: Strukturne formule načrtovanih končnih spojin

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Materiali

Reagenti in topila:

Pri eksperimentalnem delu v laboratoriju smo uporabljali topila in reagente različnih proizvajalcev: Sigma-Aldrich, Acros Organics, Fluka in Merck. Pri izolacijah in pri pripravi raztopin smo uporabljali prečiščeno vodo.

3.2. Metode

3.2.1. Kromatografske metode

Tankoplastna kromatografija (TLC)

TLC smo uporabljali za spremljanje poteka kemijskih reakcij, istovetenje, ugotavljanje čistosti produkta ter za določanje najprimernejše mobilne faze za čiščenje produktov s kolonsko kromatografijo. Pri TLC analizi smo kot stacionarno fazo uporabljali plošče DC Kieselgel 60 F₂₅₄ proizvajalca Merck (Darmstadt, Nemčija) z 0,2 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem. Uporabljali smo različne mobilne faze, ki so navedene pri posameznih eksperimentih.

Za detekcijo spojin na silikagelnih ploščah smo uporabljali UV detektor pri valovni dolžini 254 nm ter orositvene reagente ninhidrin, 2,4-dinitrofenilhidrazin in bromkrezolno zeleno.

Kolonska kromatografija

Za čiščenje produktov reakcij ter končnih spojin smo uporabljali kolonsko kromatografijo. Kolone, ki smo jih uporabljali so bile steklene, različnih premerov in dolžin, odvisno od mase vzorca. Kot stacionarno fazo smo uporabljali SilicaGel 60 z velikostjo delcev 0,04-0,063 mm, proizvajalca Merck. Mobilne faze, ki smo jih uporabili, so navedene pri posameznih sinteznih postopkih. Zbranim frakcijam, ki so vsebovale našo končno spojino, smo uparili topilo pod znižanim tlakom ter identiteto potrdili s spektroskopskimi metodami.

3.2.2. Spektroskopske metode

Jedrsko magnetna resonanca (NMR)

NMR spektre smo posneli na Fakulteti za Farmacijo v Ljubljani na Bruker Avance DPX 400 MHz spektrometru. Vzorce smo raztopili v devteriranih topilih DMSO-d₆ in CDCl₃. Kot interni standard smo uporabili tetrametilsilan (TMS). Spektre smo obdelali s programom Mest-ReC. Kemijski premiki (δ) so podani v ppm, sklopitvene konstante (J) pa v Hz.

Masna spektrometrija (MS)

Masne spektre smo posneli na spektrometru Advion expression L na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Uporabljena tehnika ionizacije je bila ESI (*electrospray ionisation*).

Infrardeča spektroskopija (IR)

IR spektre smo posneli na spektrometru Perkin Elmer Spectrum BX System FT-IR na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Uporabljali smo ATR (attenuated total reflectance – oslabljena popolna odbojnost) tehniko snemanja.

Določanje temperature tališč

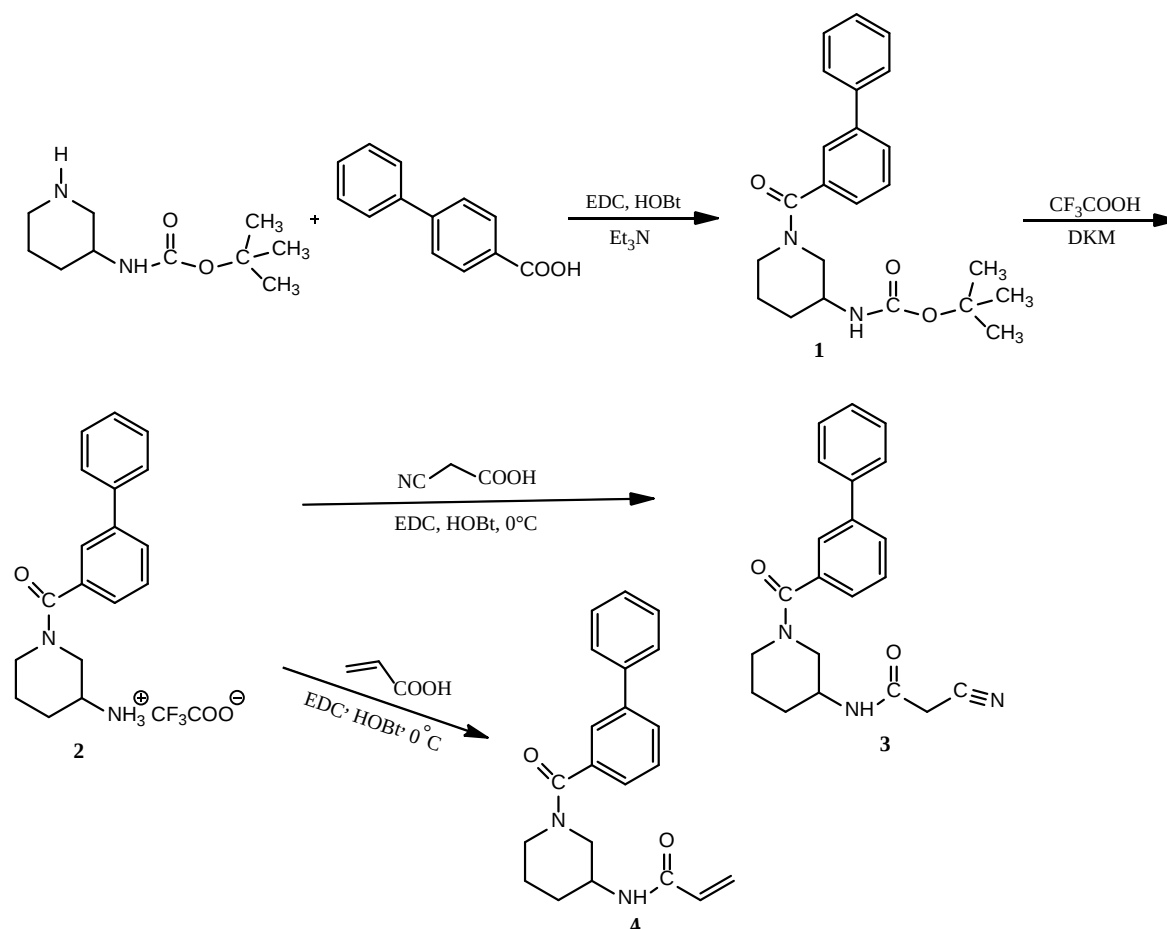
Nekorigirane talilne intervale spojin smo določili na Kofflerjevem talilnem mikroskopu z ogrevalno mizico Leica.

Računalniška programska oprema:

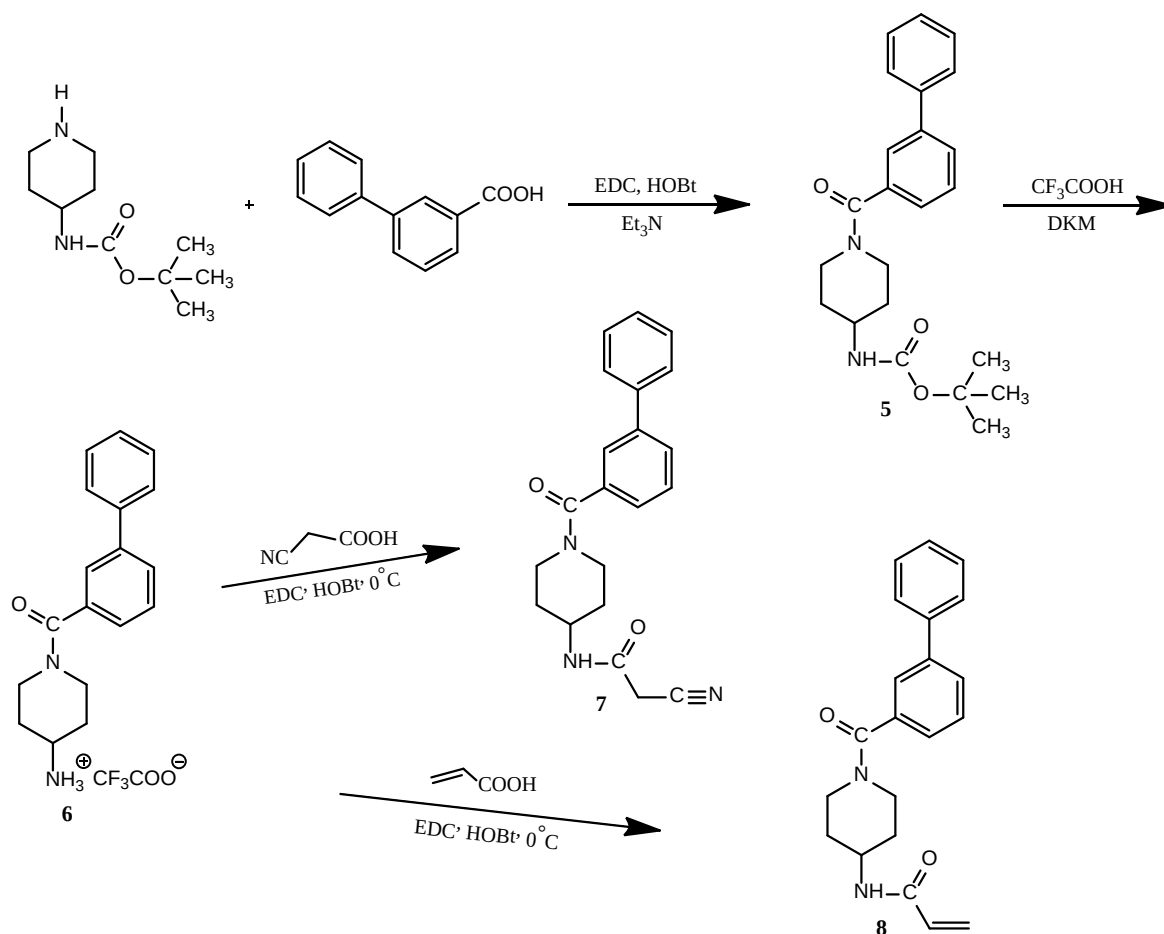
Za poimenovanje spojin in risanje kemijskih struktur ter reakcijskih shem smo uporabili računalniški program ChemBioDraw Ultra 16.0 podjetja Perkin Elmer Informatics. Spojine ki smo jih sintetizirali smo določali iz ¹H in ¹³C NMR spektrov. Spektre NMR smo procesirali s programom MestRe-C 4.8.6.0 podjetja Mestrelab Research, S.L. Znanstvene članke in sintezne postopke smo iskali s pomočjo podatkovne zbirke SciFinder Scholar in brskalnika ScienceDirect.

4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1. Sinteza bifenil-3-acetamidnih derivatov



Slika 16: Reakcijska shema sinteze *N*-(1-([1,1'-bifenil]-3-karbonil)-piperidin-3-il)-2-cianoacetamida (**3**) ter *N*-(1-([1,1'-bifenil]-3-karbonil)piperidin-3-il)akrilamida (**4**)



Slika 17: Reakcijska shema sinteze *N*-(1-([1,1'-bifenil]-3-karbonil)piperidin-4-il)-2-cianoacetamida (**7**) in *N*-(1-([1,1'-bifenil]-3-karbonil)piperidin-4-il)akrilamida (**8**)

4.1.1. Sinteza *tert*-butil (1-([1,1-bifenil]-3-karbonil)piperidin-3-il)karbamata (**1**)

50 mL suho bučko smo prepihali z argonom in vanjo zatehtali 0,250 g (1,249 mmol, 1,0 ekviv.) bifenil-3-karboksilne kisline, 0,218 g (1,624 mmol, 1,3 ekviv.) HOBt ter 0,311 g (1,624 mmol, 1,3 ekviv.) EDC. Nato smo dodali 30 mL diklorometana (DKM), 0,8 mL (5,736 mmol, 4,59 ekviv.) trietilamina (Et₃N) ter kapljico dimetilformamida (DMF) in mešali na ledeni kopeli 30 minut. Celotni čas mešanja smo vzdrževali argonovo atmosfero. Nato smo v bučko dodali 0,250 g (1,249 mmol, 1,0 ekviv.) Boc-zaščitenega 3-aminopiperidina in reakcijsko zmes pustili 24 ur ob mešanju na sobni temperaturi pod argonovo atmosfero. Naslednji dan smo reakcijsko zmes prenesli v lij ločnik in dodali 40 mL DKM. Reakcijsko zmes smo spirali s citronsko kislino (10 % citronske kisline v vodi, 2 × 25 mL), z natrijevim hidrogenkarbonatom (NaHCO₃) (nasičena raztopina v vodi, 1 × 40 mL) nato pa še z natrijevim kloridom (NaCl) (nasičena raztopina v vodi, 1 × 40 mL). Organski fazi smo nato dodali sušilno sredstvo natrijev sulfat (Na₂SO₄), ter po 30 minutah filtrirali s presesavanjem in s pomočjo rotavaporja uparili organsko topilo pri znižanem

tlaku. Pridobili smo olje (svetlo rjave barve), ter ga očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc : heksan = 2:1).

4.1.2. Sinteza *terc*-butil (1-[1,1'-bifenil]-3-karbonil)piperidin-4-il)karbamata (**5**)

Pri sintezi spojine **5** smo uporabili identični postopek kot pri sintezi spojine **1**, pri čemer smo uporabili 0,620 g (3,14 mmol, 1,0 ekviv.) bifenil-3-karboksilne kisline, 0,565 g (4,082 mmol, 1,3 ekviv.) HOBt, 0,78 g (4,082 mmol, 1,3 ekviv.) EDC ter 0,323 g (3,14 mmol, 1,0 ekviv.) Boc-4-aminopiperidina. Izolirali smo rjave lepljive kristale (0,691 mg, η = 57,7 %).

Spojina **1**:

Molekulska formula: C₂₃H₂₈N₂O₃

Molekulska masa: 380,49 g/mol

Izgled: bela puhasta lepljiva zmes

Tališče: 55-58,5°C

TLC: R_f = 0,4 (MF = EtOAc : heksan = 2 : 1)

Izkoristek: 0,328 g, η = 69,1 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.00 – 1.03 (m, 1H, OCNCH₂CH₂CH₂), 1.28 – 1.41 (m, 9H, Boc), 1.62 – 1.71 (m, 1H, OCNCH₂CH₂CH₂), 1.80 – 1.86 (m, 1H, OCNCH₂CH₂CH₂), 2.77 – 3.07 (br, 2H, OCNCH₂CH₂CH₂), 3.43 – 3.45 (m, 1H, OCNCH₂CH₂CH₂), 3.59 – 3.64 (m, 1H, OCNCH₂CH₂CH), 4.03 (q, 1H, OCNCH₂CH₂CH), 4.27 – 4.35 (m, 1H, CHNH), 6.94 – 7.02 (m, 1H, CHNH), 7.36 – 7.54 (m, 5H, Ar-H), 7.65 – 7.74 (m, 4H, Ar-H)

MS (ESI+): m/z = 402,73 [M+Na]⁺, izračunan m/z = 380

IR (ATR): ν [cm⁻¹] = 618, 696, 747, 865, 1023, 1164, 1243, 3304, 1305, 1365, 1442, 1511, 1622, 1699, 2937

Spojina **5**:

Molekulska formula: C₂₃H₂₈N₂O₃

Molekulska masa: 380,48 g/mol

Izgled: bela puhasta lepljiva zmes

Tališče: 78-90°C

TLC: R_f = 0,46 (MF = EtOAc : heksan = 2 : 1)

Izkoristek kromatografije: 566,9 mg, η = 82 %

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 1.26 (t, $J_1=7.14$, $J_2=7.15$, 1H, OCNCH₂CH₂CH₂), 1.31 – 1.35 (m, 1H, OCNCH₂CH₂CH₂), 1.44 (s, 9H, Boc), 1.93 – 1.97 (m, 1H, OCNCH₂CH₂CH₂), 2.05 (m,

1H, OCNCH₂CH₂), 2.95 – 3.04 (m, 1H, OCNCH₂CH₂), 3.09 – 3.18 (m, 1H, OCNCH₂CH₂), 3.72 – 3.79 (m, 2H, OCNCH₂CH₂), 4.49 – 4.50 (m, 1H, CHNH), 4.62 – 4.67 (m, 1H, CHNH), 7.34 – 7.49 (m, 5H, Ar-H), 7.58 – 7.65 (m, 4H, Ar-H)

MS (ESI+): m/z = 381,2 [M+H]⁺, m/z = 403,2 [M+Na]⁺, izračunan m/z = 380,21

IR (ATR): ν [cm⁻¹] = ν [cm⁻¹] = 517, 600, 615, 691, 709, 719, 735, 758, 795, 827, 859, 920, 941, 995, 1019, 1042, 1077, 1116, 1159, 1181, 1232, 1318, 1396, 1426, 1451, 1488, 1522, 1672, 2968.

4.1.3. Sinteza 1-([1,1'-bifenil]-3-karbonil)piperidin-3-amin-2,2,2-trifluoroacetata (**2**)

Spojino **1** (0,274 g, 0,72 mmol, 1 ekviv.) smo raztopili v 5 mL DKM, dodali 2,5 mL (32,67 mmol, 45,38 ekviv.) TFA in mešali na sobni temperaturi v argonovi atmosferi eno uro. Ko je reakcija potekla (določitev s TLC), smo uparili topilo pri znižanem tlaku, dodali 10 mL dietiletra (Et₂O) ter postavili zmes na 4°C za 24 ur. Nastalo oborino smo filtrirali z odsesavanjem ter sušili pod znižanim tlakom.

4.1.4. Sinteza 1-([1,1'-bifenil]-3-karbonil)piperidin-4-amin-2,2,2-trifluoroacetata (**6**)

Pri sintezi spojine **6** smo uporabili identični postopek kot pri sintezi spojine **2**, pri čemer smo uporabili 566,9 mg spojine **5** (1,49 mmol, 1 ekviv.), 10 mL DKM in 5 mL TFA (65,34 mmol, 43,85 ekviv.).

Spojina **2**:

Molekulska formula: C₁₈H₂₁N₂O⁺ C₂F₃O₂⁻

Molekulska masa: 281,16 g/mol + 112,99 g/mol = 394,15 g/mol

Izgled: skoraj bela oborina

Tališče: 68-75°C

TLC: R_f = 0 (MF = EtOAc : heksan = 2 : 1)

Izkoristek: 282,55 mg, η = 99,56 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.53 – 1.60 (m, 2H, OCNCH₂CH₂), 1.60 – 1.77 (m, 1H, OCNCH₂CH₂CH₂), 1.99 – 2.03 (m, 1H, OCNCH₂CH₂CH₂), 3.03 – 3.23 (m, 2H, OCNCH₂), 3.41 – 3.45 (m, 1H, CHNH), 4.10 – 4.46 (m, 2H, OCNCH₂), 7.39 – 7.58 (m, 5H, Ar-H), 7.69 – 7.79 (m, 4H, Ar-H), 7.89 – 8.08 (m, 3H, CHNH)

¹³C NMR (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 22.40 (OCNCH₂CH₂), 28.01 (OCNCH₂CH₂CH₂), 46.13 (OCNCH₂), 47.05 (OCNCH₂), 52.54 (OCNCH₂CH), 124.99 (CH-Ar), 125.87 (CH-Ar), 126.78 (2x CH-Ar), 127.85 (CH-Ar), 129.03 (2x CH-Ar), 129.15 (CH-Ar), 136.45 (CH-Ar), 139.30 (C-Ar), 140.24 (C-Ar), 157.90 (C-Ar), 169.46 (CO)

MS (ESI+): $m/z = 302,76 [M+Na]^+$, $m/z = 280,8 [M+H]^+$, izračunan m/z za $C_{18}H_{20}N_2O$ (kot trifluoroacetat) = 280

IR (ATR): $\nu [cm^{-1}] = 625, 704, 802, 1135, 1446, 1605, 1674, 1777, 2940$

Spojina 6:

Molekulska formula: $C_{18}H_{21}N_2O^+ C_2F_3O_2^-$

Molekulska masa: $281,38 \text{ g/mol} + 113,02 \text{ g/mol} = 394,4 \text{ g/mol}$

Izgled: bela puhasta zmes

Tališče: $64-68^\circ C$

TLC: $R_f = 0$ (MF = EtOAc)

Izkoristek: $477,11 \text{ mg}$, $\eta = 81,19 \%$

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.38 – 1.39 (m, 2H, OCNCH₂CH₂), 1.80 – 1.91 (m, 2H, OCNCH₂CH₂), 2.80 – 2.81 (m, 1H, OCNCH₂), 3.01 – 3.12 (m, 1H, OCNCH₂), 3.20 – 3.25 (m, 1H, OCNCH₂), 3.66 (m, 1H, OCNCH₂), 4.40 – 4.43 (m, 1H, CHNH), 7.26 - 7.49 (m, 5H, Ar-H), 7.52 – 7.70 (m, 4H, Ar-H), 7.90 (m, 3H, CHNH)

MS (ESI+): $m/z = 281,2 [M+H]^+$, izračunan m/z za $C_{18}H_{20}N_2O$ (kot trifluoroacetat) = 280,16

IR (ATR): $\nu [cm^{-1}] = 510, 519, 537, 552, 575, 614, 644, 691, 721, 729, 742, 759, 820, 842, 861, 884, 908, 945, 968, 986, 1007, 1048, 1091, 1158, 1173, 1228, 1246, 1309, 1344, 1364, 1408, 1448, 1488, 1513, 1595, 1682, 2811, 2937, 2982, 3378$

4.1.5. Sinteza N-(1-([1,1'-bifenil]-3-karbonil)-piperidin-3-il)-2-cianoacetamida (3)

25 mL suho bučko smo prepihali z argonom in vanjo zatehtali 20 mg (0,2396 mmol, 1,0 ekviv.) cianoocetne kisline, 59,7 mg (0,311 mmol, 1,3 ekviv.) EDC ter 42 mg (0,311 mmol, 1,3 ekviv.) HOBt. Nato smo dodali 10 mL DKM, 0,3 mL (2,729 mmol, 11,4 ekviv.) N-metilmorfolina ter eno kapljico DMF in mešali na ledeni kopeli 20 minut pod argonovo atmosfero. Nato smo v bučko dodali 94,2 mg (0,2396 mmol, 1,0 ekviv.) spojine 2 in mešali pri sobni temperaturi 24 ur. Odparili smo topilo pri znižanem tlaku in izolirali trdno zmes (rumene barve), ki smo jo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = etilacetat (EtOAc)).

4.1.6. Sinteza N-(1-([1,1'-bifenil]-3-karbonil)piperidin-4-il)-2-cianoacetamida (7)

Pri sintezi spojine 7 smo uporabili identični postopek kot pri sintezi spojine 5, pri čemer smo uporabili 52,44 mg (0,6083 mmol, 1,0 ekviv.) cianoocetne kisline, 152,30 mg (0,7908 mmol, 1,3 ekviv.) EDC, 107,76 mg (0,7908 mmol, 1,3 ekviv.) HOBt, ter 239,91 mg (0,6083 mmol, 1 ekviv.) spojine 6. Za razliko od spojine 5, smo spojino 7 čistili tudi z ekstrakcijo.

Reakcijsko zmes smo prenesli v lij ločnik in dodali 40 mL DKM. Reakcijsko zmes smo spirali s citronsko kislino (10 % citronske kisline v vodi, 1×25 mL), NaHCO_3 (nasičena raztopina v vodi, 1×20 mL) nato pa še z NaCl (nasičena raztopina v vodi, 1×20 mL). Organski fazi smo nato dodali sušilno sredstvo Na_2SO_4 , ter po 30 minutah filtrirali s presesavanjem in uparili organsko topilo pri znižanem tlaku do trdega zaostanka (rumenkasto-rjave barve). Le-tega smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc).

Spojina 3:

Molekulska formula: $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2$

Molekulska masa: 347,42 g/mol

Izgled: bel sipek prah

Tališče: 66-72°C

TLC: $R_f = 0,19$ (MF = EtOAc)

Izkoristek: 46,5 mg, $\eta = 55,86$ %

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.45 – 1.58 (m, 2H, $\text{OCNCH}_2\text{CH}_2$), 1.64 – 1.79 (m, 1H, $\text{OCNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.85 – 1.89 (m, 1H, $\text{OCNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.04 (m, 2H, COCH_2CN), 3.41 – 3.50 (m, 1H, $\text{OCNCH}_2\text{CH}_2$), 3.55 – 3.59 (m, 1H, $\text{OCNCH}_2\text{CH}_2$), 3.66 (m, 1H, OCNCH_2CH), 3.72 – 3.75 (m, 1H, OCNCH_2CH), 3.82 – 3.87 (m, 1H, OCNCH_2CH), 7.37 - 7.55 (m, 5H, Ar-H), 7.62 – 7.75 (m, 4H, Ar-H), 8.28 – 8.32 (br, 1H, NHCO)

^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 22.84 ($\text{OCNCH}_2\text{CH}_2$), 25.31 (COCH_2CN), 29.35 ($\text{OCNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 45.64 ($\text{OCNCH}_2\text{CH}_2$), 47.15 (CHNH), 50.95 (OCNCH_2CH), 116.06 (CH_2CN), 124.80 (CH-Ar), 125.72 (CH-Ar), 126.80 (2x CH-Ar), 127.58 (CH-Ar), 127.77 (CH-Ar), 128.99 (2x CH-Ar), 129.08 (CH-Ar), 136.90 (C-Ar), 139.36 (C-Ar), 140.19 (C-Ar), 161.68 (NHCO), 169.13 (NCO)

MS (ESI+): $m/z = 369,71$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, izračunan $m/z = 347,16$

MS (ESI-): $m/z = 345,88$ [M-H] $^-$

IR (ATR): ν [cm^{-1}] = 508, 523, 569, 592, 614, 636, 661, 699, 742, 763, 812, 861, 903, 984, 942, 1012, 1092, 1114, 1234, 1257, 1299, 1348, 1407, 1438, 1483, 1544, 1581, 1610, 1664, 1690, 2256, 2859, 2946, 3060, 3276

Spojina 7:

Molekulska formula: $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2$

Molekulska masa: 347,41 g/mol

Izgled: bela usedlina

Tališče: 55-60°C

TLC: R_f = 0,17 (MF = EtOAc)

Izkoristek: 36 mg, η = 18 %

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 1.35 (m, 1H, CONCH₂CH₂), 1.48 (m, 1H, CONCH₂CH₂), 1.949 (m, 2H, CONCH₂CH₂CHCH₂), 2.95 (m, 1H, CONCH₂), 3.13 (m, 1H, CONCH₂), 3.32 (s, 2H, COCH₂CN), 3.77 – 3.78 (m, 1H, CONCH₂), 3.97 – 4.06 (m, 1H, CONCH₂), 4.63 (br, 1H, CHNH), 6.86 (d, J = 7.58, 1H, NHCO), 7.30 – 7.49 (m, 5H, Ar-H), 7.55 – 7.66 (m, 4H, Ar-H)

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 25.91 (2x CH₂CHNH), 31.34 (CH₂CN), 46.53 (CHNH), 47.67 (2x OCNCH₂), 114.70 (CH₂CN), 125.44 (2x CH-Ar), 127.14 (2x CH-Ar), 127.90 (CH-Ar), 128.68 (CH-Ar), 129.00 (2x CH-Ar), 129.17 (CH-Ar), 136.15 (C-Ar), 140.07 (C-Ar), 141.79 (C-Ar), 160.49 (NHCO), 170.47 (NCO)

MS (ESI⁺): m/z = 410,8 [M+CH₃CN+Na]⁺, izračunan m/z = 347,16

MS (ESI⁻): m/z = 345,8 [M-H]⁻

IR (ATR): ν [cm⁻¹] = 511, 524, 531, 547, 556, 569, 613, 646, 696, 738, 761, 811, 906, 988, 1092, 1113, 1195, 1236, 1266, 1317, 1339, 1370, 1408, 1445, 1485, 1548, 1582, 1610, 1669, 2025, 2254, 2353, 2925, 3066, 3291

4.1.7. Sinteza N-(1-([1,1'-bifenil]-3-karbonil)piperidin-3-il)akrilamida (**4**)

Suho bučko smo prepihali z argonom in vanjo zatehtali 49,9 mg (0,479 mmol, 1,2 ekviv.) akrilne kisline, 143,3 mg (0,7472 mmol, 1,54 ekviv.) EDC, 102,0 mg (0,7472 mmol, 1,54 ekviv.) HOBt. Nato smo dodali 10 mL DKM, 0,7 mL (6,37 mmol, 13,30 ekviv.) N-metilmorfolina ter eno kapljico DMF in mešali na ledeni kopeli 20 minut v argonovi atmosferi. Nato smo v bučko dodali 188,30 mg (0,479 mmol, 1 ekviv.) spojine **2** in reakcijsko zmes pustili 24 ur ob mešanju na sobni temperaturi pod argonovo atmosfero. Reakcijsko zmes smo spirali s citronsko kislino (10 % citronske kisline v vodi, 1 × 25 mL), z NaHCO₃ (nasičena raztopina v vodi, 1 × 15 mL) nato pa še z NaCl (nasičena raztopina v vodi, 1 × 15 mL). Organski fazi smo nato dodali sušilno sredstvo Na₂SO₄, ter po 30 minutah filtrirali s presesavanjem in uparili organsko topilo pri znižanem tlaku. Izolirali smo 174,8 mg olja (rumenkasto-rjave barve), ter ga očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc).

4.1.8. Sinteza N-(1-([1,1'-bifenil]-3-karbonil)piperidin-4-il)akrilamida (**8**)

Pri sintezi spojine **8** smo uporabili identični postopek kot pri sintezi spojine **4**, pri čemer smo uporabili 47,7 mg (0,6608 mmol, 1,2 ekviv.) akrilne kisline, 165,2 mg (0,8590 mmol, 1,54

ekviv.) EDC, 116,4 mg (0,8590 mmol, 1,54 ekviv.) HOBt ter 217,2 mg (0,5507 mmol, 1,0 ekviv.) spojine **6**. Pridobili smo 214 mg olja (rumenkasto-rjave barve), ter ga očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc : MeOH = 4 : 1). Po kromatografiji smo dobili 77,41 mg bele puhaste spojine, vendar smo z NMR in MS analizo ugotovili da nimamo prave spojine.

Spojina 4:

Molekulska formula: C₂₁H₂₂N₂O₂

Molekulska masa: 334,42 g/mol

Izgled: brezbarvno lepljivo olje

Tališče: 45-56°C

TLC: R_f = 0,22 (MF = EtOAc)

Izkoristek: 39,8 mg, η = 24,9 %

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 1.60 (m, 2H, CONCH₂CH₂CH₂), 1.73 – 1.78 (m, 1H, CONCH₂CH₂CH₂CH), 1.91 – 1.96 (m, 1H, CONCH₂CH₂CH₂), 3.24 – 3.63 (m, 3H, CONCH₂CH₂CH₂CHCH₂), 3.80 – 3.98 (m, 1H, CONCH₂CH), 4.12 (m, 1H, CONCH₂CH), 5.52 – 5.61 (m, 1H, COCHCH₂), 6.15 – 6.25 (m, 2H, COCHCH₂), 6.58 – 6.70 (m, 1H, NHCOCH), 7.38 (m, 5H, Ar-H), 7.51 (m, 4H, Ar-H)

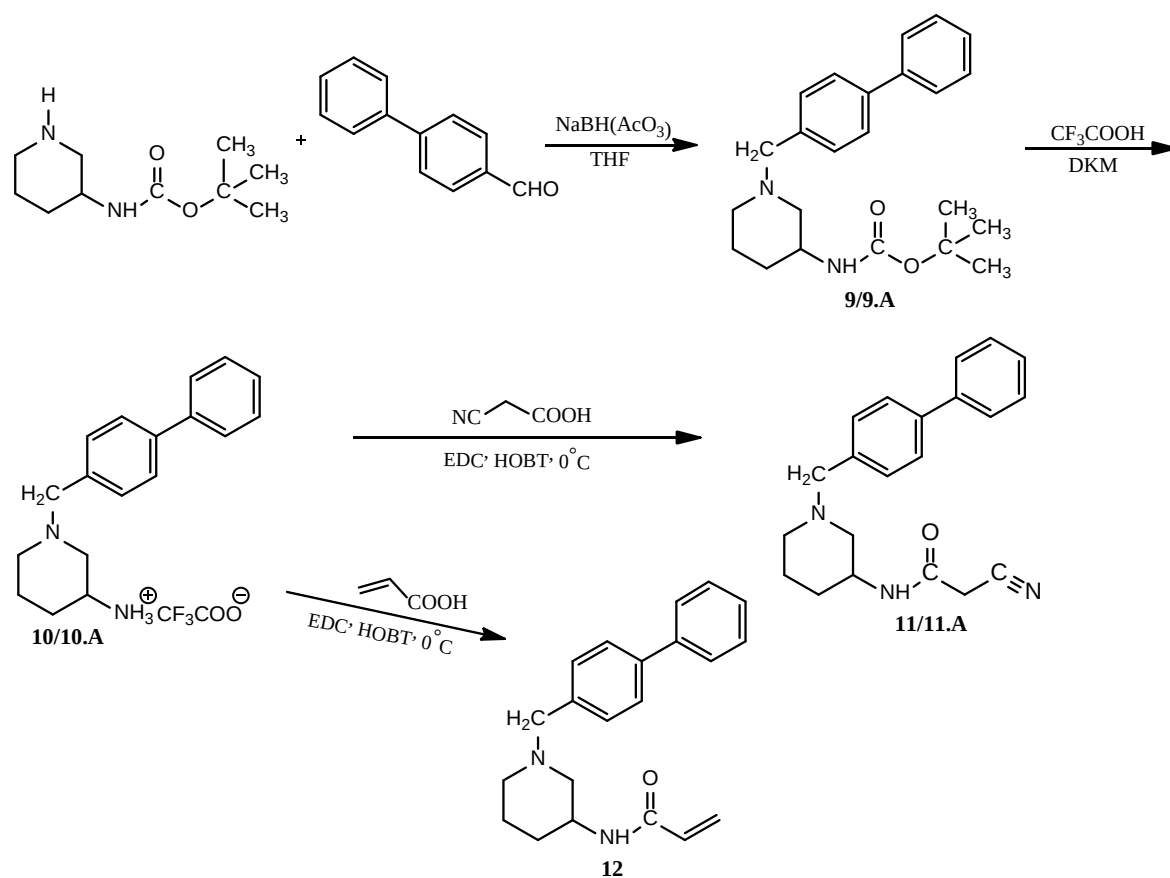
¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 23.26 (OCNCH₂CH₂), 29.84 (OCNCH₂CH₂CH₂), 47.11 (OCNCH₂), 48.76 (CHNH), 51.93 (OCNCH₂), 125.90 (COCHCH₂), 126.67 (CH-Ar), 127.20 (CH-Ar), 127.72 (CH-Ar), 128.88 (CH-Ar), 129.02 (COCHCH₂), 130.54 (CH-Ar), 130.91 (CH-Ar), 131.32 (CH-Ar), 136.00 (C-Ar), 140.24 (C-Ar), 141.64 (C-Ar), 165.17 (NHCO), 171.24 (OCN)

MS (ESI+): m/z = 356,7 [M+Na]⁺, m/z = 334,7 [M+H]⁺, izračunan m/z = 334,17

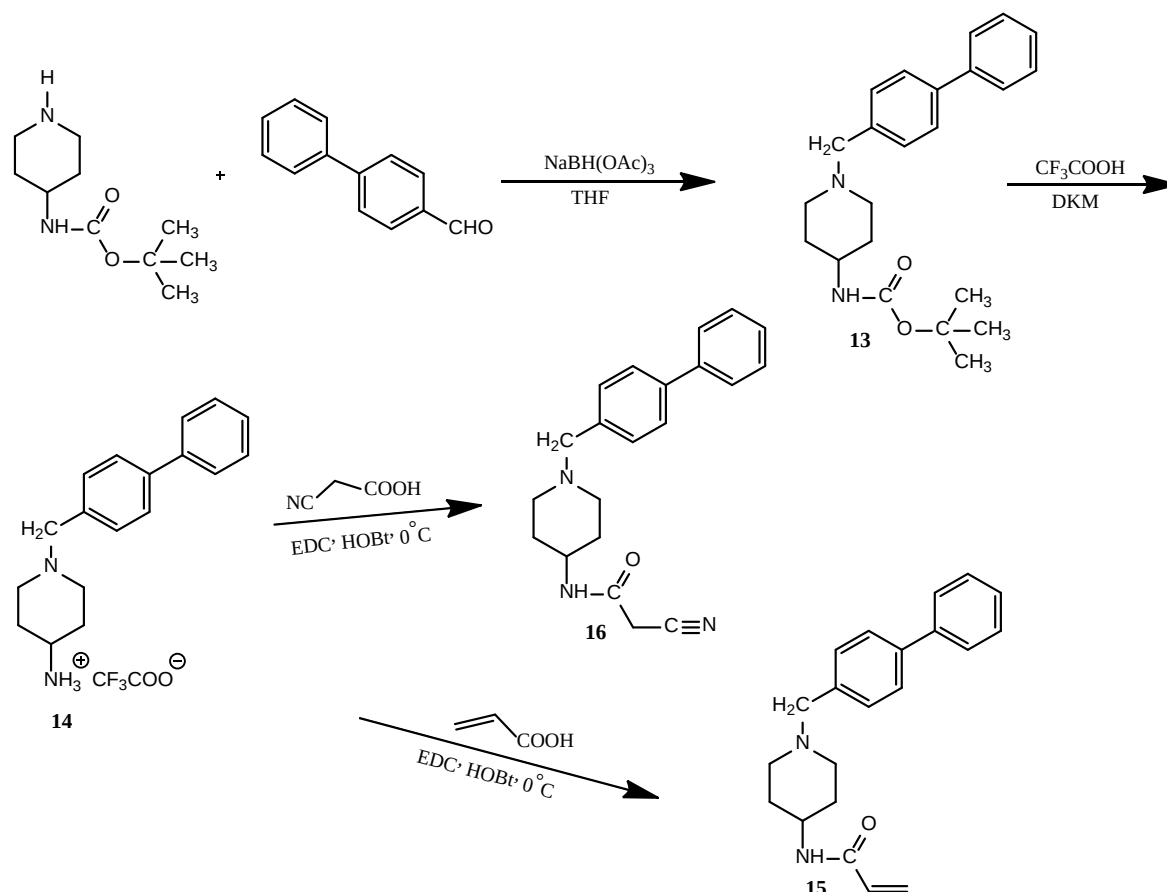
MS (ESI-): m/z = 332,8 [M-H]⁻

IR (ATR): ν [cm⁻¹] = 524, 613, 645, 698, 726, 761, 807, 859, 907, 974, 1114, 1232, 1256, 1298, 1372, 1407, 1438, 1483, 1535, 1611, 1658, 2233, 2859, 2942, 3060, 3269

4.2. Sinteza bifenil-4-metilpiperidinskih derivatov



Slika 18: Reakcijska shema sinteze N-(1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-3-il)-2-cianoacetamida (**11/11.A**) in N-(1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)-piperidin-3-il)akrilamida (**12**)



Slika 19: Reakcijska shema sinteze N-(1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-4-il)akrilamida (**15**) in N-(1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-4-il)-2-cianoacetamida (**16**)

4.2.1. Sinteza *terc*-butil (1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-3-il)karbamata (**9** in **9.A**)

50 mL suho bučko smo prepicali z argonom, vanjo zatehtali 0,254 g (1,269 mmol, 1,0 ekviv.) Boc-3-aminopiperidina in dodali 20 mL tetrahidrofurana (THF). Nato smo dodali 0,235 g (1,269 mmol, 1,0 ekviv.) 4-bifenilkarboksialdehida ter eno kapljico ocetne kisline. Reakcijsko zmes smo mešali na ledeni kopeli 20 minut pod argonovo atmosfero. Nato smo dodali 0,538 g (2,54 mmol, 2,0 ekviv.) natrijevega triacetoksiborhidrida $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ in reakcijo pustili potekati 16 ur pri sobni temperaturi v argonovi atmosferi, nato pa še 24 ur pri 50°C . Zjutraj smo reakcijski zmesi uparili THF pod znižanim tlakom. Dobili smo trdno zmes (belkaste barve), in jo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc : heksan = 1 : 1).

Sintezo spojine **9** smo ponovili še enkrat in uporabili enak sintezni postopek in ekvivalente reagentov. Pri ponovitvi smo uporabili 0,250 g Boc-3-aminopiperidina, 0,235 g 4-bifenilkarboksialdehida ter 0,538 g $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$. Naredili smo tudi ekstrakcijo pri kateri

smo uporabili enak postopek kot pri sintezi spojine **13**. Spojino smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc : heksan = 2 : 1).

Spojina 9:

Molekulska formula: C₂₃H₃₀N₂O₂

Molekulska masa: 366,50 g/mol

Izgled: bela do rahlo rumena oborina

Tališče: 82-89°C

TLC: R_f = 0,33 (MF = EtOAc : heksan = 1 : 1)

Izkoristek: 121 mg, η = 26,9 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.11 – 1.16 (m, 1H, CH₂NCH₂CH₂CH₂), 1.24 - 1.36 (m, 9H, Boc), 1.42 – 1.49 (m, 1H, CH₂NCH₂CH₂CH₂), 1.61 – 1.88 (m, 4H, CH₂NCH₂CH₂), 2.60 – 2.68 (m, 1H, CH₂NCH₂), 2.78 (m, 1H, CHNH), 3.37 – 3.41 (m, 1H, CH₂NCH₂), 3.49 (s, 2H, CH₂N), 6.73 (m, 1H, CHNH), 7.33 - 7.48 (m, 5H, Ar-H), 7.61 – 7.67 (m, 4H, Ar-H)

¹³C NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 20.74 (CH₂NCH₂CH₂), 28.23 (Boc), 30.11 (CH₂NCH₂CH₂CH₂), 47.05 (CHNH), 52.63 (CH₂NCH₂), 61.23 (CH₂NCH₂), 61.71 (CH₂N), 77.51 (C-Boc), 126.35 (CH-Ar), 126.43 (2x CH-Ar), 126.55 (2x CH-Ar), 126.99 (2x CH-Ar), 127.27 (C-Ar), 128.89 (2x CH-Ar), 129.35 (C-Ar), 139.98 (C-Ar), 154.80 (NHCO)

MS (ESI+): m/z = 388,8 [M+Na]⁺, m/z = 366,86 [M+H]⁺, izračunan m/z = 366,23

IR (ATR): ν [cm⁻¹] = 595, 694, 754, 832, 947, 1045, 1096, 1167, 1235, 1302, 1364, 1518, 1684, 2934, 3364

Spojina 9.A:

Molekulska formula: C₂₃H₃₀N₂O₂

Molekulska masa: 366,50 g/mol

Izgled: bela do rahlo rumena oborina

Tališče: 84-90°C

TLC: R_f = 0,6 (MF = EtOAc : heksan = 2 : 1)

Izkoristek: 344,8 mg, η = 75,0 %

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 1.44 (s, 9H, Boc), 1.56 (m, 3H, CH₂NCH₂CH₂CH₂), 1.64 – 1.75 (m, 2H, CH₂NCH₂CH₂CH₂), 2.23 – 2.58 (m, 3H, CH₂NCH₂; CH₂NCH₂), 3.51 (s, 2H, CH₂N), 3.77 – 3.81 (br, 1H, CHNH), 4.97 – 5.04 (br, 1H, CHNH), 7.32 – 7.46 (m, 5H, Ar-H), 7.53 – 7.61 (m, 4H, Ar-H)

MS (ESI+): $m/z = 367,2 [M+H]^+$, izračunan $m/z = 366,23$

IR (ATR): $\nu [cm^{-1}] = 552, 575, 615, 689, 730, 759, 782, 798, 820, 843, 861, 883, 909, 945, 969, 986, 1006, 1019, 1048, 1090, 1112, 1158, 1173, 1229, 1243, 1309, 1343, 1363, 1386, 1447, 1469, 1488, 1513, 1683, 2810, 2937, 2982, 3377$

4.2.2. Sinteza *terc*-butil(1-[1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-4-il)karbamata (**13**)

50 mL suho bučko smo prepicali z argonom, vanjo zatehtali 0,350 g (3,494 mmol, 1,0 ekviv.) Boc-4-aminopiperidina in dodali 30 mL THF. Nato smo dodali 0,637 g (3,494 mmol, 1,0 ekviv.) 4-bifenilkarboksialdehida ter eno kapljico očetne kisline. Reakcijsko zmes smo mešali na ledeni kopeli 20 minut pod argonovo atmosfero. Nato smo dodali 1,481 g (6,988 mmol, 2,0 ekviv.) $NaBH(OAc)_3$ in reakcijo pustili potekati 24 ur ob mešanju na sobni temperaturi pod argonovo atmosfero. Nato smo reakcijski zmesi uparili THF pod znižanim tlakom, ji dodali 50 mL EtOAc in jo prenesli v lij ločnik. Reakcijsko zmes smo spirali z $NaHCO_3$ (nasičena raztopina v vodi, 1×50 mL) ter NaCl (nasičena raztopina v vodi, 1×50 mL). Organski fazi smo dodali sušilno sredstvo Na_2SO_4 , ter po 30 minutah filtrirali s presesavanjem in uparili organsko topilo pri znižanem tlaku. Dobili smo trdno zmes (rumenkaste barve), ki smo jo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc : heksan = 2 : 1).

Spojina **13**:

Molekulska formula: $C_{23}H_{30}N_2O_2$

Molekulska masa: 366,50 g/mol

Izgled: bela svetleča puhasta oborina

Tališče: 110-118°C

TLC: $R_f = 0,36$ (MF = EtOAc : heksan = 2 : 1)

Izkoristek: 555 mg, $\eta = 43,4 \%$

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 1.39 – 1.49 (m, 9H, Boc; 2H, $OCNCH_2CH_2$), 1.92 (m, 2H, $H_2CNCH_2CH_2$), 2.11 (m, 2H, $H_2CNCH_2CH_2$), 2.84 (m, 2H, $H_2CNCH_2CH_2$), 3.48 (m, 1H, $CHNH$), 3.52 (s, 2H, CH_2N), 4.44 (m, 1H, $CHNH$), 7.31 - 7.45 (m, 5H, Ar-H), 7.53 – 7.60 (m, 4H, Ar-H)

^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 28.44 (Boc), 32.67 (2x $CH_2NCH_2CH_2$), 47.81 ($CHNH$) 52.43 (2x CH_2NCH_2), 62.78 (CH_2N), 79.26 (C -Boc), 126.98 (2x CH -Ar), 127.07 (2x CH -Ar), 127.18 (CH -Ar), 128.75 (2x CH -Ar), 129.54 (2x CH -Ar), 137.56 (C -Ar), 139.98 (C -Ar), 140.98 (C -Ar), 155.21 ($NHCO$)

MS (ESI+): $m/z = 367,2 [M+H]^+$, izračunan $m/z = 366,23$

IR (ATR): $\nu [cm^{-1}] = 518, 555, 585, 688, 709, 728, 755, 782, 824, 854, 891, 929, 947, 978, 998, 1018, 1047, 1101, 1125, 1170, 1236, 1251, 1293, 1308, 1324, 1339, 1363, 1391, 1453, 1467, 1487, 1515, 1682, 2764, 2936, 2979, 3361$

4.2.3. Sinteza 1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-3-amin-2,2,2-trifluoroacetata (**10** in **10.A**)

Spojino **9** (121 mg, 0,33 mmol, 1 ekviv.) smo raztopili v 5 mL DKM, dodali 2,5 mL (32,67 mmol, 99 ekviv.) TFA in mešali na sobni temperaturi v argonovi atmosferi eno uro. Po eni uri smo odparili topilo pri znižanem tlaku, dodali 10 mL Et₂O ter postavili zmes na 4°C za 24 ur. Nastalo oborino smo filtrirali z odsesavanjem ter sušili pod znižanim tlakom.

Pri sintezi spojine **10.A** smo uporabili identični postopek kot pri sintezi spojine **10**, pri čemer smo uporabili 334,8 mg (0,94 mmol) spojine **9.A**.

4.2.4. Sinteza 1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-4-amin-2,2,2-trifluoroacetata (**14**)

Pri sintezi spojine **14** smo uporabili identični postopek kot pri sintezi spojine **10**, le da smo spojini **13** (555 mg, 1,51 mmol, 1 ekviv.) dodali 10 mL DKM in 5 mL TFA (65,34 mmol, 43,27 ekviv.).

Spojina **10**:

Molekulska formula: C₁₈H₂₃N₂⁺ C₂F₃O₂⁻

Molekulska masa: 266 g/mol + 113 g/mol = 380 g/mol

Izgled: skoraj bela oborina

Tališče: 113-118,5°C

TLC: R_f = 0 (MF = EtOAc : heksan = 2 : 1)

Izkoristek reakcije: 116,02 mg, $\eta = 92,45 \%$

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.43 – 1.49 (m, 1H, CH₂NCH₂CH₂), 1.66 – 1.72 (m, 1H, CH₂NCH₂CH₂), 1.91 – 2.00 (m, 2H, CH₂NCH₂), 2.71 – 2.86 (m, 2H, CH₂NCH₂CH₂CH₂), 3.68 - 3.82 (m, 2H, CH₂NCH₂), 4.25 – 4.40 (m, 3H, CH₂N, CHNH), 7.39 – 7.57 (m, 5H, Ar-H), 7.69 – 7.78 (m, 4H, Ar-H), 8.04 – 8.18 (br, 3H, CHNH)

¹³C NMR (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 26.45 (CH₂NCH₂CH₂), 31.07 (CH₂NCH₂CH₂CH₂), 48.57 (CHNH₂), 79.26 (CH₂NCH₂), 83.88 (CH₂NCH₂), 85.64 (CH₂N), 126.70 (2x CH-Ar), 127.01 (CH-Ar), 127.86 (2x CH-Ar), 129.04 (2x CH-Ar), 130.11 (2x CH-Ar), 131.91 (C-Ar), 132.53 (C-Ar), 158.30 (C-Ar)

MS (ESI+): $m/z = 266,86 [M+H]^+$, izračunan m/z za $C_{18}H_{22}N_2$ (kot trifluoroacetat) = 266,18

IR (ATR): $\nu [cm^{-1}] = 714, 832, 930, 1132, 1172, 1424, 1665, 2868$

Spojina 10.A:

Molekulska formula: $C_{18}H_{23}N_2^+ C_2F_3O_2^-$

Molekulska masa: 267 g/mol + 113 g/mol = 380 g/mol

Izgled: skoraj bela oborina

Tališče: 111-113°C

TLC: $R_f = 0$ (MF = EtOAc : heksan = 2 : 1)

Izkoristek: 354,5 mg, $\eta = 99.3 \%$

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.48 – 1.54 (m, 1H, $CH_2NCH_2CH_2$), 1.73 – 1.76 (m, 1H, $CH_2NCH_2CH_2$), 1.95 – 2.05 (m, 2H, $CH_2NCH_2CH_2CH_2$), 2.89 – 2.91 (m, 2H, CH_2NCH_2), 3.45 – 3.47 (m, 3H, CH_2NCH_2CH), 4.36 – 4.50 (m, 2H, CH_2N), 7.39 – 7.61 (m, 5H, Ar-H), 7.70 – 7.80 (m, 4H, Ar-H), 8.33 (br, 3H, CHNH)

^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 20.44 ($CH_2NCH_2CH_2$), 26.22 ($CH_2NCH_2CH_2CH_2$), 44.78 ($CHNH_2$), 51.38 (CH_2NCH_2), 59.00 (CH_2NCH_2), 73.79 (CH_2N), 118.17 (CH -Ar), 126.73 (2x CH -Ar), 127.06 (2x CH -Ar), 127.92 (2x CH -Ar), 129.05 (2x CH -Ar), 131.83 (C -Ar), 139.18 (C -Ar), 141.29 (C -Ar), 158.41 (CF_3COO), 158.74 (CF_3COO)

MS (ESI+): $m/z = 267,2 [M+H]^+$, izračunan m/z za $C_{18}H_{22}N_2$ (kot trifluoroacetat) = 266,18

IR (ATR): $\nu [cm^{-1}] = 509, 549, 575, 596, 619, 696, 721, 737, 762, 797, 834, 855, 904, 931, 972, 1009, 1065, 1131, 1174, 1415, 1433, 1465, 1488, 1555, 1612, 1667, 2581, 2731$

Spojina 14:

Molekulska formula: $C_{18}H_{23}N_2^+ C_2F_3O_2^-$

Molekulska masa: 267,40 g/mol + 113,02 g/mol = 380,42 g/mol

Izgled: bela puhasta oborina

Tališče: 130-145°C

TLC: $R_f = 0$ (MF = EtOAc : heksan = 2 : 1)

Izkoristek reakcije: 565 mg, $\eta = 99.5 \%$

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.75 – 1.83 (m, 2H, $CH_2NCH_2CH_2$), 2.11 – 2.14 (m, 2H, $CH_2NCH_2CH_2$), 3.06 (m, 2H, CH_2NCH_2), 3.47 – 3.50 (m, 2H, CH_2NCH_2), 3.57 (m, 1H, $CHNH$), 4.33 (s, 2H, CH_2N), 7.39 – 7.59 (m, 5H, Ar-H), 7.70 – 7.79 (m, 4H, Ar-H), 8.30 (br, 3H, NH), 10.34 (br, 1H, NH)

^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 27.04 (2x $\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 45.10 (CHNH), 49.62 (2x CH_2NCH_2), 58.69 (CH_2N), 118.50 (CH-Ar), 126.74 (2x CH-Ar), 127.00 (2x CH-Ar), 127.91 (2x CH-Ar), 129.04 (2x CH-Ar), 131.94 (C-Ar), 139.17 (C-Ar), 141.24 (C-Ar), 158.40 (CF_3COO), 158.71 (CF_3COO)

MS (ESI+): $m/z = 267,2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, izračunan m/z za $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2$ (kot trifluoroacetat) = 266,18

IR (ATR): ν [cm^{-1}] = 517, 599, 616, 691, 719, 735, 759, 795, 827, 859, 921, 941, 995, 1008, 1042, 1078, 1117, 1159, 1182, 1194, 1396, 1419, 1452, 1488, 1522, 1612, 1669, 2361, 2555, 2970

4.2.5. Sinteza *N*-(1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-3-il)-2-cianoacetamida (**11** in **11.A**)

50 mL suho bučko smo prepihali z argonom in vanjo zatehtali 17,0 mg (0,203 mmol, 1,0 ekviv.) cianoocetne kisline, 50,7 mg (0,2639 mmol, 1,3 ekviv.) EDC ter 35,7 mg (0,2639 mmol, 1,3 ekviv.) HOBt. Nato smo dodali 10 mL DKM, 0,3 mL (2,73 mmol, 13,65 ekviv.) *N*-metilmorfolina ter kapljico DMF in mešali na ledeni kopeli 20 minut. Celotni čas mešanja smo vzdrževali argonovo atmosfero. Nato smo v bučko dodali 77,22 mg (0,20 mmol, 1,0 ekviv.) spojine **10** in reakcijsko zmes pustili 24 ur ob mešanju na sobni temperaturi pod argonovo atmosfero. Nato smo reakcijsko zmes prenesli v lij ločnik, dodali 40 mL DKM, in jo spirali z NaHCO_3 (nasičena raztopina v vodi, 1×30 mL) nato pa še z NaCl (nasičena raztopina v vodi, 1×30 mL). Organski fazi smo nato dodali sušilno sredstvo Na_2SO_4 , ter po 30 minutah filtrirali s presesavanjem in uparili topilo pri znižanem tlaku. Pridobili smo 54,5 mg trdne zmesi (rumeno-oranžne barve), ki smo jo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc). Po kromatografiji smo dobili 8,6 mg minimalnega zaostanka na bučki.

Sinteza spojine **11.A**: pri ponovni sintezi spojine **11**, smo uporabili enak sintezni postopek in ekvivalente reagentov. Uporabili smo 208,49 mg spojine **10.A** ter ustrezne količine ostalih reagentov. Za razliko od sinteze spojine **11**, smo pri sintezi **11.A** reakcijsko zmes čistili samo s kolonsko kromatografijo brez predhodne ekstrakcije (MF = EtOAc). Po koloni smo dobili 39 mg olja (rahlo rumenkaste barve), ki smo ga še drugič očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc), ter pridobili 21,6 mg lepljivega olja (rumenkaste barve).

4.2.6. Sinteza *N*-(1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-4-il)-2-cianoacetamida (**16**)

Pri sintezi spojine **16** smo uporabili identični postopek kot pri sintezi spojine **11**, pri čemer smo uporabili 44,84 mg (0,5386 mmol, 1,0 ekviv.) cianoocetne kisline, 135,30 mg (0,700

mmol, 1,3 ekviv.) EDC, 95,12 mg (0,700 mmol, 1,3 ekviv.) HOBt ter 204,88 mg (0,5386 mmol, 1,0 ekviv.) spojine **14**.

Olje (rumenkasto-rjave barve), ki smo ga dobili po uparevanju smo želeli očistiti s kolonsko kromatografijo, vendar se je ob dodatku EtOAc oborila zmes, katera pa ni bila pričakovani produkt (NMR).

Spojina 11:

Molekulska formula: C₂₁H₂₃N₃O

Molekulska masa: 333,44 g/mol

Izgled: minimalen brezbarven zaostanek na bučki

Tališče: 85-89°C

TLC: R_f = 0,22 (MF = EtOAc)

Izkoristek: 8,6 mg, η = 12,7 %

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 1.53 – 1.60 (m, 1H, H₂CNCH₂CH₂), 1.62 – 1.66 (m, 1H, H₂CNCH₂CH₂), 1.73 – 1.82 (m, 2H, H₂CNCH₂CH₂CH₂), 2.22 – 2.27 (m, 1H, H₂CNCH₂CH₂), 2.38 (m, 1H, H₂CNCH₂CH₂), 2.61 – 2.63 (m, 1H, H₂CNCH₂CH), 2.80 – 2.82 (m, 1H, H₂CNCH₂CH), 3.39 (d, J=2.78, 2H, COCH₂CN), 3.49 (d, J=13.10, 1H, CHNH), 3.64 (d, J= 13.11, 1H, CH₂N), 4.09 – 4.12 (m, 1H, CH₂N), 6.98 – 6.99 (br s, 1H, NH-CO), 7.35 – 7.48 (m, 5H, Ar-H), 7.587 – 7.64 (m, 4H, Ar-H)

MS (ESI+): m/z = 355,95 [M+Na]⁺, izračunan m/z = 333,18

MS (ESI -): m/z = 331, 97 [M-H]⁻

Spojina 11.A:

Molekulska formula: C₂₁H₂₃N₃O

Molekulska masa: 333,44 g/mol

Izgled: rumenkasto lepljivo olje

Tališče: 85-89°C

TLC: R_f = 0,27 (MF = EtOAc)

Izkoristek: 21,6 mg, η = 11,8 %

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 1.54 – 1.60 (m, 1H, CH₂NCH₂CH₂CH₂), 1.62 – 1.66 (m, 1H, CH₂NCH₂CH₂CH₂), 1.72 – 1.83 (m, 2H, CH₂NCH₂CH₂CH₂), 2.23 (m, 1H, CH₂NCH₂CH₂CH₂), 2.39 (m, 1H, CH₂NCH₂CH₂CH₂), 2.62 (m, 1H, CH₂NCH₂CHNH), 2.79 – 2.81 (m, 1H, CH₂NCH₂CHNH), 3.38 (d, J=2.60, 2H, COCH₂CN), 3.49 (d, J=13.11, 1H,

CH₂N), 3.64 (d, $J=13.11$, 1H, CH₂N), 4.10 – 4.12 (q, 1H, CH-NH), 6.99 (br s, 1H, NH-CO), 7.35 – 7.48 (m, 5H, Ar-H), 7.59 – 7.64 (m, 4H, Ar-H)

¹³C NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 23.18 (CH₂NCH₂CH₂), 25.30 (CH₂CN), 29.56 (CH₂NCH₂CH₂CH₂), 46.18 (CHNH), 52.72 (CH₂NCH₂), 57.62 (CH₂NCH₂), 61.63 (CH₂N), 116.25 (CH₂CN), 126.45 (2x CH-Ar), 126.56 (2x CH-Ar), 127.28 (CH-Ar), 128.89 (2x CH-Ar), 129.32 (2x CH-Ar), 137.33 (C-Ar), 138.79 (C-Ar), 139.97 (C-Ar), 161.34 (NHCO)

MS (ESI+): $m/z = 334,2$ [M+H]⁺, $m/z = 356,2$ [M+Na]⁺, izračunan $m/z = 333,18$

MS (ESI -): $m/z = 332,2$ [M-H]⁻

IR (ATR): ν [cm⁻¹] = 524, 549, 567, 647, 696, 729, 760, 846, 907, 982, 1007, 1037, 1076, 1104, 1157, 1239, 1264, 1347, 1397, 1448, 1466, 1487, 1521, 1598, 1658, 2259, 2806, 2941, 3030, 3311.

4.2.7. Sinteza *N*-(1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)-piperidin-3-il)akrilamida (**12**)

50 mL suho bučko smo prepihali z argonom in vanjo zatehtali 24 mg (0,3325 mmol, 1,0 ekviv.) akrilne kisline, 83,06 mg (0,4323 mmol, 1,3 ekviv.) EDC, 58,92 mg (0,4323 mmol, 1,3 ekviv.) HOBt. Nato smo dodali 10 mL DKM, 0,7 mL (6,37 mmol, 19,16 ekviv.) N-metilmorfolina ter kapljico DMF in mešali na ledeni kopeli 20 minut. Celotni čas mešanja smo vzdrževali argonovo atmosfero. Nato smo v bučko 126,5 mg (0,3325 mmol, 1,0 ekviv.) spojine **10.A** in reakcijsko zmes pustili 24 ur ob mešanju na sobni temperaturi pod argonovo atmosfero. Nato smo reakcijski zmesi v bučki odparili topilo pri znižanem tlaku do olja (rjave barve) in ga očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc).

4.2.8. Sinteza *N*-(1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-4-il)akrilamida (**15**)

Pri sintezi spojine **15** smo uporabili identični postopek kot pri sintezi spojine **12**, pri čemer smo uporabili 39,93 mg (0,526 mmol, 1,0 ekviv.) akrilne kisline, 132,14 (0,6838 mmol, 1,3 ekviv.) mg EDC, 93,14 mg (0,6838 mmol, 1,3 ekviv.) HOBt ter 200 mg (0,526 mmol, 1,0 ekviv.) spojine **14**. Po uparevanju smo dobili olje (rjave barve), ki smo ga očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc : MeOH = 4 : 1).

Spojina **12**:

Molekulska formula: C₂₁H₂₄N₂O

Molekulska masa: 320,43 g/mol

Izgled: bel prah

Tališče: 95-105°C

TLC: R_f = 0,09 (MF = EtOAc)

Izkoristek: 25 mg, η = 23,5 %

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 1.57 – 1.60 (m, 2H, CH₂NCH₂CH₂), 1.66 – 1.73 (m, 2H, CH₂NCH₂CH₂CH₂), 2.20 – 2.23 (m, 1H, CH₂NCH₂CH₂), 2.48 – 2.57 (m, 2H, CH₂NCH₂CH₂), 2.66 (m, 1H, CH₂NCH₂CH), 3.53 (q, 2H, CH₂NCH₂), 4.15 – 4.19 (m, 1H, CHNH), 5.62 – 5.65 (m, 1H, COCHCH₂), 6.09 – 6.15 (m, 1H, COCHCH₂), 6.24 – 6.29 (m, 1H, COCHCH₂), 7.33 – 7.46 (m, 5H, Ar-H), 7.54 – 7.60 (m, 4H, Ar-H), 8.02 (NHCO)

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 21.88 (NCH₂CH₂), 28.87 (NCH₂CH₂CH₂), 45.04 (CHNH), 53.70 (CH₂NCH₂), 57.96 (CH₂NCH₂), 62.72 (CH₂N), 126.02 (COCHCH₂), 127.05 (4x CH-Ar), 127.22 (CH-Ar), 128.75 (2x CH-Ar), 129.35 (2x CH-Ar), 131.30 (COCH), 137.19 (C-Ar), 140.13 (C-Ar), 140.88 (C-Ar), 164.49 (CO)

MS (ESI+): m/z = 343,2 [M+Na]⁺, 321,2 [M+H]⁺, izračunan m/z = 320,19

MS (ESI-): m/z = 319,2 [M-H]⁻

IR (ATR): ν [cm⁻¹] = 525, 552, 603, 632, 694, 757, 800, 844, 902, 956, 986, 1040, 1071, 1109, 1151, 1177, 1239, 1278, 1318, 1344, 1405, 1446, 1486, 1554, 1623, 1656, 2771, 2951, 3082, 3284

Spojina 15:

Molekulska formula: C₂₁H₂₄N₂O

Molekulska masa: 320,44 g/mol

Izgled: bela puhasta spojina

Tališče: 135-145°C

TLC: R_f = 0,36 (MF = EtOAc : MeOH = 4 : 1)

Izkoristek: 131 mg, η = 77,7 %

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 0.83 – 0.91 (m, 2H, CH₂CHNH), 1.58 (m, 2H, CH₂CHNH), 2.00 (m, 2H, CH₂NCH₂), 2.23 – 2.29 (m, 1H, CH₂NCH₂), 2.96 (s, 1H, CH₂NCH₂), 2.98 – 3.00 (m, 1H, CH₂NCH₂), 3.630 (s, 1H, CH₂NCH₂), 3.95 (m, 1H, CHNH), 5.44 (m, 1H, COCHCH₂), 5.64 (dd, J₁=1.38 Hz, J₂=10.27 Hz, 1H, COCHCH₂), 6.06 (q, 1H, COCHCH₂), 6.28 (dd, J₁=1.40 Hz, J₂=16.93 Hz, 1H, CHNH), 7.33 – 7.46 (m, 5H, Ar-H), 7.55 – 7.60 (m, 4H, Ar-H)

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 31.88 (2x CH₂NCH₂CH₂), 44.87 (CHNH), 52.19 (2x CH₂NCH₂), 66.83 (CH₂N), 127.08 (2x CH-Ar), 127.14 (2x CH-Ar), 127.31 (CH-Ar),

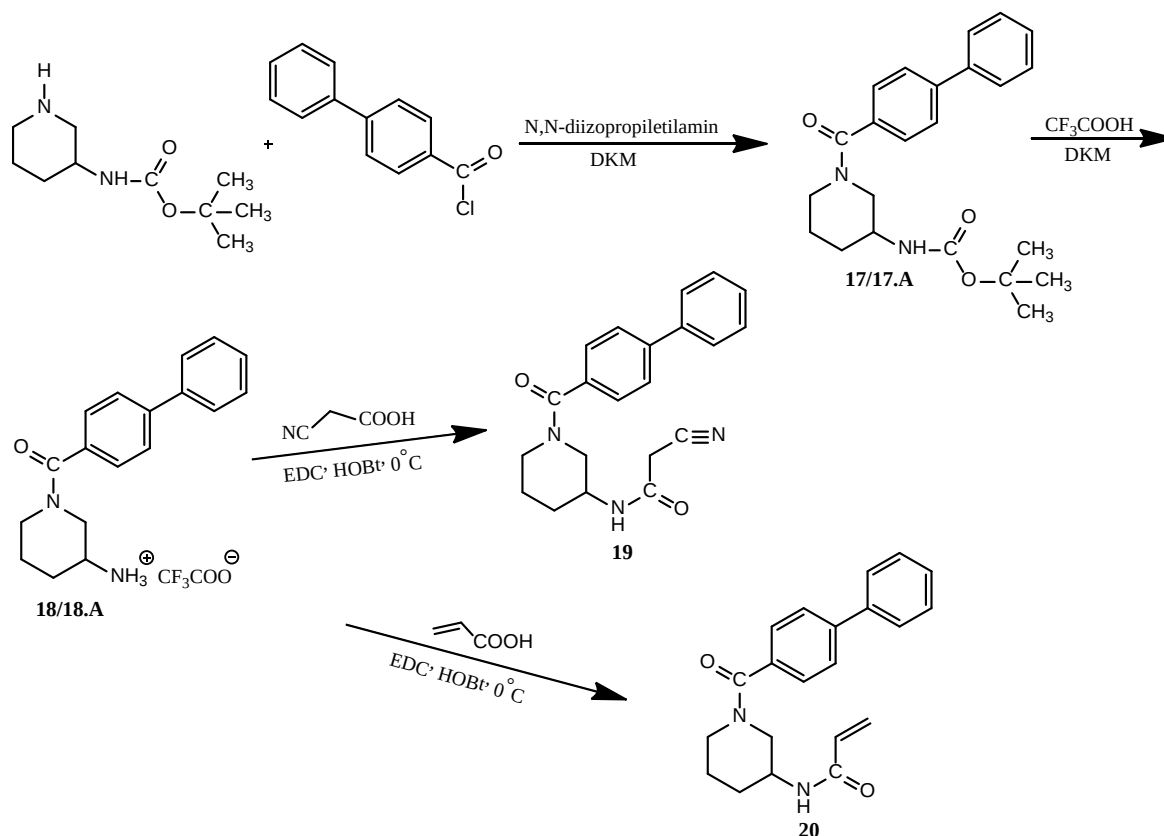
128.79 (2x $\underline{\text{CH-Ar}}$), 129.79 (2x $\underline{\text{CH-Ar}}$), 129.90 ($\text{COCH}\underline{\text{CH}_2}$), 133.65 ($\underline{\text{C-Ar}}$), 133.89 (COCH), 140.71 ($\underline{\text{C-Ar}}$), 146.39 ($\underline{\text{C-Ar}}$), 164.49 ($\underline{\text{CO}}$)

MS (ESI+): $m/z = 320,9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, izračunan $m/z = 320,19$

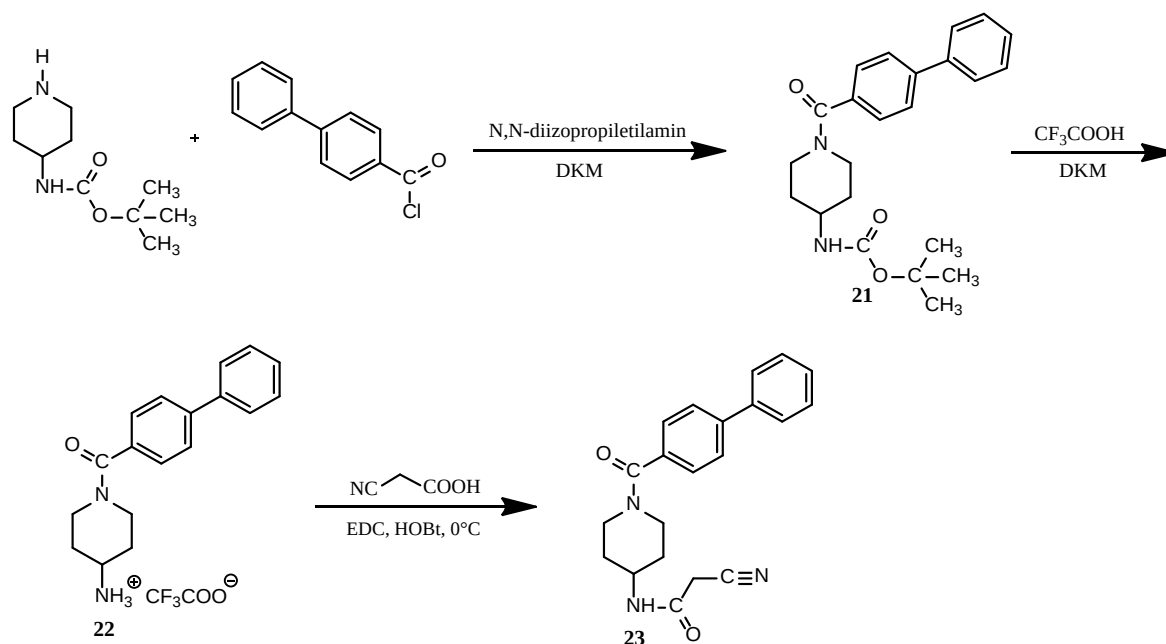
MS (ESI -): $m/z = 364,4$ $[\text{M}+\text{CH}_2\text{O}_2-\text{H}]^-$

IR (ATR): ν [cm^{-1}] = 517, 601, 723, 758, 800, 841, 1026, 1133, 1191, 1445, 1560, 1670, 2951

4.3. Sinteza bifenil-4-acetamidnih derivatov



Slika 20: Reakcijska shema sinteze N-(1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-3-il)-2-cianoacetamida (**19**) in N-(1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-4-il)-2-cianoacetamida (**20**)

Slika 21: Reakcijska shema sinteze *N*-(1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-4-il)-2-cianoacetamida (**23**)

4.3.1. Sinteza *tert*-butil(1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-3-il)karbamata (**17** in **17.A**)

50 mL suho bučko smo prepicali z argonom in vanjo zatehtali 0,502 g (2,503 mmol, 1,0 ekviv.) Boc-3-aminopiperidina in 0,569 g (5,808 mmol, 1,05 ekviv.) 4-bifenilkarbonil klorida. Nato smo dodali 15 mL DKM in 1 mL (5,74 mmol, 2,29 ekviv.) *N,N*-diizopropiletilamina ter reakcijsko zmes pustili 24 ur ob mešanju na sobni temperaturi pod argonovo atmosfero. Naslednji dan smo reakcijsko zmes prenesli v lij ločnik in dodali 40 mL DKM. Reakcijsko zmes smo spirali s citrsko kislino (10 % citrsko kisline v vodi, 1 × 20 mL), z NaHCO₃ (nasičena raztopina v vodi, 1 × 20 mL) nato pa še z NaCl (nasičena raztopina v vodi, 1 × 20 mL). Ko smo dodali NaCl, se je naredila emulzija, zato smo še enkrat prelili z večjo količino NaCl. Organski fazi smo dodali sušilno sredstvo NaSO₄, nato pa ponovno sprali z NaCl. Postopek smo ponovili še enkrat, da je bila organska faza bistra. Po uparivanju pod znižanim tlakom smo pridobili 222,2 mg trdne zmesi (bele barve), ki smo jo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc).

Sinteza spojine **17.A**: pri ponovni sintezi spojine **17**, smo uporabili enak sintezni postopek in ekvivalente reagentov. Uporabili smo 0,577 g (2,8828 mmol, 1.0 ekviv.) Boc-3-aminopiperidina in 0,657 g (3,0269 mmol, 1,05 ekviv.) 4-bifenilkarbonil klorida.

Za razliko od sinteze spojine **17**, smo ekstrakcijo pri spojini **17.A** izvedli malo drugače. Reakcijsko zmes smo spirali samo s citronsko kislino (10 % citronske kisline v vodi, 1 × 20 mL) in z NaHCO₃ (nasičena raztopina v vodi, 1 × 20 mL). Z NaCl nismo sprali, ker nam je pri sintezi spojine **17** nastala emulzija in smo z ekstrakcijo izgubili veliko produkta. Po uparevanju pri znižanem tlaku smo pridobili produkt (bele barve) ter izvedli prekrystalizacijo z EtOAc.

Spojina 17:

Molekulska formula: C₂₃H₂₈N₂O₃

Molekulska masa: 380,49 g/mol

Izgled: takoj po kromatografiji smo dobili svetlo rumenkasto olje, čez nekaj časa so nastali rumenkasto beli kristali

Tališče: 61,5-64,5°C

TLC: R_f = 0,66 (MF = EtOAc)

Izkoristek: 200,5 mg, η = 21 %

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 1.42 (s, 9H, Boc), 1.61 – 1.64 (m, 2H, OCNCH₂CH₂CH₂), 1.77 (s, 2H, OCNCH₂CH₂CH₂), 1.97 (s, 1H, CHNH), 3.14 - 3.53 (m, 2H, OCNCH₂), 3.53 – 3.73 (m, 2H, OCNCH₂), 4.62 – 4.79 (m, 1H, CHNH), 7.35 – 7.51 (m, 5H, Ar-H), 7.58 – 7.63 (m, 4H, Ar-H)

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 28.39 (3x Boc), 30.39 (OCNCH₂CH₂), 42.55 (OCNCH₂), 46.68 (OCNCH₂CH₂CH₂), 48.33 (OCNCH₂), 52.56 (CHNH), 79.66 (C-Boc), 120.18 (C-Ar), 127.18 (CH-Ar), 127.22 (CH-Ar), 127.78 (CH-Ar), 128.89 (CH-Ar), 134.45 (CH-Ar), 140.35 (C-Ar), 142.69 (C-Ar), 154.00 (COO), 171.04 (CO)

MS (ESI+): m/z = 402,6 [M+Na]⁺, 380,6 [M+H]⁺, 443,6 [M+CH₃CN+Na]⁺, izračunan m/z = 380,21

MS (ESI -): m/z = 378,5 [M-H]⁻

IR (ATR): ν [cm⁻¹] = 510, 526, 531, 555, 573, 605, 625, 697, 746, 776, 848, 927, 949, 973, 993, 1008, 1049, 1073, 1103, 1163, 1243, 1270, 1307, 1364, 1390, 1433, 1517, 1620, 1702, 2936, 3312

Spojina 17.A:

Molekulska formula: C₂₃H₂₈N₂O₃

Molekulska masa: 380,49 g/mol

Izgled: bela oborina

Tališče: 61,5-64,5°C

TLC: R_f = 0,57 (MF = EtOAc)

Izkoristek: 246,10 mg, η = 22,5 %

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 1.43 (s, 9H, Boc), 1.59 (m, 3H, OCNCH₂CH₂CH₂), 1.74 – 1.77 (m, 1H, OCNCH₂CH₂CH₂), 1.98 (s, 1H, CHNH), 3.26 - 3.57 (m, 2H, OCNCH₂), 3.58 – 3.81 (m, 2H, OCNCH₂), 4.54 - 4.78 (m, 1H, CHNH), 7.36 – 7.51 (m, 5H, Ar-H), 7.58 – 7.63 (m, 4H, Ar-H)

MS (ESI+): m/z = 402,8 [M+Na]⁺, 443,8 [M+CH₃CN+Na]⁺, izračunan m/z = 380,21

4.3.2. Sinteza *terc*-butil (1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-4-il)karbamata (**21**)

50 mL suho bučko smo prepihali z argonom in vanjo zatehtali 0,554 g (5,531 mmol, 1,0 ekviv.) Boc-4-aminopiperidina in 1,26 g (5,808 mmol, 1,05 ekviv.) 4-bifenilkarbonil klorida. Nato smo dodali 15 mL DKM in 1 mL (5,74 mmol, 1,04 ekviv.) *N,N*-diizopropiletilamina, ter reakcijsko zmes pustili 24 ur ob mešanju na sobni temperaturi pod argonovo atmosfero. Nato smo reakcijsko zmes prenesli v lij ločnik in dodali 40 mL DKM. Reakcijsko zmes smo spirali s citronsko kislino (10 % citronske kisline v vodi, 1 × 20 mL), z NaHCO₃ (nasičena raztopina v vodi, 1 × 20 mL) nato pa še z NaCl (nasičena raztopina v vodi, 2 × 20 mL). Organski fazi smo dodali sušilno sredstvo Na₂SO₄, ter po 30 minutah filtrirali s presesavanjem in uparili topilo pri znižanem tlaku. Pridobili smo olje (rjavkasto-rumene barve), ki smo ga očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc : heksan = 1 : 1).

Spojina **21**:

Molekulska formula: C₂₃H₂₈N₂O₃

Molekulska masa: 380,49 g/mol

Izgled: bel prah

Tališče: 129-134°C

TLC: R_f = 0,28 (MF = EtOAc : heksan = 1 : 1)

Izkoristek: 644 mg, η = 30,6 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.27 – 1.34 (m, 2H, OCNCH₂CH₂), 1.38 (s, 9H, Boc), 1.72 – 1.81 (m, 2H, OCNCH₂CH₂), 2.91 – 3.00 (m, 1H, OCNCH₂), 3.05 – 3.14 (m, 1H, OCNCH₂), 3.52 – 3.54 (m, 1H, OCNCH₂CH₂), 3.59 – 3.65 (m, 1H, OCNCH₂CH₂), 4.31 – 4.36 (m, 1H, CHNH), 6.91 (m, 1H, CHNH), 7.38 - 7.51 (m, 5H, Ar-H), 7.70 – 7.75 (m, 4H, Ar-H)

MS (ESI⁺): $m/z = 402,6 [M+Na]^+$, $380,7 [M+H]^+$, $443,6 [M+CH_3CN+Na]^+$, izračunan $m/z = 380,21$

MS (ESI⁻): $m/z = 378,7 [M-H]^-$

IR (ATR): $\nu [cm^{-1}] = 587, 697, 753, 848, 894, 935, 1004, 1027, 1105, 1163, 1243, 1277, 1316, 1367, 1443, 1530, 1626, 1668, 2976, 3300$

4.3.3. Sinteza 1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-3-amin-2,2,2-trifluoroacetata (18/18.A)

Spojino 17 (200,5 mg, 0,527 mmol, 1 ekviv.) smo raztopili v 10 mL DKM, dodali 3 mL (39,20 mmol, 74,38 ekviv.) TFA in mešali na sobni temperaturi v argonovi atmosferi 4 ure. Nato smo odparili topilo pri znižanem tlaku, dodali 10 mL Et₂O ter postavili zmes na 4°C za 24 ur. Nastalo oborino smo filtrirali z odesavanjem ter sušili pod znižanim tlakom.

Pri sintezi spojine 18.A smo uporabili identični postopek kot pri sintezi spojine 18, pri čemer smo uporabili 246,10 mg (0,647 mmol) spojine 17.A. Pridobili smo zaostanek (prah) na bučki (umazano-bele barve).

4.3.4. Sinteza 1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-4-amin-2,2,2-trifluoroacetata (22)

Pri sintezi spojine 22 smo uporabili identični postopek kot pri sintezi spojine 18, pri čemer smo uporabili 600 mg (1,577 mmol) spojine 21. Pridobili smo 849,17 mg zmesi (rumenkasto-bele barve).

Spojina 18:

Molekulska formula: C₁₈H₂₁N₂O⁺ C₂F₃O₂⁻

Molekulska masa: 281,38 g/mol + 113,02 g/mol = 394,4 g/mol

Izgled: belkasto umazan zaostanek na bučki (prah)

Tališče: 163-166°C

TLC: R_f = 0 (MF = EtOAc)

Izkoristek: 185 mg, $\eta = 89,0 \%$

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.51 – 1.61 (m, 2H, OCNCH₂CH₂), 1.72 – 1.77 (m, 1H, OCNCH₂CH₂CH₂), 2.00 – 2.04 (m, 1H, OCNCH₂CH₂CH₂), 3.13 – 3.27 (m, 2H, OCNCH₂), 3.39 – 3.40 (m, 1H, CHNH), 3.72 – 3.75 (m, 2H, OCNCH₂), 7.39 – 7.54 (m, 5H, Ar-H), 7.70 – 7.77 (m, 4H, Ar-H), 7.91 – 8.03 (m, 3H, CHNH)

¹³C NMR (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 22.47 (OCNCH₂CH₂), 28.02 (OCNCH₂CH₂CH₂), 34.15 (OCNCH₂), 44.01 (CHNH₂), 46.26 (OCNCH₂), 126.62 (CH-Ar),

126.76 (2x $\underline{\text{CH-Ar}}$), 127.71 (2x $\underline{\text{CH-Ar}}$), 127.91 (2x $\underline{\text{CH-Ar}}$), 129.04 (2x $\underline{\text{CH-Ar}}$), 134.59 ($\underline{\text{C-Ar}}$), 139.27 ($\underline{\text{C-Ar}}$), 141.29 ($\underline{\text{C-Ar}}$), 169.33 ($\underline{\text{CO}}$)

MS (ESI+): $m/z = 280,7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, $281,8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, izračunan m/z za $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}$ (kot trifluoroacetat) = 280,16

IR (ATR): ν [cm^{-1}] = 515, 602, 696, 721, 748, 841, 970, 1027, 1140, 1163, 1196, 1245, 1275, 1394, 1434, 1526, 1629, 1667, 2933, 3284

Spojina 18.A:

Molekulska formula: $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}^+ \text{C}_2\text{F}_3\text{O}_2^-$

Molekulska masa: 281,38 g/mol + 113,02 g/mol = 394,4 g/mol

Izgled: belkasto umazan zaostanek na bučki (prah)

Tališče: 148-155°C

TLC: $R_f = 0$ (MF = EtOAc)

Izkoristek: 263,64 mg, $\eta = 100\%$

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 1.48 – 1.54 (m, 1H, $\text{OCNCH}_2\text{CH}_2$), 1.83 – 1.93 (m, 2H, $\text{OCNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.99 – 2.07 (m, 1H, $\text{OCNCH}_2\text{CH}_2$), 2.44 – 2.50 (m, 1H, CHNH), 3.36 – 3.51 (m, 2H, OCNCH_2), 3.91 – 3.94 (m, 2H, OCNCH_2), 7.35 – 7.45 (m, 5H, Ar-H), 7.52 – 7.58 (m, 4H, Ar-H), 8.33 – 8.47 (m, 3H, CHNH)

MS (ESI+): $m/z = 281,1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, izračunan $m/z = 280,16$

IR (ATR): ν [cm^{-1}] = 517, 553, 602, 625, 695, 719, 748, 795, 840, 971, 1133, 1196, 1241, 1276, 1429, 1554, 1628, 1660, 2951, 3285

Spojina 22:

Molekulska formula: $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}^+ \text{C}_2\text{F}_3\text{O}_2^-$

Molekulska masa: 281,16 g/mol + 113,02 g/mol = 394,18 g/mol

Izgled: lepljivo oranžno rumeno-rjavo olje

Tališče: 300°C

TLC: $R_f = 0$ (MF = EtOAc)

Izkoristek: 849,17 mg, $\eta = 100\%$

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ (ppm): 1.45 – 1.48 (m, 2H, $\text{OCNCH}_2\text{CH}_2$), 1.90 – 1.99 (m, 2H, $\text{OCNCH}_2\text{CH}_2$), 2.81 – 2.98 (m, 1H, OCNCH_2), 3.08 – 3.21 (m, 1H, OCNCH_2), 3.73 (m, 1H, CHNH), 4.42 – 4.53 (m, 2H, OCNCH_2), 7.39 – 7.52 (m, 5H, Ar-H), 7.70 – 7.77 (m, 4H, Ar-H), 7.92 (m, 3H, CHNH)

^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 29.61 (2x OCNCH $_2$ CH $_2$), 30.75 (2x OCNCH $_2$), 47.41 (CHNH $_2$), 126.73 (2x CH-Ar), 126.76 (2x CH-Ar), 127.46 (2x CH-Ar), 127.93 (CH-Ar), 129.04 (2x CH-Ar), 134.68 (C-Ar), 139.23 (C-Ar), 141.31 (C-Ar), 168.93 (CO)

MS (ESI+): m/z = 280,8 $[\text{M}+\text{H}]^+$, izračunan m/z = 280,16

IR (ATR): ν [cm^{-1}] = 516, 601, 697, 749, 798, 844, 1010, 1138, 1281, 1448, 1600, 1667, 1773, 2948

4.3.5. Sinteza *N*-(1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-3-il)-2-cianoacetamida (**19**)

25 mL suho bučko smo prepihali z argonom in vanjo zatehtali 39,6 mg (0,457 mmol, 1,0 ekviv.) cianoocetne kisline, 114,26 mg (0,5941 mmol, 1,3 ekviv.) EDC ter 80,81 mg (0,5941 mmol, 1,3 ekviv.) HOBt. Nato smo dodali 10 mL DKM, 0,3 mL (2,73 mmol, 5,97 ekviv.) *N*-metilmorfolina ter eno kapljico DMF in mešali na ledeni kopeli 20 minut pod argonovo atmosfero. Nato smo v bučko dodali 180 mg (0,457 mmol, 1,0 ekviv.) spojine **18** in mešali pri sobni temperaturi 24 ur. Naslednji dan smo reakcijsko zmes prenesli v lij ločnik in dodali 40 mL DKM. Reakcijsko zmes smo spirali s citronsko kislino (10 % citronske kisline v vodi, 1 $\times$ 25 mL), z NaHCO $_3$ (nasičena raztopina v vodi, 1 $\times$ 20 mL) nato pa še z NaCl (nasičena raztopina v vodi, 1 $\times$ 20 mL). Organski fazi smo nato dodali sušilno sredstvo Na $_2$ SO $_4$, ter po 30 minutah filtrirali s presesavanjem in uparili organsko topilo pri znižanem tlaku. Pridobili smo 123 mg trdnega zaostanka (rahlo rumene barve), ter ga očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc).

4.3.6. Sinteza *N*-(1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-4-il)-2-cianoacetamida (**23**)

Pri sintezi spojine **23** smo uporabili identični postopek kot pri sintezi spojine **19**, pri čemer smo uporabili 58,4 mg (0,6865 mmol, 1,0 ekviv.) cianoocetne kisline, 171,1 mg (0,8925 mmol, 1,3 ekviv.) EDC, 120,6 mg (0,8925 mmol, 1,3 ekviv.) HOBt, ter 270,61 mg (0,6865 mmol, 1 ekviv.) spojine **22**. Dobili smo 153,78 mg olja (rumenkasto-rjave barve), ki smo ga očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc).

Spojina **19**:

Molekulska formula: C $_{21}$ H $_{21}$ N $_3$ O $_2$

Molekulska masa: 347,42 g/mol

Izgled: bel zaostanek na bučki

Tališče: 155-158°C

TLC: R $_f$ = 0,18 (MF = EtOAc)

Izkoristek: 38,1 mg, η = 24,0 %

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 1.59 – 1.65 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.72 (m, 1H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.93 (m, 2H, NCH_2CH), 3.37 (s, 2H, COCH_2CN), 3.51 – 3.58 (m, 1H, NCH_2CH), 3.69 – 3.72 (m, 1H, CHNH), 4.07 – 4.13 (m, 2H, NCH_2CH_2), 6.34 – 6.94 (m, 1H, CHNH), 7.36 – 7.55 (m, 5H, Ar-H), 7.53 – 7.66 (m, 4H, Ar-H)

^{13}C NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ (ppm): 21.98 ($\text{OCNCH}_2\text{CH}_2$), 25.30 (CH_2CN), 29.08 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 41.55 (OCNCH_2), 45.70 (CHNH), 50.82 (OCNCH_2CH), 116.14 (CH_2CN), 126.58 (2x CH-Ar), 126.75 (2x CH-Ar), 127.47 (2x CH-Ar), 127.84 (CH-Ar), 129.01 (2x CH-Ar), 135.05 (C-Ar), 139.30 (C-Ar), 140.95 (C-Ar), 161.72 (NHCO), 169.13 (NCO)

MS (ESI⁺): m/z = 370,2 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺, 348,1 [$\text{M}+\text{H}$]⁺, 411,1 [$\text{M}+\text{CH}_3\text{CN}+\text{Na}$]⁺, izračunan m/z = 347,16

MS (ESI⁻): m/z = 346,1 [M-H]⁻

IR (ATR): ν [cm^{-1}] = 524, 555, 604, 632, 694, 755, 800, 846, 956, 986, 1041, 1109, 1150, 1179, 1239, 1271, 1318, 1349, 1405, 1486, 1555, 1620, 1656, 2772, 2952, 3083, 3283

Spojina 23:

Molekulska formula: $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2$

Molekulska masa: 347,42 g/mol

Izgled: bel prah

Tališče: 168-171°C

TLC: R_f = 0,15 (MF = EtOAc)

Izkoristek: 66,5 mg, η = 27,9 %

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 1.39 - 1.54 (m, 2H, $\text{OCNCH}_2\text{CH}_2$), 2.02 – 2.06 (m, 2H, $\text{OCNCH}_2\text{CH}_2$), 2.92 - 3.00 (m, 1H, $\text{OCNCH}_2\text{CH}_2$), 3.10 – 3.20 (m, 1H, $\text{OCNCH}_2\text{CH}_2$), 3.38 (s, 2H, COCH_2CN), 3.88 – 3.91 (m, 1H, OCNCH_2), 4.03 – 4.13 (m, 1H, OCNCH_2), 4.68 – 4.74 (m, 1H, CHNH), 6.12 (m, 1H, CHNH), 7.36 – 7.49 (m, 5H, Ar-H), 7.58 – 7.65 (m, 4H, Ar-H)

^{13}C NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ (ppm): 25.40 (2x $\text{OCNCH}_2\text{CH}_2$), 30.96 (CH_2CN), 31.48 (CHNH), 46.37 (2x OCNCH_2), 116.20 (CH_2CN), 126.68 (2x CH-Ar), 126.76 (2x CH-Ar), 127.42 (2x CH-Ar), 127.87 (C-Ar), 129.01 (2x CH-Ar), 134.99 (C-Ar), 139.29 (C-Ar), 141.14 (C-Ar), 161.37 (NCO), 168.79 (NHCO)

MS (ESI⁺): m/z = 411,2 [$\text{M}+\text{CH}_3\text{CN}+\text{Na}$]⁺, 348,2 [$\text{M}+\text{H}$]⁺, izračunan m/z = 347,16

MS (ESI⁻): m/z = 346,2 [M-H]⁻

IR (ATR): ν [cm⁻¹] = 531, 564, 587, 614, 638, 698, 751, 780, 847, 892, 924, 987, 1114, 1158, 1187, 1246, 1273, 1317, 1337, 1367, 1412, 1444, 1548, 1577, 1595, 1622, 1669, 2255, 2923, 3063, 3227, 3286

4.3.7. Sinteza *N*-(1([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-3-il)akrilamida (20)

Pri sintezi spojine 20 smo uporabili identični postopek kot pri sintezi spojine 19, pri čemer smo uporabili 54,48 mg (0,7448 mmol, 1,2 ekviv.) akrilne kisline, 186 mg (0,9682 mmol, 1,3 ekviv.) EDC, 130,81 mg (0,9682 mmol, 1,3 ekviv.) HOBt, ter 244,81 mg (0,6207 mmol, 1 ekviv.) spojine 18.A. Dobili smo 262,62 mg olja (rjave barve), ki smo ga očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc : MeOH = 4 : 1).

Združili smo frakcije od 9-15, uparili topilo pod znižanim tlakom in dobili 60,66 mg brezbarvnega oljnatega zaostanka na bučki (kasneje opazimo da so svetleči kristali). Po NMR analizi smo ugotovili, da nimamo prave spojine. Združili smo frakcije od 26-48, uparili topilo pri znižanem tlaku in dobili 30,6 mg puhaste bele spojine. Tudi tukaj smo po NMR in MS analizi videli, da nimamo prave spojine.

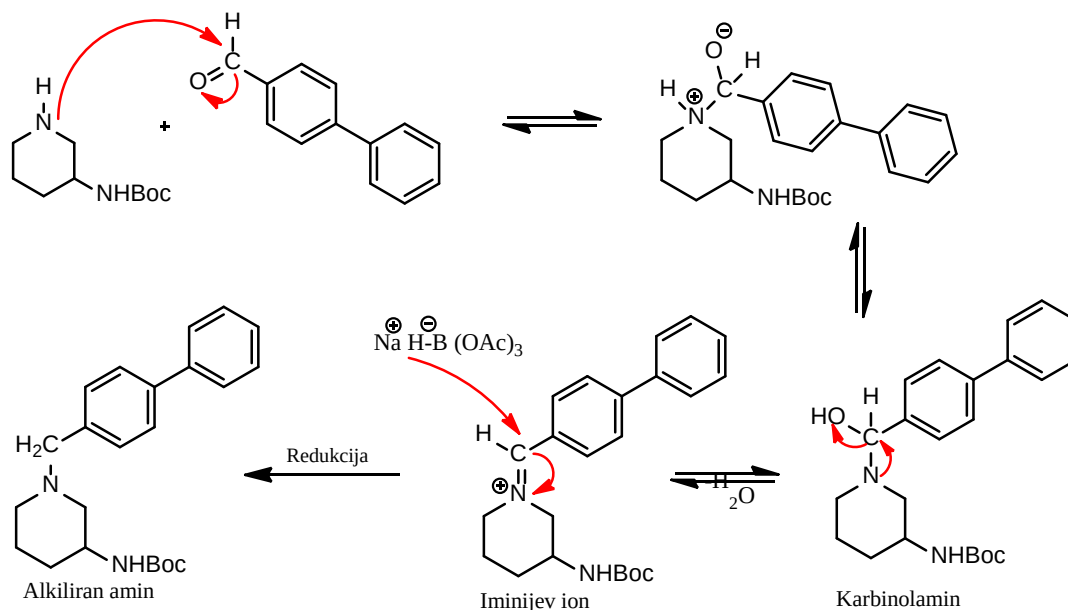
5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. Reduktivno aminiranje zaščitene aminopiperidinov

Reduktivno aminiranje aldehydov in ketonov je reakcija, ki se najpogosteje uporablja za sintezo primarnih, sekundarnih in terciarnih aminov. V preteklosti sta se kot reducenta najpogosteje uporabljala natrijev borhidrid (NaBH_4) in natrijev cianoborhidrid (NaBH_3CN). Prvi je zelo reaktiven, drugi toksičen, zato ju sedaj pogosto nadomešča alternativni reducent natrijev triacetoksiborhidrid $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, ki je selektiven, zelo blag reducent, ki daje višje izkoristke. Selektivno reducira raje aldehyde kot ketone. Zelo blag reducent je zaradi steričnih in elektronakceptorskih učinkov treh acetoksi skupin, ki stabilizirajo bor-vodikovo vez, rezultat tega pa je zmanjšan reduktivni učinek (22).

V prvi stopnji smo na zaščitene aminopiperidine vezali ekvivalentno količino 4-bifenilkarboksaldehida. Reakcijo smo izvajali v THF. Ker bi lahko prišlo do nastanka stranskih produktov, smo reakcijo izvajali na ledeni kopeli. Dodali smo tudi eno kapljico očetne kisline, ki deluje kot katalizator in pospeši reakcijo. Dodatek očetne kisline ni nujen, saj reakcije z aldehydi navadno potečejo zelo hitro, vendar je zaželeno, da je medij šibko kisel. Pri reakciji reduktivnega aminiranja pride najprej do nukleofilnega napada aminske skupine na karbonilni ogljik. Nato se proton premesti z amino skupine oz. dušikovega atoma na hidroksilno skupino, ki se pretvori v dobro izstopajočo skupino. Nastane nestabilen intermediat karbinolamin, ki dehidrira (odcepi se voda) do imina. Reakcija pri kateri nastane imin je reverzibilna. Pri šibko kislih ali nevtralnih pogojih se imin protonira do iminjevega iona. Z dodatkom reducenta se reducira do alkiliranega amina; ta stopnja je ireverzibilna (reakcijo prikazuje slika 22). Kot reducent smo uporabili $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ in sicer dvakratni prebitek glede na aminopiperidin, ter pustili na sobni temperaturi en dan. Izbira reducenta je zelo pomemben parameter za uspeh reakcije, saj mora reducent reducirati imine (ali iminijeve ione) selektivno pred aldehydi ali ketoni (22, 23).

Produktom smo nato odparili THF ter preostanek v bučki raztopili v EtOAc in NaHCO_3 , da smo odstranili nezreagirano kislino. Organsko fazo smo nato sprali z nasičeno raztopino NaCl, da smo odtegnili vodo. Nato smo jo sušili z NaSO_4 . Ker produkti, ki smo jih dobili niso bili čisti, je bilo potrebno še čiščenje s kolonsko kromatografijo.

Slika 22: Mehanizem reakcije reduktivnega aminiranja za tvorbo spojine **9** (prirejeno po 22)

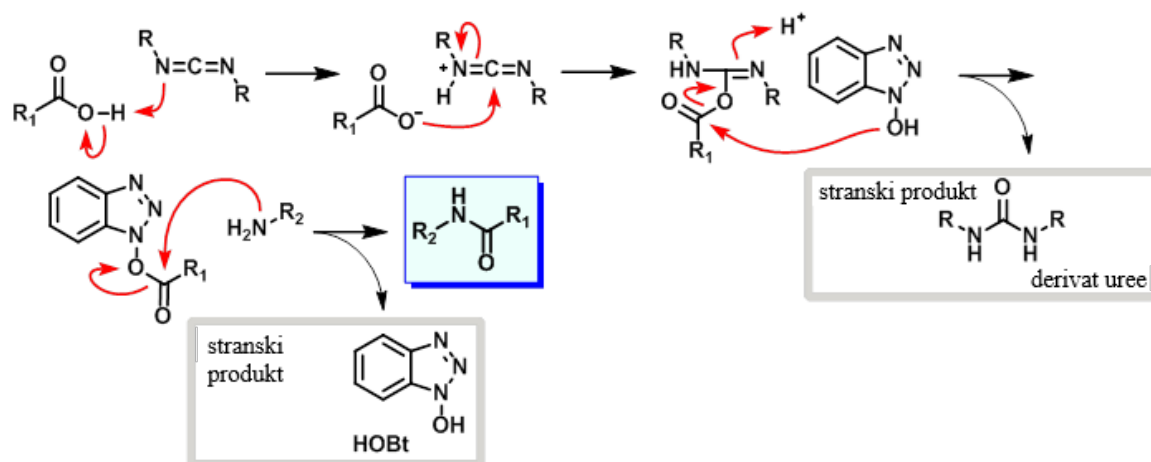
5.2. Sinteza amidov

5.2.1. N-aciliranje z uporabo sklopitvenih reagentov

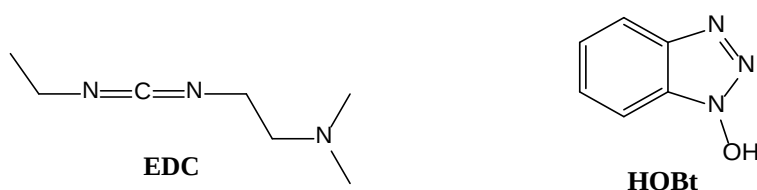
Sinteza amidov je zelo pomembna reakcija v organski sintezi in je navadno sprožena z enim od številnih sklopitvenih reagentov. Amidne vezi teoretično sintetiziramo iz karboksilnih kislin in aminov, pri čemer se odcepi molekula vode. Vendar do reakcije med tema funkcionalnima skupinama ne pride spontano pri sobni temperaturi, ampak so za eliminacijo vode potrebne temperature višje od 200°C. Karboksilna skupina pod običajnimi pogoji ne reagira kot elektrofil, saj je -OH skupina slaba izstopajoča skupina. Pred dodatkom amina je treba najprej aktivirati karboksilno kislino -OH skupino je treba pretvoriti v dobro izstopajočo skupino. Za aktiviranje karboksilne skupine uporabljamo sklopitvene reagente – najbolj pogosta je uporaba karbodiimidov (24). Karbodiimidi vsebujejo dva dušikova atoma ki sta šibko alkalna; to je dovolj za sprožitev reakcije med karbodiimidom in kislino. Pri tem nastaja zelo reaktivna O-acilsečnina, ki povzroči premestitev znotraj molekule do N-acilsečnine, ki ni več reaktivna. Pride lahko do racemizacije oziroma nastanka drugega optičnega izomera. Aktivni estri aditivov kot so N-hidroksi derivati (HOxt) so manj reaktivni od O-acilsečnine. Njihov dodatek poveča učinkovitost reakcije, saj preprečijo premestitev do N-acilsečnine s protoniranjem O-acilsečnine. Tvorijo se aktivni estri s čimer se zmanjša stopnja racemizacije (25, 26).

Sledi nukleofilna adicija amino skupine, ki je nukleofil in napade karbonilno skupino estra. Nastane amid in pa neželen stranski produkt *N*-acilsečnina. S primernimi reakcijskimi pogoji (temperatura 0°C) in dodatkom HOBt lahko zmanjšamo možnost nastanka le-te. HOBt omogoča hitrejši napad na karbonilno skupino estra, pri čimer se tvori intermediat, ki se z amidno vezjo poveže z aminom (26).

Za aktivacijo karboksilne skupine smo uporabili reagent EDC. Reakcije smo izvajali z bifetil-3-karboksilno kislino. Reakcijski zmesi smo dodali tudi bazo trietilamin, ki uravnava pH zmesi ter poskrbi za pretvorbo EDC v obliko proste baze in mu tako poveča topnost. EDC je kot reagent v obliki soli s HCl, zato je v organskih topilih slabo topen. EDC smo dodali v 1,3-kratnem prebitku glede na aminopiperidin. Nato smo dodali zaščiteno 3- oziroma 4-aminopiperidin in mešali pri sobni temperaturi en dan. Produkto smo izolirali z ekstrakcijo ter očistili s kolonsko kromatografijo. Dodatek 10-odstotne citronske kisline je povzročil nakisanje vodnega medija, tako da so se bazične snovi (nezreagiran amin, EDC, trietilamin) izločile v vodno fazo. Nato smo dodali NaHCO₃ za disociacijo in odstranitev nezreagirane izhodne spojine. Nato smo dodali še nasičeno raztopino NaCl, da smo odstranili zaostanek vode. V obeh primerih je bilo potrebno še čiščenje s kolonsko kromatografijo.



Slika 23: Mehanizem sklopitvene reakcije med karboksilno kislino in aminom z uporabo EDC in HOBt (prirejeno po 27)

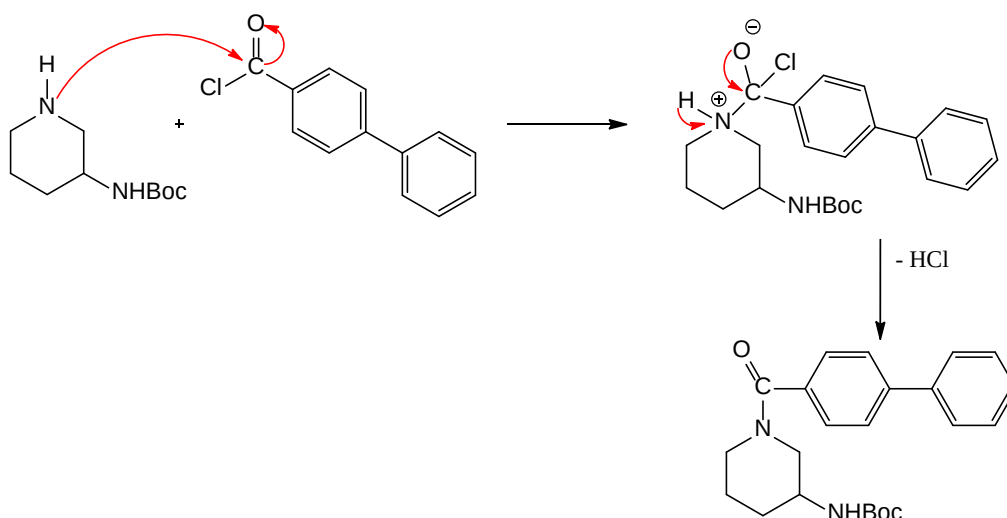


Slika 24: Sklopitveni reagent EDC ter zaviralec racemizacije HOBt (prirejeno po 26)

5.2.2. Sinteza amidov z uporabo kislinskega klorida

Pri sintezi spojin **17**, **17.A** in **21** smo amidno vez tvorili z nukleofilno adicijo aminopiperidina na karbonilni C-atom 4-bifenilkarbonil klorida, ki ima vezane elektronegativne atome in ima zato velik primankljaj elektronov. Reakcije smo izvajali z brezvodnim DKM pri sobnih pogojih, saj bi lahko ob prisotnosti vode prišlo do hidrolize do karboksilne kisline. Dodali smo tudi bazo *N,N*-diizopropiletilamin, ki je nevtralizirala HCl, sproščen med reakcijo in tako preprečila pretvorbo amina do nereaktivne soli. Reakcija posledično ne bi bila uspešna saj bi bil amin protoniran in ne bi deloval kot nukleofil. Potek reakcij smo spremljali s TLC in po enem dnevu mešanja odparili topilo pri znižanem tlaku. Spojine smo očistili še z ekstrakcijo in kolonsko kromatografijo.

Pri reakcijah s kislinskimi kloridi lahko pride do hidrolize, racemizacije, cepitve zaščitnih skupin in drugih stranskih reakcij (26).



Slika 25: Mehanizem tvorbe amida (spojina **17**) (prirejeno po 25, 26)

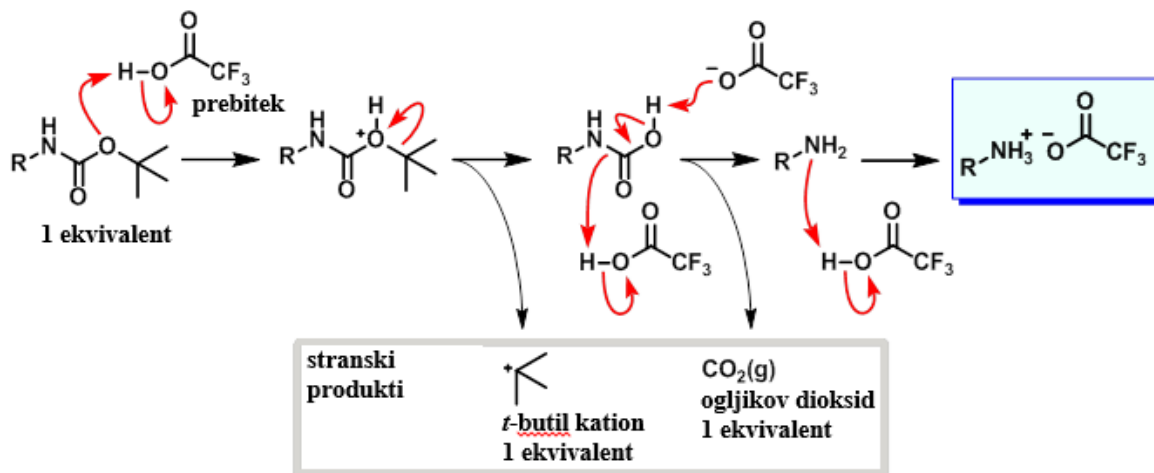
5.3. Odstranitev *tert*-butilkarbamate zaščite z amino skupine

V naslednji stopnji smo spojinam odstranili Boc-zaščitno skupino z acidolizo. Ker je Boc-skupina občutljiva na kisel medij, smo dodali trifluoroocetno kislino. Lahko bi uporabili tudi vodikov klorid v ustreznem topilu. Reakcijo smo izvajali eno uro v brezvodnem DKM na sobni temperaturi v argonovi atmosferi.

Mehanizem odstranitve Boc zaščite:

Proton trifluoroocetne kisline napade kisik na karbonilni skupini Boc zaščitne skupine. Odcepi se sterično stabiliziran *tert*-butilni karbokation in nastane derivat karbamske kisline,

ki pa je nestabilen zato razpade na prosti amin in ogljikov dioksid. Ker imamo kisle pogoje se prosti amin protonira do soli trifluoroocetne kisline. Po končani reakciji smo odparili topilo na rotavaporju ter dodali Et₂O s katerim smo odstranili prebitno kislino (28, 29).



Slika 26: Mehanizem odstranitve Boc zaščite s TFA (prirejeno po 30)

5.4. Uvajanje elektrofilnega centra oz. nitrilne/akrilamidne »bojne glave« na aminopiperidinski skelet

Princip reakcije je enak, kot že opisan v poglavju 5.2.1. Akrilni oziroma cianoocetni kislini, EDC in HOBt smo dodali N-metilmorfolin in pa spojine, katerim smo odstranili Boc-zaščito. Nastale spojine smo izolirali z ekstrakcijo in kolonsko kromatografijo. V nekaterih primerih samo s kromatografijo.

V zadnji stopnji sinteze nam je uspelo sintetizirati osem končnih spojin. Treh spojin nam ni uspelo sintetizirati (**8**, **16**, **20**). Glede na to, da smo z MS potrdili, da smo do predzadnje stopnje imeli prave spojine, predvidevamo, da je do težav prišlo pri zadnji stopnji. V vseh treh primerih smo pred kolonsko kromatografijo izvedli ekstrakcijo. Predvidevamo, da so spojine v tej stopnji razpadle. Verjetno smo z uporabo ekstrakcije naredili napako, saj bi mogoče spojine lahko dovolj dobro očistili tudi samo z uporabo kolonske kromatografije.

Spojine bodo biokemično ovrednotene na Fakulteti za Farmacijo v Ljubljani.

6. SKLEP

V magistrski nalogi smo sintetizirali potencialne aminopiperidinske zaviralce treoninskih proteaz, katerim je bil skupen aminopiperidinski skelet, substituiran na obeh aaminskih dušikih.

Brez večjih težav smo sintetizirali osem spojin, treh nam ni uspelo. V vseh treh neuspešnih poskusih sinteze smo pred kolonsko kromatografijo izvedli ekstrakcijo. Predvidevamo, da so spojine v tej stopnji razpadle. Verjetno smo z uporabo ekstrakcije naredili napako, saj bi mogoče spojine lahko dovolj dobro očistili tudi samo z uporabo kolonske kromatografije.

S spojinami, ki smo jih sintetizirali z reduktivnim aminiranjem, smo imeli več težav; tudi izkoristki so bili zelo nizki. Spojine sintetizirane z uporabo sklopitvenih reagentov so imele večje izkoristke.

Sintetiziranim spojinam bomo testirali tudi njihovo zaviralno aktivnost na izolirani $\beta 5i$ podenoti imunoproteasoma. Za delovanje je zelo pomemben fenilni obroč ter »bojna glava«, ki reagira s treoninom v aktivnem mestu imunoproteasoma.

Zaenkrat so razpoložljivi podatki o imunoproteasomu kot tarči še nekoliko pomanjkljivi. Zato bodo potrebne nadaljnje študije o imunoproteasomu kot terapevtski tarči za zdravljenje raka in avtoimunskih bolezni. Prav tako so potrebne še nadaljnje raziskave na področju $\beta 5i$ selektivnih zaviralcev. Razvoj novih spojin z izboljšanimi farmakokinetičnimi in farmakodinamičnimi lastnostmi in pa nadaljnja optimizacija že znanih selektivnih zaviralcev druge generacije, bosta pripomogla k bolj uspešnemu zdravljenju različnih rakavih obolenj in avtoimunskih bolezni.

7. VIRI IN LITERATURA

1. Collins G. A., Goldberg A. L.: The Logic of the 26S Proteasome. *Cell* 2017; 169(5): 792-806.
2. Lecker S. H.: Protein Degradation by the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Normal and Disease States. *Journal of the American Society of Nephrology* 2006; 17(7): 1807-1819.
3. Voorhees P. M., Dees E. C., O'Neil B., Orlowski R. Z.: The proteasome as a target for cancer therapy. *Clinical Cancer Research* 2003; 9(4): 6316-25.
4. Wang J., Maldonado M. A: The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. *Cellular & molecular immunology* 2006; 3(4): 255-261.
5. Ciechanover A., Brundin P.: The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron* 2003; 40(2): 427-446.
6. Livneh I., Cohen-Kaplan V., Cohen-Rosenzweig C., Avni N., Ciechanover A.: The life cycle of the 26S proteasome: From birth, through regulation and function, and onto its death. *Cell Research* 2016; 26(8): 869-885.
7. Graham L. P.: *Medicinal Chemistry*. Sixth edition. New York: Oxford; 2017: 597 - 600.
8. Adams J.: The proteasome: Structure, function, and role in the cell. *Cancer Treatment Reviews* 2003; 29(suppl. 1): 3-9.
9. Huber E. M., Groll M.: Inhibitors for the immuno- and constitutive proteasome: Current and future trends in drug development. *Angewandte Chemie - International Edition* 2012; 51(35): 8708-8720.
10. Raynes R., Pomatto L. C. D., Davies K. J. A.: Degradation of oxidized proteins by the proteasome: Distinguishing between the 20S, 26S, and immunoproteasome proteolytic pathways. *Molecular Aspects of Medicine* 2016; 50: 41-55.
11. Kimura H., Caturegli P., Takahashi M., Suzuki K.: New Insights into the Function of the Immunoproteasome in Immune and Nonimmune Cells. *Journal of Immunology Research* 2015; 2015.
12. Kuhn D. J., Orlowski R. Z.: The Immunoproteasome as a Target in Hematologic Malignancies. *Seminars in Hematology* 2012; 49(3): 258-262.
13. Kuhn D. J., Hunsucker S. A., Chen Q., Voorhees P. M., Orlowski M., Orlowski R. Z.: Targeted inhibition of the immunoproteasome is a potent strategy against models

- of multiple myeloma that overcomes resistance to conventional drugs and nonspecific proteasome inhibitors. *Blood* 2009; 113(19): 4667-4676.
14. Miller Z., Ao L., Kim K. B., Lee W.: Inhibitors of the immunoproteasome: current status and future directions. *Current pharmaceutical design* 2013; 19(22): 4140-4151.
 15. <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/6avo/index> (dostopano 12.06.2018).
 16. Adams J., Kauffman M.: Development of the proteasome inhibitor Velcade™ (Bortezomib). *Cancer Investigation* 2004; 22(2): 304-311.
 17. Hasinoff B. B.: Progress curve analysis of the kinetics of slow-binding anticancer drug inhibitors of the 20S proteasome. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2018; 639: 52-58.
 18. Stewart A. K., Rajkumar S. V., Dimopoulos M. A., et al.: Carfilzomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Relapsed Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine* 2015; 372(2): 142-152.
 19. Augello G., Modica M., Azzolina A., et al.: Preclinical evaluation of antitumor activity of the proteasome inhibitor MLN2238 (ixazomib) in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death & Disease* 2018; 9(2): 28.
 20. Crawford L. J., Irvine A. E.: Targeting the ubiquitin proteasome system in haematological malignancies. *Blood Reviews* 2013; 27(6): 297-304.
 21. De Bruin G., Huber E. M., Xin B. T., et al.: Structure-based design of β 1i or β 5i specific inhibitors of human immunoproteasomes. *Journal of Medicinal Chemistry* 2014; 57(14): 6197-6209.
 22. Abdel-Magid A. F., Carson K. G., Harris B. D., Maryanoff C. A., Shah R. D.: Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures. *The Journal of Organic Chemistry* 1996; 61(11): 3849-3862.
 23. Tripathi R., Verma S., Pandey J., Tiwari V.: Recent Development on Catalytic Reductive Amination and Applications. *Current Organic Chemistry* 2008; 12(13): 1093-1115.
 24. Valeur E., Bradley M.: Amide bond formation: Beyond the myth of coupling reagents. *Chemical Society Reviews* 2009; 38(2): 606-631.
 25. El-Faham A.: Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem Rev* 2011: 6557-6602.
 26. Montalbetti C. A. G. N., Falque V.: Amide bond formation and peptide coupling.

- Tetrahedron* 2005; 61(46): 10827-10852.
27. http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Amine_to_Amide_Coupling/Amine_to_Amide_Coupling_HOBt_EDC_Mech.htm (dostopano 03.05.2018).
 28. Lundt B. F., Johansen N. L., Vølund A., Markussen J.: REMOVAL OF t-BUTYL AND t-BUTOXYCARBONYL PROTECTING GROUPS WITH TRIFLUOROACETIC ACID: Mechanisms, Biproduct Formation and Evaluation of Scavengers. *International Journal of Peptide and Protein Research* 1978; 12(5): 258-268.
 29. Ashworth I. W., Cox B. G., Meyrick B.: Kinetics and mechanism of N-Boc cleavage: Evidence of a second-order dependence upon acid concentration. *Journal of Organic Chemistry* 2010; 75(23): 8117-8125.
 30. http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection_TFA_Mech.htm (dostopano 02.05.2018).