

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA GRUDNIK

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



MAJA GRUDNIK

**SINTEZA BIOIZOSTEROV 4-(4-FLUOROSTIRIL)-1-
(PROP-2-IN-1-IL)PIPERIDINA IN VREDNOTENJE
NJIHOVEGA ZAVIRALNEGA DELOVANJA NA
MONOAMIN OKSIDAZI**

**SYNTHESIS OF BIOISOSTERS OF 4-(4-FLUOROSTYRYL)-
1-(PROP-2-YN-1-YL)PIPERIDINE AND THEIR
INHIBITORY ACTIVITY EVALUATION ON MONOAMINE
OXIDASE**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Eksperimentalni del magistrske naloge sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sove, mag. farm. Vse meritve in analize so bile izvedene na Fakulteti za farmacijo.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Mateju Sovi, mag. farm. za vse nasvete, usmerjanje in pomoč pri izvedbi laboratorijskega dela ter za strokovni pregled magistrske naloge.

Hvala vsem ostalim zaposlenim na Fakulteti, ki so na kakršenkoli način pripomogli k izdelavi magistrske naloge.

Zahvaljujem se staršem, ki so mi študij finančno omogočili, ter sestri, prijateljem in sošolcem, ki so me spremljali celotno študijsko pot in me podpirali.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sove, mag. farm.

Ljubljana, 2018

Maja Grudnik

Predsednik komisije: Izr. prof. dr. Mitja Kos, mag. farm.

Član komisije: Doc. dr. Bojan Doljak, mag. farm.

VSEBINA

KAZALO SLIK.....	iv
KAZALO TABEL.....	vi
POVZETEK	vii
ABSTRACT	viii
SEZNAM OKRAJŠAV.....	ix
1 UVOD.....	1
1.1 Parkinsonova bolezen	1
1.1.1 Epidemiologija	1
1.1.2 Klinični znaki	2
1.1.3 Patofiziologija.....	2
1.1.4 Zdravljenje in preprečevanje bolezni	7
1.2 Monoamin oksidaza.....	8
1.2.1 Izoforme MAO	8
1.2.2 Vloga MAO pri Parkinsonovi bolezni.....	9
1.3 Zaviralci monoamin oksidaze	10
1.3.1 Neselektivni (ireverzibilni) zaviralci MAO.....	10
1.3.2 Selektivni (reverzibilni in ireverzibilni) zaviralci MAO	11
2 NAMEN DELA	14
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 MATERIALI	15
3.2 METODE.....	15
3.2.1 Kromatografske metode	15
3.2.2 Spektroskopske metode	16
3.2.3 Biološko testiranje (RA, IC ₅₀)	17
3.2.4 Poimenovanje in risanje spojin.....	18

3.2.5	Določanje tališča.....	18
4	EKSPERIMENTALNO DELO.....	19
4.1	Sinteza 1-(<i>terc</i> -butoksikarbonil)piperidin-4-karboksilne kisline (1).....	19
4.2	Sinteza <i>terc</i> -butil 4-(metoksi(metil)karbamoil)piperidin-1-karboksilata (2).....	20
4.3	Sinteza <i>terc</i> -butil 4-formilpiperidin-1-karboksilata (3).....	21
4.4	Sinteza 5-(bromometil)-1,3-benzodioksola oz. piperonil bromida (4).....	22
4.5	PRIPRAVA WITTIGOVIH REAGENTOV.....	23
4.6	WITTIGOVA REAKCIJA.....	25
4.6.1	Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>E</i>)-4-(2-nitrostiril)piperidin-1-karboksilata (11).....	26
4.6.2	Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>E</i>)-4-(4-(metoksikarbonil)stiril)piperidin-1-karboksilata (12)	27
4.6.3	Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>E</i>)-4-(2-(naftalen-2-il)vinil)piperidin-1-karboksilata (13) in <i>terc</i> -butil (<i>Z</i>)-4-(2-(naftalen-2-il)vinil)piperidin-1-karboksilata (14).....	28
4.6.4	Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>E</i>)-4-(3-(metoksikarbonil)stiril)piperidin-1-karboksilata (15)	29
4.6.5	Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>E</i>)-4-(2-(benzo[1,3]dioksol-5-il)vinil)piperidin-1-karboksilata (16).....	30
4.6.6	Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>E</i>)-4-(2-(metoksikarbonil)stiril)piperidin-1-karboksilata (17)	31
4.7	ODSTRANITEV BOC ZAŠČITE in N-ALKILACIJA PIPERIDINA.....	32
4.7.1	Sinteza (<i>E</i>)-4-(2-nitrostiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (19).....	33
4.7.2	Sinteza metil (<i>E</i>)-4-(2-(1-(prop-2-in-1-il)piperidin-4-il)vinil)benzoata (20)	34
4.7.3	Sinteza (<i>E</i>)-4-(2-(naftalen-1-il)vinil)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (21) in (<i>Z</i>)-4-(2-(naftalen-1-il)vinil)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (22).....	35
4.7.4	Sinteza metil (<i>E</i>)-3-(2-(1-(prop-2-in-1-il)piperidin-4-il)vinil)benzoata (23)	37
4.7.5	Sinteza (<i>E</i>)-4-(2-(benzo[1,3]dioksol-5-il)vinil)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (24)	38

4.7.6	Poskus sinteze metil (<i>E</i>)-2-(2-(1-(prop-2-in-1-il)piperidin-4-il)vinil)benzoata (25)	39
4.7.7	Poskus sinteze (<i>E</i>)-4-(2-(1-(prop-2-in-1-il)piperidin-4-il)vinil)benzojske kisline (26)	40
5	RAZPRAVA IN REZULTATI	41
5.1	KOMENTAR SINTEZNEGA DELA	41
5.1.1	UVEDBA ZAŠČITNE SKUPINE Boc ₂ O	41
5.1.2	SINTEZA WEINREBOVEGA AMIDA IN NJEGOVA REDUKCIJA DO ALDEHIDA	42
5.1.3	PRIPRAVA WITTIGOVEGA REAGENTA IN WITTIGOVA REAKCIJA	43
5.1.4	ODSTRANITEV BOC ZAŠČITE IN N-ALKILIRANJE	44
5.2	REZULTATI IN KOMENTAR BIOLOŠKEGA TESTIRANJA	45
5.2.1	Rezultati biološkega testiranja	45
5.2.2	Komentar biološkega testiranja	46
6	SKLEP	48
7	VIRI IN LITERATURA	49

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz dopaminergičnega sistema v možganih.....	3
Slika 2: Na sliki so prikazane glavne metabolične poti dopamina in nastanek ROS označenih z rdečo barvo	5
Slika 3: Ključni molekularni mehanizmi, ki prispevajo k procesu nevrodegeneracije pri PB.	7
Slika 4: Katalitični cikel MAO.....	9
Slika 5: Moklobemid.	11
Slika 6: Selektivna ireverzibilna zaviralca MAO-B.....	13
Slika 7: Shema načrtovanja 1-(prop-2-in-1-il)piperidinskih analogov (s puščicami so označena mesta modifikacij).	14
Slika 8: Shematski prikaz reakcij biokemijskega testiranja.	17
Slika 9: Reakcijska shema sinteze spojine <u>1</u>	19
Slika 10: Reakcijska shema sinteze spojine <u>2</u>	20
Slika 11: Reakcijska shema sinteze spojine <u>3</u>	21
Slika 12: Reakcijska shema sinteze spojine <u>4</u>	22
Slika 13: Reakcijska shema priprave Wittigovih reagentov.....	23
Slika 20: Reakcijska shema Wittigove reakcije	25
Slika 21: Reakcijska shema sinteze spojine <u>11</u>	26
Slika 22: Reakcijska shema sinteze spojine <u>12</u>	27
Slika 23: Reakcijska shema sinteze spojine <u>13</u> in <u>14</u>	28
Slika 24: Reakcijska shema sinteze spojine <u>15</u>	29
Slika 25: Reakcijska shema sinteze spojine <u>16</u>	30
Slika 26: Reakcijska shema sinteze spojine <u>17</u>	31
Slika 27: Reakcijska shema odstranitve Boc zaščite in N-alkilacije piperidina.....	32
Slika 28: Reakcijska shema sinteze spojine <u>19</u>	33
Slika 29: Reakcijska shema sinteze spojine <u>20</u>	34
Slika 30: Reakcijska shema sinteze spojine <u>21</u> in <u>22</u>	35
Slika 31: Reakcijska shema sinteze spojine <u>23</u>	37
Slika 32: Reakcijska shema sinteze spojine <u>24</u>	38
Slika 33: Reakcijska shema sinteze spojine <u>25</u>	39
Slika 34: Reakcijska shema sinteze spojine <u>26</u>	40

Slika 35: Redukcija Weinrebovega amida do aldehida	42
Slika 36: Struktura ilida.....	43
Slika 37: Shema priprave Wittigovega reagenta in mehanizem Wittigove reakcije	44

KAZALO TABEL

Tabela 1: Analizni podatki za spojino <u>1</u>	19
Tabela 2: Analizni podatki za spojino <u>2</u>	20
Tabela 3: Analizni podatki za spojino <u>3</u>	22
Tabela 4: Analizni podatki za spojino <u>4</u>	22
Tabela 5: Sinteza Wittigovih reagentov po splošnem postopku A.....	23
Tabela 6: Analizni podatki za spojino <u>11</u>	26
Tabela 7: Analizni podatki za spojino <u>12</u>	27
Tabela 8: Analizni podatki za spojino <u>13</u> in <u>14</u>	28
Tabela 9: Analizni podatki za spojino <u>15</u>	29
Tabela 10: Analizni podatki za spojino <u>16</u>	30
Tabela 11: Analizni podatki za spojino <u>17</u>	31
Tabela 12: Analizni podatki za spojino <u>19</u>	33
Tabela 13: Analizni podatki za spojino <u>20</u>	34
Tabela 14: Analizni podatki za spojino <u>21</u> in <u>22</u>	36
Tabela 15: Analizni podatki za spojino <u>23</u>	37
Tabela 16: Analizni podatki za spojino <u>24</u>	38
Tabela 17: Analizni podatki za spojino <u>25</u>	39
Tabela 18: Rezultati biološkega testiranja končnih spojin	45

POVZETEK

Parkinsonova bolezen (PB) je kronična napredujoča neurodegenerativna bolezen, ki prizadene kar 0,3% splošne populacije. Značilnost bolezni je pomanjkanje živčnega prenašalca dopamina (DA) zaradi izgube dopaminergičnih nevronov v striatumu, pri čemer pa s svojo vpletenostjo v proces presnove DA igra ključno vlogo encim monoamin oksidaza (MAO). Simptome bolezni je moč oblažiti z zdravili, ki tako ali drugače nadomestijo primanjkljaj DA, med katerimi so tudi zaviralci MAO-B. Zaradi zmanjšane razgradnje DA se zmanjša oksidativni stres in posledična okvara ter propad dopaminergičnih nevronov, poleg tega pa zaviralci MAO-B preko številnih mehanizmov delujejo nevroprotektivno. Čeprav sta danes na trgu prisotna dva selektivna ireverzibilna zaviralca MAO-B, selegilin in razagilin, pa se odkrivanje novejših zaviralcev še nadaljuje.

V okviru magistrske naloge smo na osnovi znanega zaviralca MAO-B 4-(4-fluorostiril)-1-propargilpiperidina sintetizirali bioizostere, predhodno načrtovane s pomočjo programa BoBER na Kemijskem inštitutu v Ljubljani. Izhajali smo iz osnovnega piperidinskega skeleta z ohranjeno *N*-propargilaminsko skupino, na drugem delu molekule pa smo na različna mesta aromatskega obroča uvajali različne substituentne. Končne spojine smo pridobili s 6-stopenjsko sintezo, ki jo sestavljajo: uvedba terc-butilkarbamate (Boc) zaščitne skupine, sinteza Weinrebovega amida in njegova redukcija do aldehida, Wittigova reakcija, odstranitev Boc zaščite ter *N*-alkiliranje. Pripravili smo optično čiste *cis* in *trans* izomere. Našim končnim spojinam smo ovrednotili zaviralno delovanje na encimih MAO-A in MAO-B s pomočjo biokemijskega testiranja. V nanomolarnem območju sta zaviralno delovanje na MAO-B izkazali samo dve spojini, izmed katerih je encim najmočnejše zavirala spojina **20** z $IC_{50} = 14,7$ nM, takoj za njo pa spojina **21** z $IC_{50} = 18,3$ nM. Če primerjamo vpliv *cis* in *trans* izomerije na zaviralno delovanje, so MAO-B močnejše zavirale spojine s *trans* konfiguracijo. Ugotovili smo, da na zaviralno delovanje vplivata vrsta in pozicija substituenta na benzenovem obroču. Spojine substituirane na *para* mestu so imele večjo jakost delovanja v primerjavi z *meta* ali *orto* substituiranimi derivati.

Spojini **20** in **21** izkazujeta močno zaviralno delovanje na MAO-B in lahko predstavljata izhodišče pri načrtovanju novejših zaviralcev MAO-B kot potencialnih zdravilnih učinkovin za zdravljenje PB ter ostalih neurodegenerativnih bolezni.

Ključne besede: Parkinsonova bolezen, MAO-B, zaviralci, propargilaminska skupina

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a chronic progressive neurodegenerative disease that affects 0,3 % of the general population. The main feature of the disease is the lack of neurotransmitter dopamine (DA) due to loss of dopaminergic neurons in the striatum, where an enzyme monoamine oxidase (MAO) has a key role with its involvement in the processes. Symptoms of the disease can be treated with medications (including MAO-B inhibitors), which one way or another compensate the lack of DA. Due to reduced degradation of DA, oxidative stress and consequent failure and the collapse of dopaminergic neurons are reduced. In addition, MAO-B inhibitors have neuroprotective function through a number of mechanisms. Although two selective irreversible MAO-B inhibitors, selegiline and rasagiline, are present on the market today, discovery of novel inhibitors continues.

Within this Master's thesis, we synthesized several bioisosters previously designed by BoBER software on the basis of a known MAO-B inhibitor 4-(4-fluorostyryl)-1-propargylpiperidine. We used the main piperidine scaffold with a *N*-propargylamine group and introduced diverse substituents at different positions on the aromatic ring on the other part of the molecule. Final compounds were obtained by a 6-step synthesis consisting of: introduction of the *tert*-butyloxycarbonyl (Boc) protecting group, the synthesis of Weinreb's amide and its reduction to aldehyde, the Wittig reaction, removal of Boc protecting group and *N*-alkylation. We synthesized optically pure *cis* and *trans* isomers, which were further biochemically evaluated for inhibitory activity on both enzymes, MAO-A and MAO-B. Only two compounds showed potent MAO-B inhibitory activity in the nanomolar range, namely compounds **20** and **21** with IC₅₀s of 14,7 nM and 18,3 nM, respectively. Comparing the effect of *cis* and *trans* isomerism on inhibitory activity, MAO-B was strongly inhibited by compounds with *trans* configuration. We found out that the inhibitory activity is also influenced by the type and position of the substituents on the benzene ring. Compounds substituted in the *para* position were more potent compared to those substituted on the *meta* or *orto* position.

Compounds **20** and **21** exhibit potent inhibitory activity on MAO-B and present the important starting point for the design of novel MAO-B inhibitors as potential therapeutic agents for the treatment of PD and other neurodegenerative diseases.

Keywords: Parkinson's disease, MAO-B, inhibitors, propargylamine group

SEZNAM OKRAJŠAV

3-MT	3-metoksitiramin
5-HT	5-hidroksitriptamin
Å	angstrom (merska enota za dolžino: 10^{-10} m)
ACh	acetilholin
ALDH	aldehid dehidrogenaza
BG	bazalni gangliji
Boc ₂ O	di- <i>terc</i> -butil dikarbonat
COMT	katehol- <i>O</i> -metiltransferaza
CŽS	centralni živčni sistem
DA	dopamin
DJ-1	protein deglikaza
DMSO	dimetil sulfoksid
DOPAC	3,4-dihidroksifenilocetna kislina
FAD	flavin adenin dinukleotid
GABA	γ -aminomaslena kislina (angleško: γ -aminobutyric acid)
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza
Glu	glutamat
Gpe	zunanji globus pallidus (angleško: external globus pallidus)
Gpi	notranji globus pallidus (angleško: internal globus pallidus)
GSH	glutation
HOBt	hidroksibenzotriazol
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HVA	homovanilna kislina

Ile	izolevcin
L-DOPA	levodopa
LRRK2	angleško: leucine-rich repeat kinase 2
Lys	lizin
mACh	muskarinski acetilholinski receptor
MAO	monoamin oksidaza
MPP ⁺	1-metil-4-fenilpiridin
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
MS	masna spektrometrija
NMDA	N-metil-D-aspartatni receptor
NMR	jedrska magnetna resonanca
OPA	oksafosfetan
PB	Parkinsonova bolezen
PINK1	gen za mitohondrijsko serin / treonin-protein kinazo
RA	rezidualna aktivnost
Rf	retencijski faktor
RIMA	selektivni reverzibilni zaviralci MAO-A
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
SNc	substancia nigra pars compacta
SNCA	gen za α -sinuklein
SNr	substancia nigra pars reticulata
SOD	superoksid dizmutaza
STn	subtalamično jedro (angleško: subthalamic nucleus)
TBTU	2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronijev tetrafluoroborat

THF	tetrahidrofurán
TLC	tankoplastna kromatografija
Tyr	tirozin
UCH-L1	gen za ubikvitin karboksi-terminalno hidrolazo L1
UPS	ubikvitin-proteasomski sistem

1 UVOD

1.1 Parkinsonova bolezen

Parkinsonski sindrom (parkinsonizem) in Parkinsonovo bolezen (PB) je leta 1817 prvič opisal Londonski zdravnik James Parkinson, ko je pri nekaterih svojih bolnikih opazil tremor v mirovanju in upočasnjeno gibanje. (1,2)

PB je kronična napredujoča nevrodegenerativna bolezen, ki prizadene predvsem telesno motoriko, s čimer bolnika postopoma onemogoči za samostojno življenje. (2,3) Danes vemo, da bolezen nastane zaradi prekinjenega dopaminergičnega prenosa v striatumu, subkortikalnem možganskem jedru, ki ga uvrščamo med bazalne ganglije (BG). (2) Izguba nigrostriatnih dopaminergičnih nevronov in prisotnost intranevronalnih proteinskih citoplazemskih vključkov, znanih kot »Lewisova telesca« sta glavni patološki indikaciji PB. Ker dopamin (DA) kontrolira gibanje in kognicijo, je cerebralna izčrpanost zalog DA razlog za pojav demence, akinezije (nezmožnost izvajanja hotenih gibov), bradikinezije (upočasnjena izvajanja gibov) in mišične rigidnosti (povečan mišični tonus, otrdelost). Pri parkinsonovih bolnikih je moč opaziti posturalne motnje (motnje telesne drže) in deformirano držo. Čeprav ugotovitve nekaterih genetskih raziskav vlivajo nekaj optimizma, pa natančen patogeni mehanizem, ki povzroči izgubo dopaminergičnih celic pri PB, še vedno ni dobro znan. (2,3)

1.1.1 Epidemiologija

PB je takoj za Alzheimerjevo druga najpogostejša nevrodegenerativna bolezen in prizadene v industrializiranih državah približno 0,3% splošne populacije in približno 1 do 2% posameznikov, ki so stari 60 let ali več. (1,4) Je od starosti odvisna bolezen, saj se redko pojavi pri mlajših od 50 let, verjetnost za pojav bolezni pa se s starostjo povečuje in doseže 4% pri najstarejši skupini ljudi (80 let). Raziskave poročajo, da je standardizirana incidenca (pojavnost) PB 8 – 18 bolnikov na 100 000 ljudi na leto. PB naj bi bila manj pogosta znotraj azijske populacije in pri temnopoltih ljudeh, vendar si rezultati študij nasprotujejo. Poročali so, da se bolezen pogosteje pojavlja pri moških kot pri ženskah. Približno 25 – 40% bolnikov s PB eventualno razvijejo demenco zaradi širjenja Lewisovih

telesc v cerebralni korteks in limbični sistem. Tveganje za razvoj demence je 1,7 do 5,9-krat večje pri bolnikih, njihova umrljivost pa je 2 do 5-krat večja kot pri zdravih ljudeh. (1,4)

1.1.2 Klinični znaki

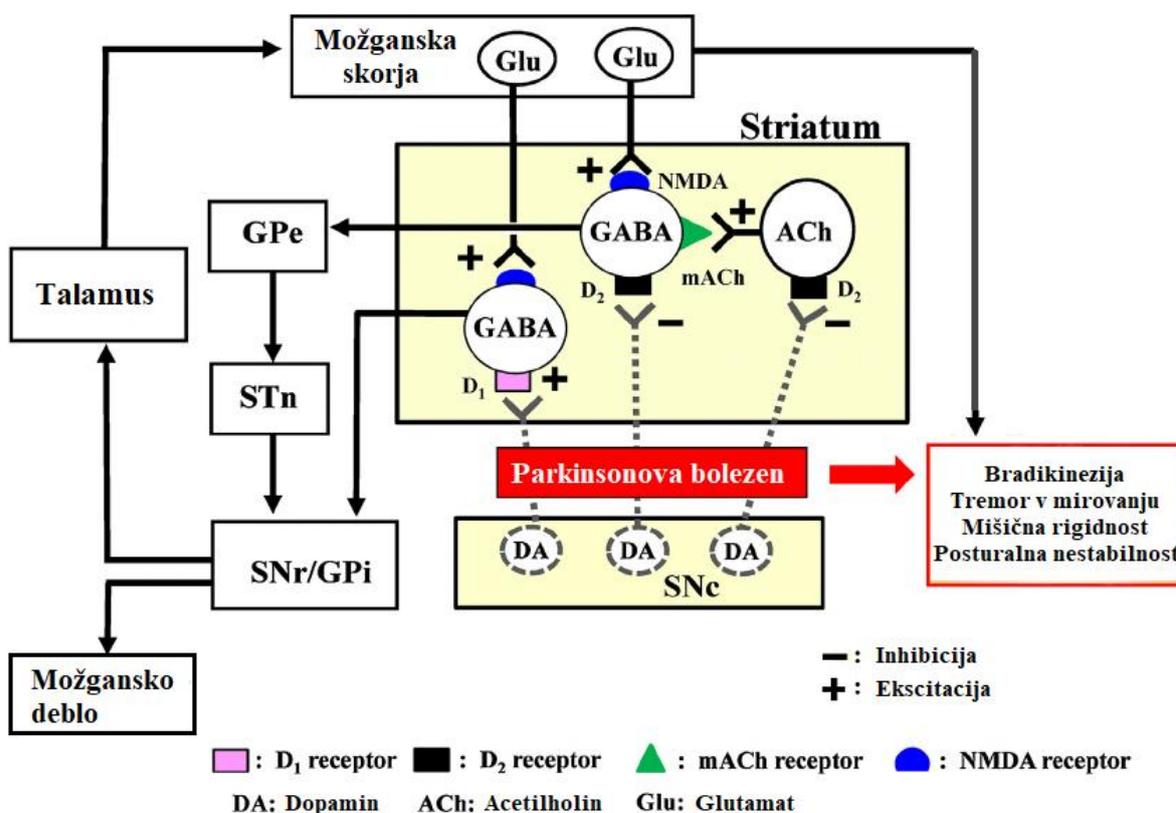
Klinične znake bolezni delimo v tri skupine: predsimptomatske ali asimptomatske, motorične in nemotorične. (5)

Predsimptomatski znaki se lahko pojavijo nekaj let pred motoričnimi simptomi PB. Motnja voha, motnja REM faze spanja in zaprtje so prvi zanesljivi pokazatelj te bolezni. Motorični klinični znaki se kažejo v obliki oslabljenega in počasnega gibanja (akinezija), povišanega mišičnega tonusa (rigidnost), tresenja (tremor) in v napredovali fazi bolezni tudi motnje ravnotežja (posturalne motnje). Bolezenski znaki se tipično pojavijo asimetrično, najprej na eni strani telesa, nato pa prizadenejo celo telo. Bolniki ne morejo premikati obraznih mišic (hipomimija), zelo težko in z zakasnitvijo izvajajo hotene gibe, njihovi koraki so počasni in kratki. Tresenje rok je najbolj značilen znak PB. Kasneje se pojavijo še motnje ravnotežja, padci, spremeni se bolnikov položaj telesa, glava in trup pa sta sklonjena naprej. Nemotorični znaki so številni in še slabše vplivajo na bolnikovo kakovost življenja. Zaprtje, motnje mokrenja, erektilna disfunkcija, suha usta, motnje potenja, ortostatska hipotenzija so posledica motenj delovanja avtonomnega živčevja. Bolniki imajo težave s spanjem, ponoči se pogosto zbudijo ali pa imajo težave s prekomerno dnevno utrujenostjo. (5) PB pogosto spremljajo tudi spontana bolečina in druge senzorične motnje ter psihiatrične motnje kot so depresija, strah, anksioznost, panični napadi, apatičnost, motnje spomina, težave z načrtovanjem, demenca in psihoza. (2,5)

1.1.3 Patofiziologija

PB vpliva na del možganov imenovan bazalni ganliji (BG), ki so sestavljeni iz petih med seboj povezanih subkortikalnih jeder. Ta pokrivajo telencefalon (veliki možgani), diencefalon in mezencefalon (medmožgani) in vključujejo striatum, globus pallidus, subtalamična jedra, substanco nigro pars reticulato (SNr) in pars compacto (SNc). (1) DA se v striatumu fazično sprošča iz živčnih končičev v sinaptično špranjo, pomembno vlogo

pa ima tudi tonus (koncentracija) DA v striatumu. Vzdrževanje dopaminergičnega tonusa v striatumu omogoča izvensinaptično sproščanje DA, ki poteka iz zadebeljenih delov aksonov, v katerih so sinaptični mešički, ki sproščajo neurotransmiter. Tako lahko dopamin uravnava tudi delovanje dopaminoceptivnih sinaps, ki niso v neposrednem stiku z dopaminskimi končiči. Poleg DA se v striatumu sproščajo še številni drugi prenašalci. Striatum je z izhodnima jedroma BG (Gpi/SNr) povezan prek neposredne in posredne poti. Neposredno pot sestavljajo inhibitorni nevroni (GABA), ki imajo sinapse v Gpi/SNr (monosinaptična pot). Posredno pot pa sestavljajo inhibitorni nevroni z zaporednimi sinapsami v Gpe in STn ter ekscitatorni nevroni (glutamat) s sinapsami v Gpi/SNr (polisinaptična pot). Dopamin iz nigrostriatnih nevronov v striatumu preko dopaminskih receptorjev D₁ spodbuja nevrone neposredne poti, preko dopaminskih D₂ receptorjev pa zavira nevrone posredne poti. Na ta način preko obeh poti zavre delovanje izhodnih jeder BG (Gpi in SNr) in s tem pospešuje delovanje tarčnih jeder v talamusu, ti pa spodbujajo delovanje možganske skorje. Nevronska mreža je torej zgrajena tako, da ima zmanjšanje dopaminskega tonusa v striatumu za posledico zaviranje, zvečanje dopaminskega tonusa pa pospešeno delovanje motorične možganske skorje. (2)



Slika 1: Shematski prikaz dopaminergičnega sistema v možganih (prirejeno po 6).

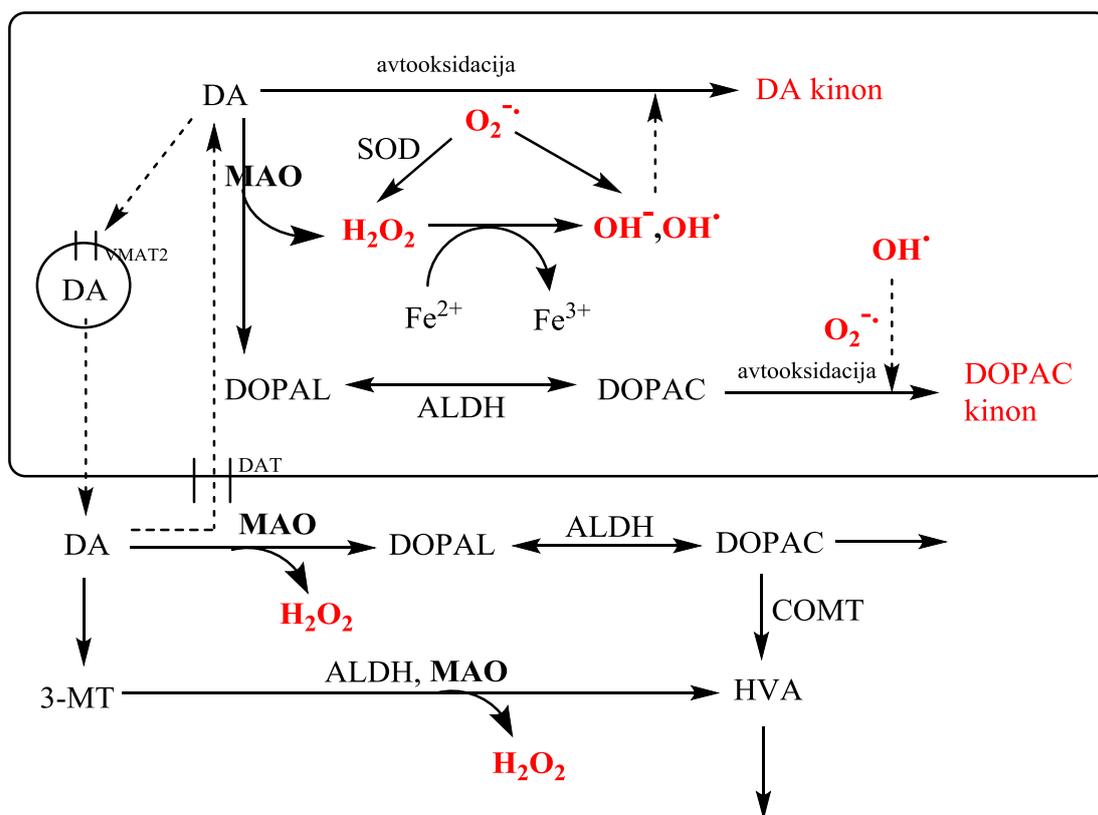
Kot je že omenjeno, je parkinsonizem posledica prekinjenega dopaminskega prenosa v striatumu, zaradi degeneracije dopaminskih nigrostriatnih nevronov, zaradi zmanjšane sproščanja dopamina iz teh nevronov v striatumu ali zaradi blokade dopaminskih receptorjev na postsinaptičnih striatnih nevronih. Pri PB gre za relativno selektivno propadanje nigrostriatnih dopaminskih nevronov, dolgotrajno hudo pomanjkanje dopamina pa v striatumu povzroči porušenje ravnovesja nevrottransmiterskih sistemov. (2) Pri tem igrajo ključno vlogo **mitohondrijska disfunkcija, oksidativni stres in nepravilno delovanje beljakovin.** (3)

Vpletenost mitohondrijev v celično smrt pri PB je ponovno prišlo v ospredje, saj daje odgovor na vprašanje, kako se izguba nevronov pojavi pri sporadični (občasno pojavljajoči) in familiarni (dedni) obliki bolezni. Dokazano je bilo, da je v SNc prisotna inhibicija kompleksa I, ki je specifična za tkivo in bolezen, njena vloga pri patogenezi pa je bila opredeljena ob odkritju nevrotoksičnosti MPTP preko njegovega metabolita MPP+. Izhajajoč iz genetskih raziskav familiarne oblike PB je spremenjena mitohondrijska funkcija povezana predvsem z mutacijami v α -sinukleinu, parkinu, PINK1, DJ-1 in morda LRRK2. Te mutacije lahko privedejo do spremenjene lokalizacije proteinov v mitohondriju, nenormalnosti strukture mitohondrija in njegove funkcije ter zmanjšanja aktivnosti kompleksa I. Izguba funkcije, zlasti DJ-1, pa tudi parkin in PINK1, zmanjšuje mitohondrijsko zaščito pred oksidativnim stresom, kar posledično poveča mitohondrijsko disfunkcijo. (7)

V teku življenja dopaminski nevroni odmirajo hitreje kot drugi nevroni, saj metabolično obračanje DA že v fizioloških razmerah povzroča oksidativni stres. Pri encimski razgradnji DA pospešeno nastajajo reaktivne kisikove zvrsti, zato so dopaminski nevroni še posebej dovzetni za okvaro. (2) Obstajata dve glavni encimski poti, po katerih se DA razgrajuje. V prvi poti, MAO in aldehyd dehidrogenaza (ALDH) pretvorita DA v 3,4-dihidroksifenilacetno kislino (DOPAC). To spojino nato pretvori katehol-O-metiltransferaza (COMT) v homovanilno kislino (HVA). V drugi poti, COMT metabolizira DA v 3-metoksitiramin (3-MT), ki se z MAO in ALDH naprej pretvori v HVA. (3) Vendar encimski metabolizem DA ne tvori le deaminiranih metabolitov HVA in DOPAC, temveč tvori tudi H_2O_2 . Povečan metabolizem DA v zgodnjih fazah PB lahko povzroči prekomerno nastajanje H_2O_2 , ki je normalno inaktiviran z glutationom (GSH) v reakciji, ki jo katalizira glutation peroksidaza. Če pride do pomanjkanja GSH, se presežek H_2O_2 v

Fentonovi reakciji, posredovani z železom, pretvori v visoko reaktivne hidroksilne radikale. Poleg tega avtooksidacija DA vodi v nastanek semikinonov, ki so sami po sebi toksični in prav tako proizvajajo reaktivne kisikove zvrsti. Na podlagi študij obstaja splošna domneva, da je pri PB prisotna povišana raven železa v SNc in da lahko posreduje nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti, če je presežek železa v reaktivni obliki. Na kakšen način proizvaja reaktivne kisikove zvrsti še vedno ni znano, poleg tega pa povečana raven železa ni specifična za PB in se lahko pojavi tudi pri ostalih nevrodegenerativnih boleznih.

(8)

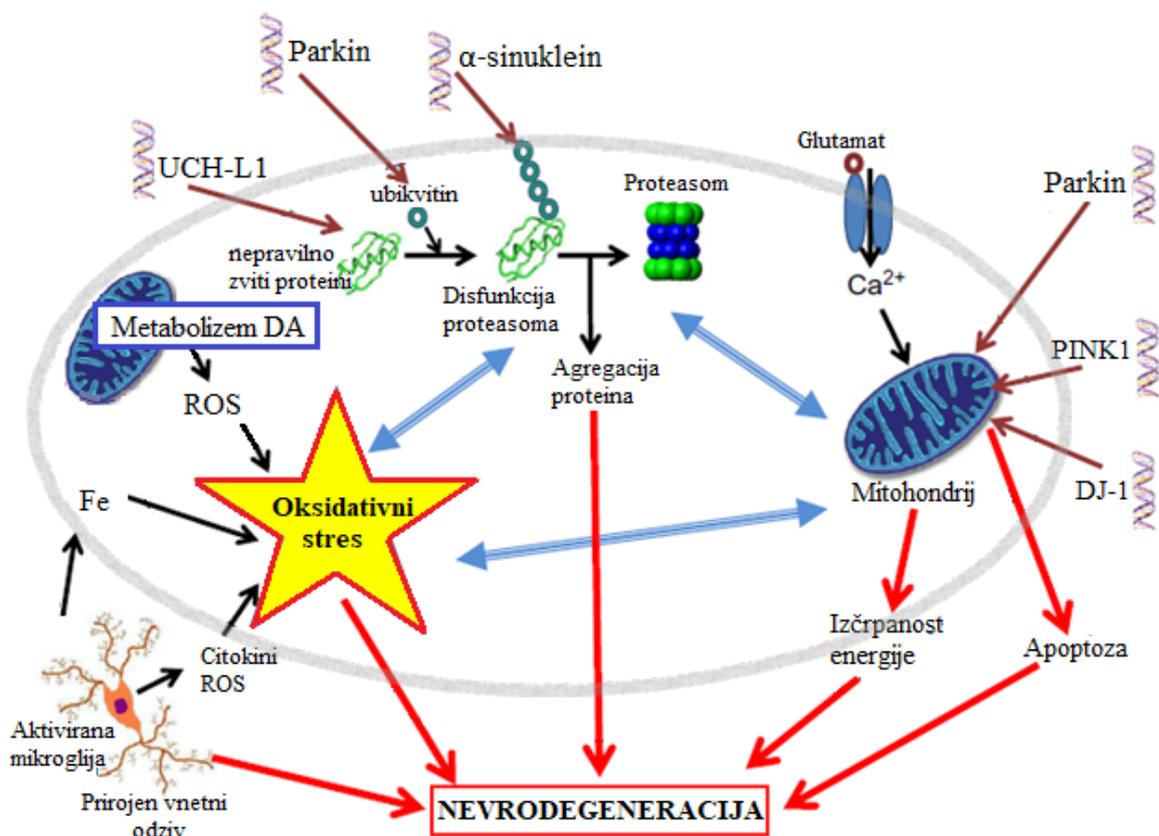


Slika 2: Na sliki so prikazane glavne metabolične poti dopamina in nastanek ROS označenih z rdečo barvo (prirejeno po 9, 10).

Agregacija in nepravilno delovanje proteinov je ključen molekularni pojav, ki je skupen mnogim nevrodegenerativnim boleznim. Nevroni, tako kot druge celice, se na nenormalno agregacijo proteinov lahko odzivajo z oblikovanjem beljakovinskih vključkov, ki so sestavljeni iz netopnih proteinskih vlaken. (11) Pri PB se je kot najbolj obsežen protein izkazal α -sinuklein, ko so odkrili, da mutacije v njegovem genu SNCA, povzročajo monogeno familiarano obliko bolezni. V napačno zvitem stanju α -sinuklein postane netopen

in začne tvoriti agregate, ki se pojavljajo v obliki znotrajceličnih vključkov. Tako nastale tvorbe imenujemo Lewisovi nevriti in Lewisova telesca s premerom od 5 do 25 nm. Lewisova patologija ni omejena le na možgane, temveč jo najdemo tudi v hrbtenjači, prebavnem traktu in v endokrinih organih. Znano je, da α -sinuklein tvori različne tipe agregatov, pikam ali nitkam podobne strukture, fine presinaptične ostanke in topne oligomere, sestavljene iz 2-100 monomerov α -sinukleina. (12,13) Ugotovitve kažejo, da so te vrste α -sinukleina nevrotoksične prek številnih mehanizmov vključno z okvaro mitohondrijske funkcije, motnjo v homeostazi znotrajceličnih proteinov in tvorbo poram podobnih struktur na membrani nevronov. Netopni vključki α -sinukleina namreč predstavljajo vir toksičnih oligomerov, ki pomembno prispevajo k neurodegeneraciji pri PB, tako da vplivajo na strukturo nevrita in presinaptično funkcijo. (11) Spremenjena proteoliza in prisotnost številnih proteinov v Lewisovih telescih, je privedla do ideje, da bi lahko bila pri PB motena tudi razgradnja poškodovanih ali mutiranih proteinov. To je pripeljalo do proučevanja vloge ubikvitin-proteasomskega sistema (UPS) in lizosomov pri patogenezi PB. Vključenost UPS je bila podprta z odkritjem mutacij parkina in UCH-L1, ki funkcionirata kot ubikvitin-protein ligazi in sodelujeta pri reciklaži ubikvitina. Preiskava proteasoma 26S je razkrila spremembe v njegovi katalitični aktivnosti in sestavi v SNc, ki so povezane z oslabljeno razgradnjo α -sinukleina in posledično agregacijo ter nevronske smrtjo. (7)

Še ena značilnost, ki jo pri procesu PB ne smemo zanemariti, so vnetne spremembe, čeprav niso specifičen pokazatelj bolezni. Aktivacija mikroglie in vnetne spremembe so posledica okvare nevronov, vendar obstajajo dokazi za bolj splošno sistemsko vnetno reakcijo, kar kaže na to, da je v nekaterih primerih primarni vzrok izgube nevronov. Študije kažejo, da se dopaminergična nevronska izguba lahko pojavi kot neposredna posledica mikroglialne aktivacije, ki jo spremljajo povečana tvorba citokinov (IL-1a, IL-1b in TNF- α), povečana produkcija reaktivnih kisikovih in dušikovih zvrsti ter zmanjšano izločanje trofičnih dejavnikov odgovornih za normalno vzdrževanje preživetja nevronov. (7)



Slika 3: Ključni molekularni mehanizmi, ki prispevajo k procesu nevrodegeneracije pri PB. Modre dvojne puščice prikazujejo mehanizme, ki so značilni za PB. Strukture z dvojno vijačnico prikazujejo nekatere pogoste mutacije genov, ki jih najdemo pri familiarni PB. Rjave puščice kažejo, kje lahko spremenjeni proteini vplivajo na celično funkcijo in kje se vpletajo v znane mehanizme celične smrti pri sporadični PB. Prikazane so tudi poti, ki vodijo do oksidativnega stresa (prirejeno po 7).

1.1.4 Zdravljenje in preprečevanje bolezni

Bolezenske znake PB je moč ublažiti z zdravili, ki na tak ali drugačen način nadomestijo primanjkljaj dopamina v striatumu. Zdravljenje PB s samim dopaminom ne bi bilo učinkovito, ker ne prehaja krvno-možganske pregrade. Kot najučinkovitejši način za zvišanje koncentracije dopamina v striatumu se je izkazalo zdravljenje z levodopo. L-DOPA je prekursor dopamina, ki prehaja prek krvno-možganske pregrade in se v reakciji, ki jo katalizira encim DOPA dekarboksilaza, spreminja v dopamin. Vendar zdravljenje z L-DOPA s časom postaja vse manj učinkovito, saj se pri 50 do 80 % bolnikov pokažejo neželeni učinki, kot so dodatne motorične motnje (diskinezije), ki se izražajo kot nenadni nekontrolirani gibi. (2) Med ostala zdravila, ki ublažijo simptome PB, spadajo agonisti

dopaminskih receptorjev (apomorfin, bromokriptin), zaviralci katehol-O-metiltransferaze (entakapon, tolkapon) in zaviralci monoamin oksidaze B (selegilin, razagilin). (2,5) Te snovi zmanjšujejo razgradnjo dopamina in tako zvišujejo njegovo koncentracijo v striatumu. Zaradi zmanjšane razgradnje dopamina naj bi se tudi zmanjšal oksidativni stres v preostalih dopaminskih nevronih in posledična okvara z radikali. Zaradi tega so zaviralce MAO-B preizkušali tudi kot snovi s potencialnim protektivnim delovanjem skupaj z nekaterimi drugimi antioksidanti, vendar s tem načinom zdravljenja še vedno niso uspeli zavreti napredovanja bolezni. (2)

1.2 Monoamin oksidaza

1.2.1 Izoforme MAO

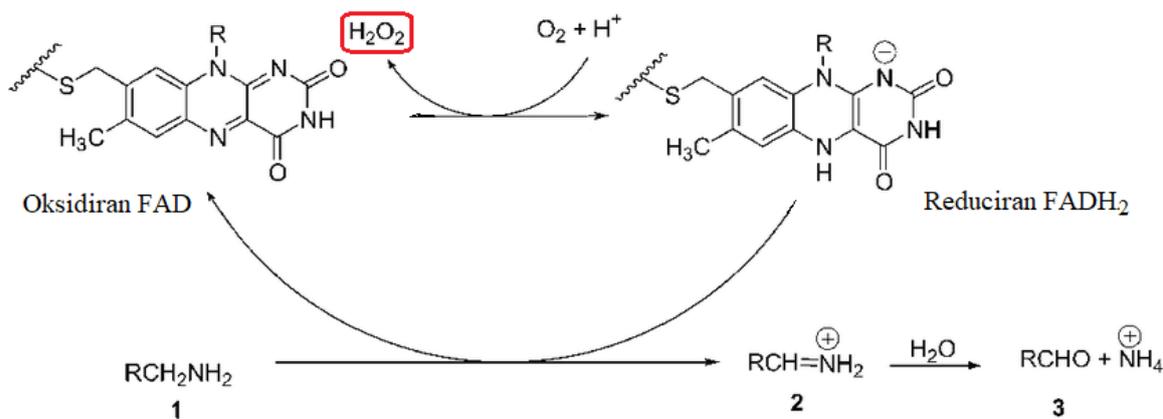
Monoamin oksidaze (MAO) so flavoproteini zunanje membrane mitohondrijev in spadajo v družino encimov, ki katalizirajo reakcijo oksidacije primarnih, sekundarnih in terciarnih aminov ter večina kateholaminskih živčnih prenašalcev. (14) V človeškem telesu obstajata dve izoformi encima: MAO-A in MAO-B. Čeprav izkazujeta 70% homologije v aminokislinskem zaporedju in oba vsebujeta kovalentno vezan kofaktor FAD pritrjen na cisteinski ostanek encima, pa se znatno razlikujeta v strukturi svojih aktivnih mest in vezavi substratov ter po razporeditvi v tkivih. (14,15,16)

Oba encima najdemo znotraj centralnega žičnega sistema (CŽS) v nevronih in astrocitih možganov. Izven CŽS se MAO-A nahaja predvsem v jetrih, pljučnem žilnem endoteliju, prebavnem traktu in placenti, MAO-B pa večinoma v trombocitih in limfocitih. (17) Encima se vežeta na zunanjo mitohondrijsko membrano preko C-terminalnega alfa-heliksa, dodatno pa se tvorijo interakcije med membrano in drugimi hidrofobnimi ostanki. Oba vezavna mesta MAO-A in MAO-B sta večinoma hidrofobna, obdana pretežno z aromatskimi in alifatskimi aminokislinskimi ostanki. Opazna izjema je ohranjen lizin (Lys296 pri MAO-B in Lys305 pri MAO-A), ki interagira z molekulo vode, ki se prav tako veže na atom N5 kofaktorja flavina. Tirozina 398 in 435 pri MAO-B (Tyr407 in Tyr444 pri MAO-A) se nahajata nasprotno od kovalentno vezanega zaviralca/substrata, ki skupaj tvorijo aromatski »sendvič« in imajo sposobnost orientiranja substrata za oksidacijo ali aktivacijo amina s povečanjem njegove nukleofilnosti. (14) Vezavno mesto MAO-A

predstavlja enoprostorna votlina, ki je velika približno 550 \AA^3 , medtem ko MAO-B vsebuje dvoprostorno votlino sestavljeno iz manjše hidrofobne vhodne votline (290 \AA^3), ki se nahaja med glavno substratno votlino in površino proteina. Rotacija izolevcinskega ostanka (Ile199) omogoča, da se ti dve votlini zlijeta v eno večjo, katere velikost znaša 700 \AA^3 . Votlini lahko ostaneta ločeni ali se združita glede na naravo substrata/zaviralca, kar igra ključno vlogo pri substratni specifičnosti. (14,15) MAO-A s svojo veliko hidrofobno votlino omogoča vezavo večjih spojin, zato presnavlja predvsem serotonin (5-HT), noradrenalin in dopamin, medtem ko MAO-B poleg dopamina veže tudi manjše hidrofobne spojine, kot sta benzilamin in feniletilamin. (14)

1.2.2 Vloga MAO pri Parkinsonovi bolezni

Obe izoforni MAO sta ključna encima v metabolizmu živčnih prenašalcev (noradrenalin, serotonin in dopamin), ki uravnavata njihovo koncentracijo v centralnem in perifernem živčnem sistemu. Pri PB ima večjo vlogo izoforma MAO-B, saj je ta odgovorna za razgradnjo dopamina, ki ga pri bolezni primanjkuje. Kot je omenjeno že v prejšnjem poglavju, MAO-B svojim delovanjem pomembno prispeva k patogenezi PB, saj pri metabolizmu dopamina in ostalih živčnih prenašalcev nastajajo reaktivne kisikove zvrsti in posledično oksidativni stres. Katalitični cikel MAO poteka tako, da ustrezen amin (1) vstopi v aktivno mesto encima, kjer se oksidira v imin (2), nato pa zunaj encima reagira z molekulo vode in hidrolizira v aldehyd (3) in amonijak. Reducirani FADH_2 se z molekularnim kisikom regenerira v FAD, iz encima pa izstopi H_2O_2 . (18)



Slika 4: Katalitični cikel MAO (prirejeno po 19).

Oksidativna deaminacija dopamina do H_2O_2 s pomočjo MAO na ta način prispeva k tvorbi reaktivnih kisikovih zvrsti in sproži kaskado reakcij, ki vodijo do degeneracije celic nevronov pri PB. (8)

1.3 Zaviralci monoamin oksidaze

Zaviralci MAO so skupina učinkovin, ki zavirajo delovanje encima MAO in s tem preprečujejo razgradnjo monoaminskih živčnih prenašalcev ter povečajo njihovo razpoložljivost. Trenutno se uporabljajo za zdravljenje depresivnih motenj, Parkinsonove bolezni, anksioznih motenj in Alzheimerjeve bolezni. (20) Zaviralci MAO-B se klinično uporabljajo predvsem za simptomatsko zdravljenje PB zaradi povišanja koncentracije dopamina v možganih preko zaviranja njegove razgradnje. Zaviralci MAO-B se uporabljajo kot potencialne nevroprotektivne učinkovine, z upanjem, da zaviranje MAO-B lahko prepreči nastanek škodljivih oksidacijskih produktov, pridobljenih iz dopamina, ali morebitno pretvorbo endogene/naravne MPTP podobne spojine v nevtrotoksično snov. Na drugi strani pa se inhibitorji MAO-A klinično uporabljajo za zdravljenje motenj razpoloženja, zaviranje MAO-A pa naj bi prav tako imelo nevroprotektivni učinek. (21) MAO inhibitorje lahko razdelimo glede na njihovo sposobnost selektivnega ali neselektivnega zaviranja. (16)

1.3.1 Neselektivni (ireverzibilni) zaviralci MAO

Trenutno sta na trgu prisotna fenelzin in tranilcipromin, ki sta ireverzibilna neselektivna zaviralca MAO. Klinično se uporabljata kot antidepresiva in anksiolitika pri zdravljenju motenj razpoloženja, depresije in anksioznosti. (16)

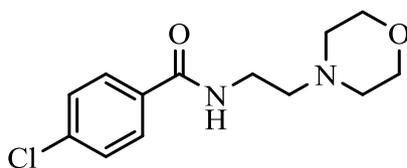
A pri njuni uporabi predstavljajo veliko težavo pogosti neželeni učinki, ki vključujejo težave s spanjem, dnevno nespečnost, vznemirjenost, omotico, suha usta, tremor, sinkopo, palpitanje, tahikardijo in glavobol. Najpomembnejše interakcije, ki omejujejo učinkovitost neselektivnih MAO inhibitorjev, so interakcije med učinkovino in hrano z visoko vsebnostjo tiramina, kamor uvrščamo predvsem vloženo, prekajeno in fermentirano hrano (pivo, vino in siri). (16,22) Tiramin, ki je substrat za obe izoformi MAO, se iz hrane sprošča v lumen črevesa, kjer ga v normalnih pogojih večji del metabolizira MAO-A v

črevesni steni, nato pa še preostanek v jetrih, kjer sta prisotni obe izoformi. Tiramini se presnovi in njegov prehod v sistemsko cirkulacijo je onemogočen. (23) V prisotnosti zaviralca MAO pa je ta zaščitni sistem deaktiviran, zato tiramin ali drugi monoamini prisotni v hrani niso podvrženi metabolizmu in vstopijo v krvni obtok. Na ta način imajo dostop do perifernih adrenergičnih nevronov in povzročajo prekomerno sproščanje noradrenalina. Posledica tega je hipertenzivna kriza ali tako imenovani »efekt sira«, ki je resen neželeni učinek in je v nekaterih primerih lahko usoden. (22)

1.3.2 Selektivni (reverzibilni in ireverzibilni) zaviralci MAO

Da bi se izognili neželenim učinkom neselektivnih zaviralcev, so začeli načrtovati selektivne in ireverzibilne zaviralce MAO-A, katerih predstavnik je klogilin. Predklinične raziskave pa so zopet pokazale, da selektivno ireverzibilno zaviranje MAO-A s klogilinom še vedno povzroča hipertenzivno krizo. Čeprav je tiramin substrat za oba podtipa MAO, zaradi njune različne porazdelitve v tkivih selektivno zaviranje MAO-A v primerjavi z MAO-B bolj ojača delovanje tiramina, saj se na ravni nevronov izoforma A selektivno izraža v simpatičnih nevronih in se v večji meri nahaja v prebavilih, kjer se odvija presnova tiramina. (23)

Uvedba selektivnih reverzibilnih zaviralcev MAO-A (RIMA) je znatno izboljšala varnostni profil zaviralcev MAO. Delujejo namreč po mehanizmu kompetitivnega zaviranja encima, zato tiramin iz hrane v prebavilih tekmuje z zaviralcem za vezavo na encim in ga pri višjih koncentracijah izpodrine ter se presnovi. Poleg tega se tovrstni zaviralci ne vežejo na receptorje živčnih prenašalcev, ne vplivajo na biosintezo, nevronske privzem in sproščanje živčnih prenašalcev. Trenutno je na trgu dostopen moklobemid, ki je registriran za zdravljenje depresivnih motenj. (20,24)

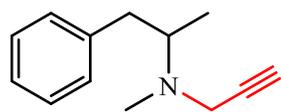


Slika 5: Moklobemid.

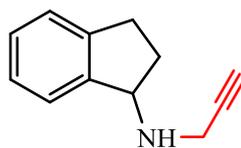
Medtem ko selektivno zaviranje MAO-A vodi do povečane ravni živčnih prenašalcev znotraj noradrenergičnih in serotoninergičnih nevronov v CZS in s tem izkazuje antidepresivni učinek, pa ima selektivno zaviranje MAO-B za posledico povečano raven dopamina v dopaminergičnih nevronih v SNc in s tem nudi antiparkinsonski učinek. (25)

Za zdravljenje PB sta danes na trgu prisotna selegilin in razagilin, ki sta glavna predstavnika selektivnih ireverzibilnih zaviralcev MAO-B. Ireverzibilni zaviralci delujejo tako, da se kovalentno vežejo na N5 atom flavina. Ko encim prepozna zaviralec, se le ta presnovi, kar tvori reaktiven intermediat, ki se kovalentno veže na atom N5 kofaktorja FAD. Nastane adukt inhibitor-receptor, ki je nato podvržen nepovratni vezavi in »staranju«. Na podlagi tega se je vpeljal izraz »samomorilski zaviralec«, ki opisuje takšen način delovanja. Ker ti zaviralci nepovratno inaktivirajo encim, se njihovo delovanje lahko odpravi samo z generiranjem novih encimov. To je proces, ki lahko traja dneve ali tedne, zato se v klinični praksi uporablja dnevni odmerek, ki povzroči le delno zaviranje encima. Trajna uporaba zdravila ohranja encimsko aktivnost konstantno na nizki ravni. Klinični pomen tega tipa učinkovine je, da je encim vseskozi zaviran in ohranja nizko aktivnost skozi daljši čas. (25)

Poleg zaviralnega delovanja na MAO-B in posledično ohranjanja normalne koncentracije dopamina pa k lažšanju simptomov PB pripomoreta še s številnimi drugimi mehanizmi. Tako selegilin kot razagilin delujeta antioksidativno zaradi zmanjšanega nastanka ROS z zaviranjem MAO-B, povečanjem delovanja SOD in glutation peroksidaze. Kasneje so v nekaterih študijah ugotovili, da je za nevroprotektivno delovanje, ki ni povezano z zaviranjem MAO-B, ključna propargilaminska skupina. Ta je odgovorna za pospeševanje in aktivacijo antiapoptotičnih in nevrotrofičnih dejavnikov ter zaviranje proapoptotičnih dejavnikov. Spojini se s svojim propargilaminskim delom vežeta tudi na gliceralhid-3-fosfat-dehidrogenazo, ki je glavni mediator pri apoptozi in s tem preprečita njeno translokacijo v jedro, kjer nato sproži apoptozo. Poleg tega skupina stabilizira membranski potencial mitohondrija, preprečuje odpiranje prepustnostih por mitohondrijske membrane in zmanjša fragmentacijo jedrne DNA. (26,27)



Selegilin



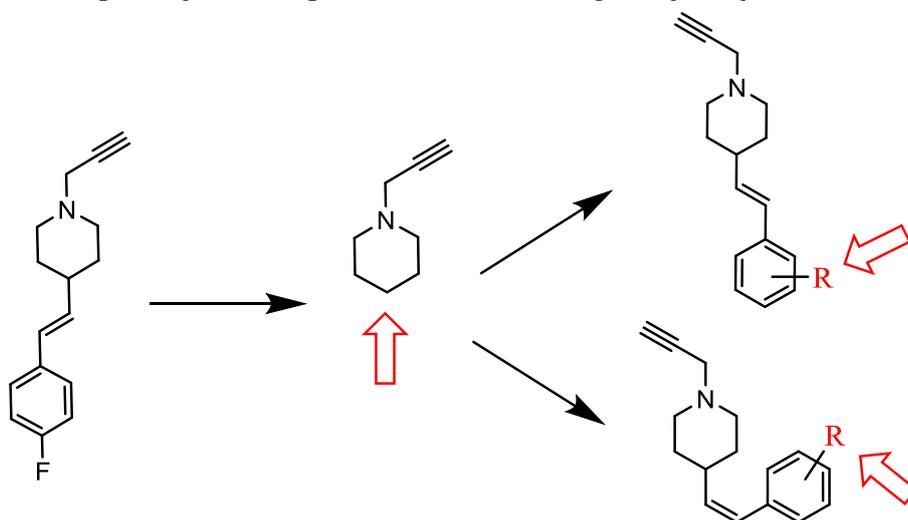
Razagilin

Slika 6: Selektivna ireverzibilna zaviralca MAO-B.

2 NAMEN DELA

Monoamin oksidaza (MAO) je encim, ki sodeluje pri regulaciji in metabolizmu živčnih prenašalcev in je vpleten pri različnih nevrodegenerativnih boleznih. Izmed dveh izoform encima se bomo v okviru magistrske naloge osredotočili predvsem na MAO-B, ki igra pomembno vlogo v patogenezi Parkinsonove bolezni. Ker sta za zdravljenje te bolezni danes na tržišču prisotna le dva učinkovita selektivna zaviralca MAO-B (selegilin in razagilin), je namen našega raziskovalnega dela sinteza novih selektivnih ireverzibilnih zaviralcev MAO-B kot potencialnih zdravilnih učinkovin.

Na osnovi znanega zaviralca MAO-B 4-(4-fluorostiril)-1-propargilpiperidina bomo sintetizirali bioizostere, predhodno načrtovane s pomočjo programa BoBER na Kemijskem inštitutu. (37) Pri sintezi naših spojin bomo izhajali iz osnovnega piperidinskega skeleta z ohranjeno *N*-propargilaminsko skupino, ki je na podlagi raziskav ključna za zaviralno delovanje na encimu MAO in nevroprotektivno delovanje. Na drugem koncu distančnika bomo na različna mesta na aromatskem obroču uvajali različne substituentne, predlagane s strani programa BoBER in proučevali njihov vpliv na zaviralno delovanje. (37) Sintetizirali bomo 1,4-disubstituirane piperidinske analoge s prisotno nenasičeno dvojno vezjo, kjer bomo primerjali tudi vpliv *cis* ali *trans* konfiguracije na jakost delovanja.



Slika 7: Shema načrtovanja 1-(prop-2-in-1-il)piperidinskih analogov (s puščicami so označena mesta modifikacij).

Vsem uspešno sintetiziranim končnim spojinam bomo s pomočjo biokemijskega testiranja določili rezidualno aktivnost in vrednost IC₅₀ ter na ta način ovrednotili njihovo zaviralno delovanje na MAO-A in MAO-B.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Tekom eksperimentalnega dela smo uporabljali topila, sušilna sredstva, kisline, baze in reagente proizvajalcev Sigma-Aldrich, Merck, Acros Organics, Carlo Erba.

Topila: etilacetat, diklorometan, heksan, petroleter, dietileter, metanol, acetonitril, dioksan, brezvodni THF.

Uporabljene kisline, baze in soli: NaHCO₃, HCl, NaCl, NaOH.

Sušilno sredstvo: Na₂SO₄

Reagenti: Boc₂O, piperidin-4-karboksilna kislina, trietilamin, TBTU, HOBt, N,O-dimetilhidroksilamin hidroklorid, trifenilfosfin, 2-nitrobenzil bromid, metil 4-(bromometil)benzoat, 1-(bromometil)naftalen, metil 3-(bromometil)benzoat, piperonil alkohol, CBr-tertabromometan, metil 2-(bromometil)benzoat, natrijev bis(trimetilsilil)amid-NaHMDS, kalijev bis(trimetilsilil)amid-KHMDS, propargil bromid, CaCO₃.

Aparature in laboratorijska oprema: analitska tehtnica Mettler Toledo, rotavapor Büchi, UV-svetilka CAMAG UV-Cabinet II, magnetno mešalo z grelnikom IKA-Werke, sušilnik za lase BINDER Series FD, žarilna pištola Skil 8000.

3.2 METODE

3.2.1 Kromatografske metode

S **tankoplastno kromatografijo (TLC)** smo tekom eksperimentalnega dela preverjali čistost spojin in spremljali potek posameznih reakcijskih stopenj. Uporabili smo TLC plošče Silica gel 60 F₂₅₄ proizvajalca Merck. Plošče sestavlja aluminijast nosilec v izmeri 20 x 20 cm, ki vsebuje silikagel z debelino nanosa 0,20 mm in fluorescentni indikator. Uporabili smo mobilne faze različne sestave in so navedene v poglavju Eksperimentalno delo, za posamezno spojino. Za detekcijo spojin smo uporabili UV svetilko z valovno dolžino $\lambda = 254$ nm in orositveni reagent ninhidrin za dokazovanje prisotnosti aminov.

Kolonsko kromatografijo smo uporabili za ločitev cis/trans izomerov vmesnih spojin ter za čiščenje vmesnih in končnih spojin, pri čemer smo uporabili steklene kolone različnega premera in dolžine. Uporabili smo pesek proizvajalca Sigma-Aldrich. Stacionarno fazo je sestavljal Silikagel 60 proizvajalca Merck z velikostjo delcev 0,040 – 0,063 mm. Uporabljene mobilne faze smo pripravili iz topil v različnih razmerjih in so navedene v poglavju Eksperimentalno delo, za posamezno spojino.

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je metoda, s katero smo določili relativno čistost končnih spojin. Pri tem smo uporabili Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 System (proizvajalec: Thermo Fisher Scientific Inc.) in kolono Agilent Eclipse Plus C18 (5 μ m; 4,6 \times 150 mm) pri temperaturi 25 °C. Volumen injiciranja je znašal 5 μ l, hitrost pretoka pa 1 ml/min. Spojine smo detektirali pri valovni dolžini 220 nm. Mobilna faza A je bila sestavljena iz 0,1 % trifluorocetne kisline v vodi, mobilna faza B pa iz acetonitrila. Uporabili smo gradientno elucijo (delež mobilne faze B): 0–15 min, 10 %–90 %; 15–20 min, 90 %.

3.2.2 Spektroskopske metode

Jedrsko magnetno resonanco (NMR) smo uporabili za preverjanje čistosti (pri ločevanju cis/trans izomerov) in identifikacijo spojin. ^1H NMR spektre smo posneli tako končnim kot tudi vmesnim spojinam, ^{13}C pa smo posneli samo končnim spojinam. Uporabili smo spektrofotometer Bruker Avance III na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. ^1H NMR spektri so bili posneti pri 400 MHz, ^{13}C pa pri 100 MHz. Interni standard je predstavljal TMS. Potrebna je bila predpriprava vzorcev, in sicer spojine smo raztopili v devteriranem kloroformu (CDCl_3) in DMSO. Spektre smo rešili in obdelali s pomočjo računalniškega programa MestRe-C 4.8.6.0 proizvajalca Mestrelab Research S.L. Oblike vrhov smo opisali s standardnimi oznakami, kjer s predstavlja singlet, d dublet, dd dublet dubleta, t triplet in m multiplet. Sklopitvene konstante (J) so podane v Hz, kemijski premiki (δ) pa v ppm.

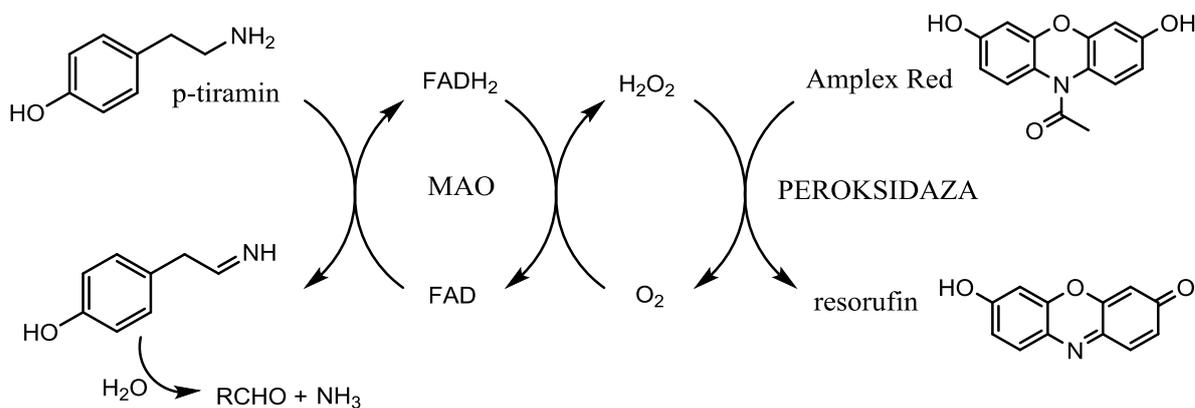
Masno spektrometrijo (MS) smo prav tako uporabili za identifikacijo naših spojin. Masni spektri končnih spojin so bili posneti v ESI-HRMS tehniki na masnem spektrometru VG-Analytical Autospec Q proizvajalca Micromass na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

Vmesnim spojinam smo posneli masne spektre v ESI tehniki na masnem spektrometru ADVION expression CMSL na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

3.2.3 Biološko testiranje (RA, IC₅₀)

Vrednosti IC₅₀ in rezidualne aktivnosti (RA) končnih spojin na encimih MAO-A in MAO-B je določil asist. dr. Damijan Knez, mag. farm., na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

S pomočjo testiranja smo ugotovili, v kolikšni meri naše spojine zavirajo delovanje encima MAO-A in MAO-B. Za testiranje smo uporabili izolirane rekombinantne membranske encime MAO dobljene iz celic insektov. Le-te so okužene z rekombinantnim bakulovirusom, ki nosi cDNA vključke za ekspresijo humane MAO-A in MAO-B. Poleg encimov smo za izvedbo testa uporabili še hrenovo peroksidazo, barvilo Amplex Red in *p*-tiramin kot substrat za MAO. Test temelji na biokemični reakciji, pri kateri se sprošča H₂O₂. *p*-Tiramin je substrat za encim MAO in če ga naša spojina zavira, ne pride do deaminacije *p*-tiramina. V nasprotnem primeru pa pride do razgradnje *p*-tiramina, pri reakciji pa nastaja tudi H₂O₂. Ko dodamo hrenovo peroksidazo, skupaj z nastalim H₂O₂ pretvorita Amplex Red do resorufina. Koncentracijo nastalega resorufina smo določili fluorimetrično.



Slika 8: Shematski prikaz reakcij biokemijskega testiranja (prirejeno po 18,28).

V 100 µl 50 mM fosfatnega pufru (pH = 7,4) smo dodali našo končno spojino ali referenčni zaviralec. Nato smo vanj suspendirali takšno količino MAO-A in MAO-B, ki pretvori približno 15 pmol *p*-tiramina na minuto. Tako pripravljene suspenzije encima s spojinami smo v mikrotitrskih ploščicah pustili inkubirati 15 minut pri 37 °C. Po inkubaciji

smo sprožili reakcijo z dodatkom 250 μM barvila Amplex red, 2 E/ml peroksidaze in 1 mM *p*-tiramina. Po 15 minutah smo pri 37 °C določili količino nastalega resorufina s fluorimetrično metodo ($\lambda_{\text{emisija}} = 590 \text{ nm}$). Kontrolni vzorec je predstavljal čisti DMSO brez vključenih spojin.

RA vrednosti izražene v % smo določili iz dobljenih meritev pri 100 μM s pomočjo naslednje enačbe: $RA = (v_i - b) / (v_0 - b) \times 100 \%$; pri kateri v_i predstavlja hitrost naraščanja fluorescence, ko je zaviralec prisoten; v_0 hitrost naraščanja fluorescence, ko zaviralec ni prisoten in b slepo vrednost, torej hitrost naraščanja fluorescence ob odsotnosti encima. Spojinam z RA vrednostjo manjšo od 50 % smo nadalje z računalniško obdelavo in s pomočjo Hillove enačbe izračunali IC_{50} vrednosti. (26,28)

3.2.4 Poimenovanje in risanje spojin

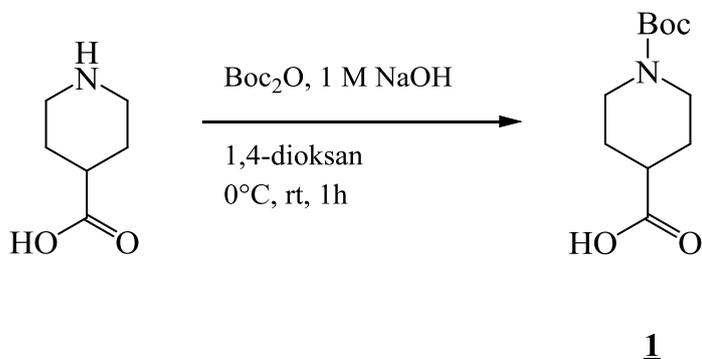
Spojine smo risali in poimenovali s pomočjo računalniškega programa ChemDraw Professional 16.0 proizvajalca PerkinElmer, Inc. Program nam je bil v pomoč tudi pri reševanju ^1H in ^{13}C NMR spektrov.

3.2.5 Določanje tališča

Za določitev temperature tališča spojin smo uporabili Kofflerjev mikroskop z ogrevalno mizico Leica na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

4 EKSPERIMENTALNO DELO

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



Slika 9: Reakcijska shema sinteze spojine 1.

Postopek:

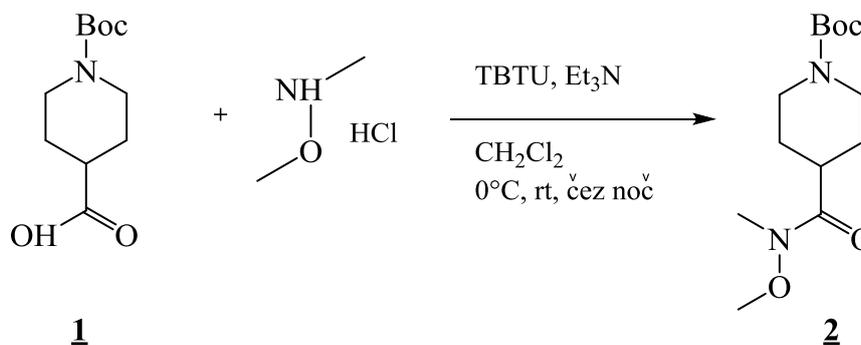
Natehtali smo 7,5 g piperidin-4-karboksilne kisline (58,0 mmol; 1,0 ekv.), jo raztopili v mešanici 1,4-dioksana (40 ml) in 1 M NaOH (58,0 ml; 58,0 mmol; 1 ekv.) in ohladili na 0 °C s pomočjo ledene kopeli. Med mešanjem smo v reakcijsko zmes po kapljicah dodali Boc₂O (15,2 g), ki smo ga raztopili v 50 ml 1,4-dioksana, v časovnem razmaku 30 minut. Nastalo suspenzijo smo pustili mešati 1 uro pri sobni temperaturi. Organsko topilo smo odstranili z rotavapiranjem, preostanek vodne faze pa smo prenesli v lij ločnik in ekstrahirali z Et₂O (2 x 100 ml). Spodnjo vodno fazo smo ohranili in jo nakisali z 1 M HCl do pH 2-3. Nastalo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem in sprali s hladno vodo. Produkt smo sušili čez noč pri sobni temperaturi.

Tabela 1: Analizni podatki za spojino 1.

Videz	Bela kristalna snov
Tališča [°C]	158-160
Izkoristek	86,0 %
TLC	R _f = 0,44 mobilna faza= EtOAc/n-heksan= 2/1
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1.46 (s, 9H, (CH ₃) ₃); 1,62–1,69 (m, 2H, piperidin-H); 1,88–1,94 (m, 2H, piperidin-H); 2,48 (tt, 1H, J ₁ = 10,9 Hz, J ₂ = 3,9 Hz, piperidin-H); 2,82–2,89

(m, 2H, piperidin-H); 4,03 (td, 2H, $J_1 = 13,6$ Hz, $J_2 = 3,7$ Hz, piperidin-H); 9,13 (rs, 1H, COOH)

4.2 Sinteza *tert*-butil 4-(metoksi(metil)karbamoil)piperidin-1-karboksilata (2)



Slika 10: Reakcijska shema sinteze spojine 2.

Postopek:

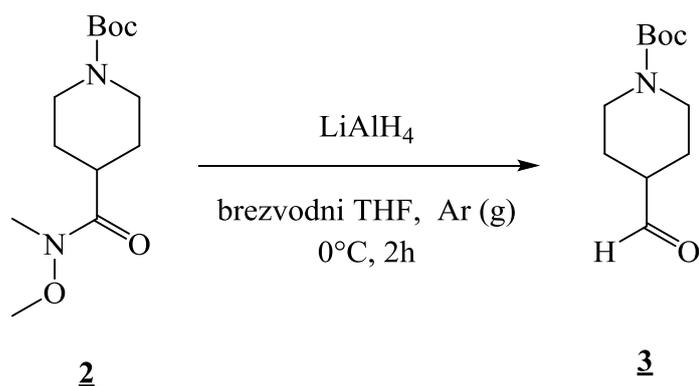
1-(*tert*-butoksikarbonil)piperidin-4-karboksilno kislino (10,0 g; 43,61 mmol; 1,0 ekv.) smo suspendirali v 150 ml CH_2Cl_2 in ohladili na 0°C . Nato smo v suspenzijo dodali sledeče reagente: TBTU (14,70 g; 45,78 mmol; 1,05 ekv.), Et_3N (15,11 ml; 109,03 mmol; 2,5 ekv.) in HOBt (2,95 g; 21,80 mmol; 0,5 ekv.). Po 30 minutnem mešanju pri 0°C smo v reakcijsko zmes dodali še *N,O*-dimetilhidroksilaminijev klorid (5,10 g; 52,32 mmol; 1,2 ekv.) in jo pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo nastalo raztopino prenesli v lij ločnik in jo sprali z nasičeno vodno raztopino NaHCO_3 (2 x 100 ml), 1 M HCl (100 ml) in nato z nasičeno raztopino NaCl (100 ml). Na koncu smo organski fazi dodali sušilno sredstvo Na_2SO_4 , ga odfiltrirali ter z rotavapiranjem odstranili topilo.

Tabela 2: Analizni podatki za spojino 2.

Videz	Bela amorfna snov
Tališča [$^\circ\text{C}$]	68-72
Izkoristek	76,0 %

TLC	R _f = 0,48 mobilna faza= EtOAc/ <i>n</i> -heksan= 1/2
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,46 (s, 9H, (CH ₃) ₃); 1,62-1,78 (m, 4H, piperidin-H); 2,77-2,80 (m, 3H, piperidin-H), 3,18 (s, 3H, N-CH ₃); 3,71 (s, 3H, O-CH ₃); 4,15 (td, 2H, <i>J</i> ₁ = 2,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 13,4 Hz, piperidin-H)

4.3 Sinteza *tert*-butil 4-formilpiperidin-1-karboksilata (3)



Slika 11: Reakcijska shema sinteze spojine 3

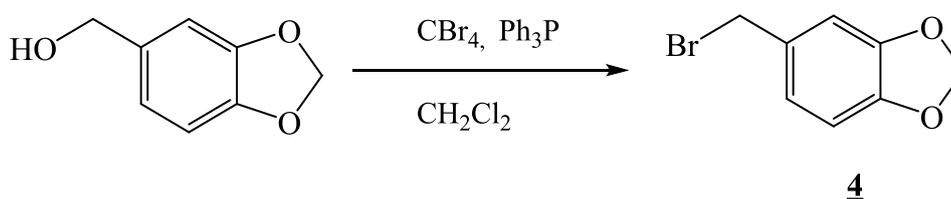
Postopek:

Tert-butil 4-(metoksi(metil)karbamoil)piperidin-1-karboksilat (18,08 g; 66,39 mmol; 1,0 ekv.) smo raztopili v 120 ml brezvodnega THF in to ohladili na 0 °C. Raztopino smo pustili mešati pod argonovo atmosfero približno 10 minut. Nato smo v časovnem intervalu 10 minut v manjših količinah dodajali LiAlH₄. Postopoma smo ga dodali, da smo se izognili burni reakciji, saj LiAlH₄ burno reagira, če pride v stik že z zelo majhno količino vode, ki se je lahko v sledovih nabrala v brezvodnem THF. Mešanico smo pustili mešati 2 uri pri 0 °C. Zmes smo sprali s 60 ml nasičene vodne raztopine NaHCO₃, pri čemer se je tvorila suspenzija, ki smo jo prenesli v lij ločnik in ekstrahirali z EtOAc (2 x 200 ml). Organske faze smo združili, jih sprali z nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (100 ml), 1 M HCl (100 ml) in nasičeno raztopino NaCl (100 ml) ter sušili z Na₂SO₄. Sušilno sredstvo smo odfiltrirali, topilo organske faze pa smo odstranili z rotavapiranjem ter nastali aldehid takoj uporabili v naslednji reakciji.

Tabela 3: Analizni podatki za spojino 3

Videz	Transparentno rumena oljnata snov
Izkoristek	83,6 %
TLC	R _f = 0,58 mobilna faza= EtOAc/ <i>n</i> -heksan= 1/1

4.4 Sinteza 5-(bromometil)-1,3-benzodioksola oz. piperonil bromida (4)



Slika 12: Reakcijska shema sinteze spojine 4

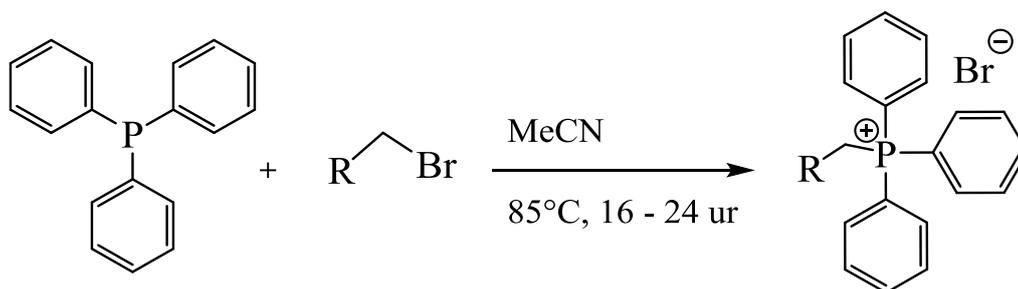
Postopek:

Najprej smo morali pripraviti želeni alkil halid, ki smo ga nadalje uporabili za pripravo Wittigovega reagenta. Piperonil alkohol (1,70 g; 11,15 mmol;) smo raztopili v 10 ml CH₂Cl₂ in dodali tetrabromometan (3,70 g; 11,15 mmol) ter trifenilfosfin (2,92 g; 11,15 mmol). Reakcijsko zmes smo pustili mešati 24 ur pri 0 °C. Topilo smo odstranili z rotavapiranjem, produkt pa smo očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: eter/petroleter = 1/8) in ga takoj uporabili v naslednji reakciji.

Tabela 4: Analizni podatki za spojino 4

Videz	Umazano bela kristalna snov
Izkoristek	95 %
TLC in kolonska kromatografija	R _f = 0,36 mobilna faza= eter/petroleter= 1/8

4.5 PRIPRAVA WITTIGOVIIH REAGENTOV



Slika 13: Reakcijska shema priprave Wittigovih reagentov

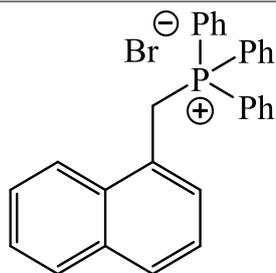
Splošni postopek A:

Raztopini ustreznega benzil ali fenetil halida (10,0 mmol; 1,0 ekv.) v 15 ml MeCN smo pri sobni temperaturi dodali PPh₃ (10,0 mmol; 1,0 ekv.). Reakcijsko zmes smo čez noč pustili mešati pri 85 °C. Naslednji dan smo zmesi dodali 10 ml CH₂Cl₂ in 50 ml Et₂O, pri čemer je nastala oborina, ki smo jo odfiltrirali z odsesavanjem ter sprali z Et₂O. Nastali produkt smo sušili čez noč pri sobni temperaturi.

Tabela 5: Sinteza Wittigovih reagentov po splošnem postopku A

Spojina	Struktura in količina reagentov	Izkoristek
(2-nitrobenzil)tri-fenilfosfonijev bromid (5)	<p>2-nitrobenzil bromid = 2,16 g PPh₃ = 2,62 g</p>	98 %
(4-(metoksikarbonyl)benzil)tri-fenilfosfonijev bromid (6)	<p>metil 4-(bromometil) benzoat = 2,29 g PPh₃ = 2,62 g</p>	96 %

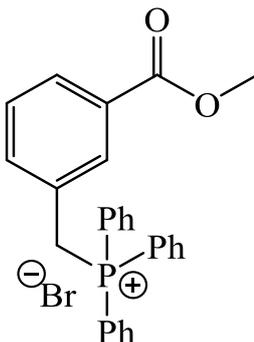
(naftalen-1-
ilmetil)trifenil-
fosfonijev bromid
(7)



98 %

1-(bromometil) naftalen = 1,28 g
PPh₃ = 2,62 g

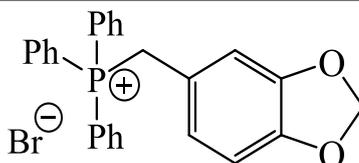
(3-(metoksikarbo-
nil)benzil)tri-
fenilfosfonijev
bromid
(8)



97 %

3-(bromometil) benzoat = 0,91 g
PPh₃ = 1,04 g

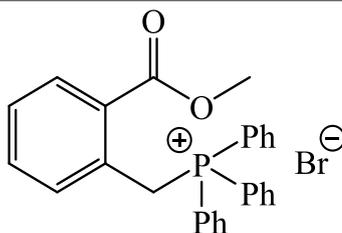
(benzo-1,3-
dioksol-5-
ilmetil)trifenil-
fosfonijev bromid
(9)



96 %

piperonil bromid = 3,08 g
PPh₃ = 2,92 g

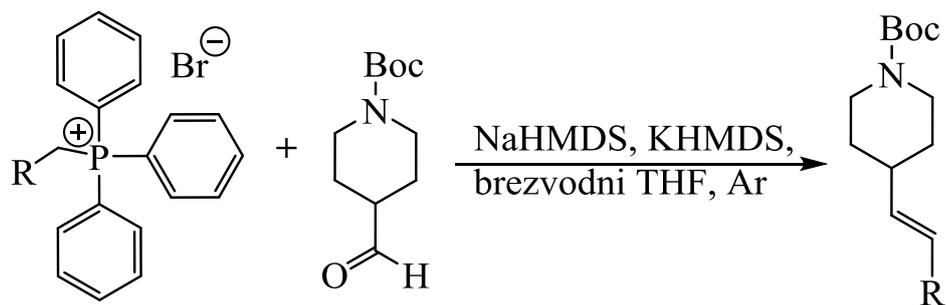
(2-(metoksikarbo-
nil)benzil)tri-
fenilfosfonijev
bromid
(10)



65 %

metil 2-(bromometil) benzoat = 2,29 g
PPh₃ = 2,62 g

4.6 WITTIGOVA REAKCIJA

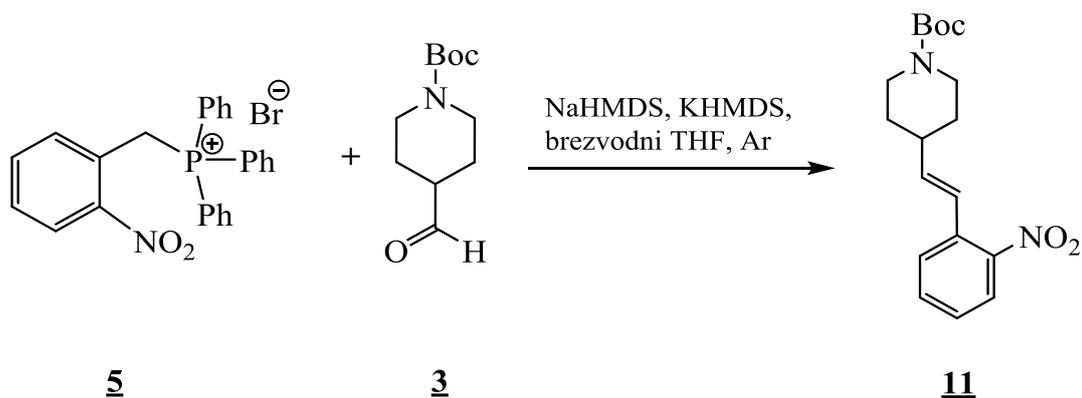


Slika 14: Reakcijska shema Wittigove reakcije

Splošni postopek B:

Ustrezen Wittigov reagent (6,6 mmol; 1:1 ekv), sintetiziran v skladu s splošnim postopkom A, smo raztopili v brezvodnem THF (30 ml) pod argonovo atmosfero. V zmes smo dodali močni bazi: 0,78 g natrijevega bis(trimetilsilil)amida – NaHMDS in 1,44 g kalijevega bis(trimetilsilil)amida – KHMDS (1,2 ekv; 2 N raztopina v THF). Obarvano reakcijsko zmes smo pustili mešati 30 minut pri sobni temperaturi pod argonovo atmosfero. Nato smo v zmes po kapljicah dodali *tert*-butil 4-formilpiperidin-1-karboksilat (1,28 g; 6,0 mmol; 1.0 ekv.) raztopljen v THF (10 ml). Reakcijsko zmes smo pustili mešati pri sobni temperaturi 16-24 ur. Ko je reakcija potekla, smo v zmes dodali nasičeno vodno raztopino NaHCO_3 (10-15 ml). Topilo smo odparili z rotavaporjem, bel preostanek suspendirali v EtOAc (50 ml) in NaHCO_3 (50 ml) ter to prenesli v lij ločnik in ločili fazi. Nato smo vodno fazo ponovno ekstrahirali z EtOAc (2 x 50 ml). Vse organske faze smo združili, jih sprali z nasičeno vodno raztopino NaCl (100 ml), sušili z Na_2SO_4 , ga odfiltrirali, topilo pa odstranili z rotavaporjem. Surov produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo.

4.6.1 Sinteza *tert*-butil (*E*)-4-(2-nitrostiril)piperidin-1-karboksilata (**11**)



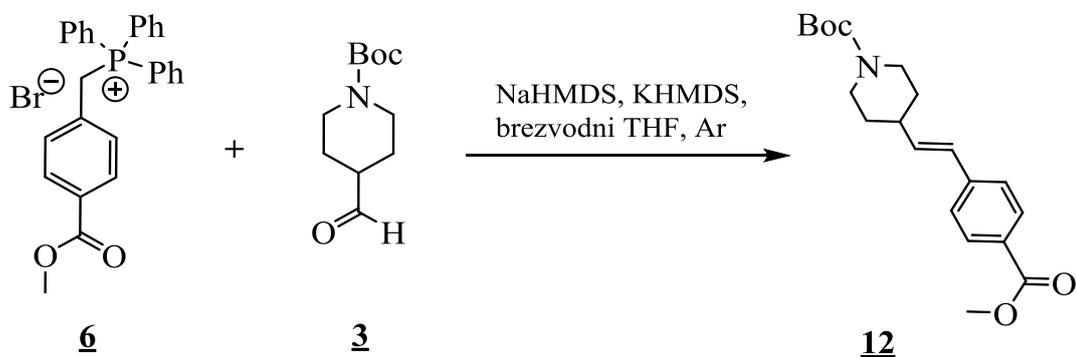
Slika 15: Reakcijska shema sinteze spojine **11**

Spojino **11** smo sintetizirali po splošnem postopku B, tako da smo 2,62 g spojine **5** raztopili v 30 ml brezvodnega THF, dodali NaHMDS in KHMDS (1,2 ekv; 2 N raztopina v THF) ter kasneje še 1,28 g spojine **3**. Nastalo spojino smo očistili s kolonsko kromatografijo, pri čemer smo uporabili mobilno fazo eter/petrol eter = 1/5.

Tabela 6: Analizni podatki za spojino **11**

Videz	Rjavorumena oljnata snov
Tališča [°C]	/
Izkoristek	71 %
TLC	R _f = 0,18 mobilna faza = eter/petrol eter = 1/5
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,35-1,45 (m, 2H, 2x piperidin-H); 1,47 (s, 9H, (CH ₃) ₃); 1,75-1,82 (m, 2H, 2x piperidin-H); 2,32 – 2,41 (m, 1H, piperidin-H); 2,79 (t, 2H, <i>J</i> = 12,1 Hz, 2x piperidin-H); 4,04-4,22 (m, 2H, 2x piperidin-H); 6,13 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 15,8 Hz, <i>J</i> ₂ = 6,5 Hz, CH=CH); 6,87 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 15,8 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,1 Hz, CH=CH); 7,34-7,38 (m, 1H, Aromat-H); 7,51-7,59 (m, 2H, 2x Aromat-H); 7,89 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,2 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,0 Hz, Aromat-H)
MS (ESI+)	Spojina ni dala masnega pika v ESI tehniki

4.6.2 Sinteza *tert*-butil (*E*)-4-(4-(metoksikarbonil)stiril)piperidin-1-karboksilata (12)



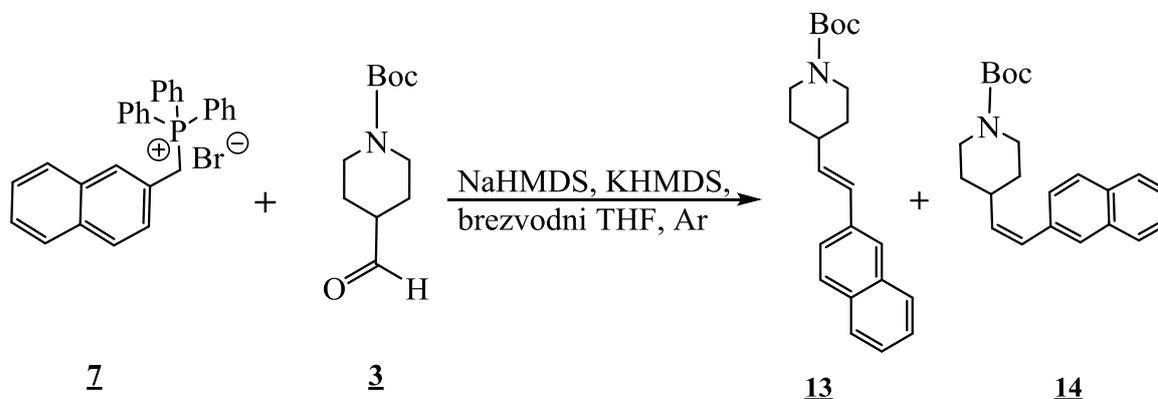
Slika 16: Reakcijska shema sinteze spojine 12

Spojino 12 smo sintetizirali po splošnem postopku B, tako da smo 2,72 g spojine 6 raztopili v 30 ml brezvodnega THF, dodali 0,78 g NaHMDS in 1,44 g KHMDS (1,2 ekv; 2 N raztopina v THF) ter kasneje še 1,28 g spojine 3. Nastalo spojino smo očistili s kolonsko kromatografijo, pri čemer smo uporabili mobilno fazo eter/petrol eter = 1/5.

Tabela 7: Analizni podatki za spojino 12

Videz	Bela kristalna snov
Tališča [°C]	98-102
Izkoristek	78 %
TLC	R _f = 0,14 mobilna faza = eter/petrol eter = 1/5
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,34-1,38 (m, 2H, piperidin-H); 1,45 (s, 9H, (CH ₃) ₃); 1,72-1,75 (m, 2H, piperidin-H); 2,23-2,31 (m, 1H, piperidin-H); 2,75 (t, 2H, J = 11,2 Hz, piperidin-H); 3,86 (s, 3H, O-CH ₃); 4,08-4,15 (m, 2H, piperidin-H); 6,24 (dd, 1H, J ₁ = 16,0 Hz, J ₂ = 6,8 Hz, CH=CH); 6,38 (d, 1H, J = 16,0 Hz, CH=CH); 7,35-7,37 (m, 2H, 2x Aromat-H); 7,93-7,95 (m, 2H, 2x Aromat-H)
MS (ESI+)	Spojina ni dala masnega pika v ESI tehniki

4.6.3 Sinteza *tert*-butil (*E*)-4-(2-(naftalen-2-il)vinil)piperidin-1-karboksilata (13**) in *tert*-butil (*Z*)-4-(2-(naftalen-2-il)vinil)piperidin-1-karboksilata (**14**)**



Slika 17: Reakcijska shema sinteze spojine **13** in **14**

Spojini **13** in **14** smo sintetizirali po splošnem postopku B, tako da smo 2,58 g spojine **7** raztopili v 30 ml brezvodnega THF, dodali 0,78 g NaHMDS in 1,44 g KHMDS (1,2 ekv; 2 N raztopina v THF) ter kasneje še 1,28 g spojine **3**. Nastalo spojino smo očistili s kolonsko kromatografijo, pri čemer smo uporabili mobilno fazo eter/petrol eter = 1/5.

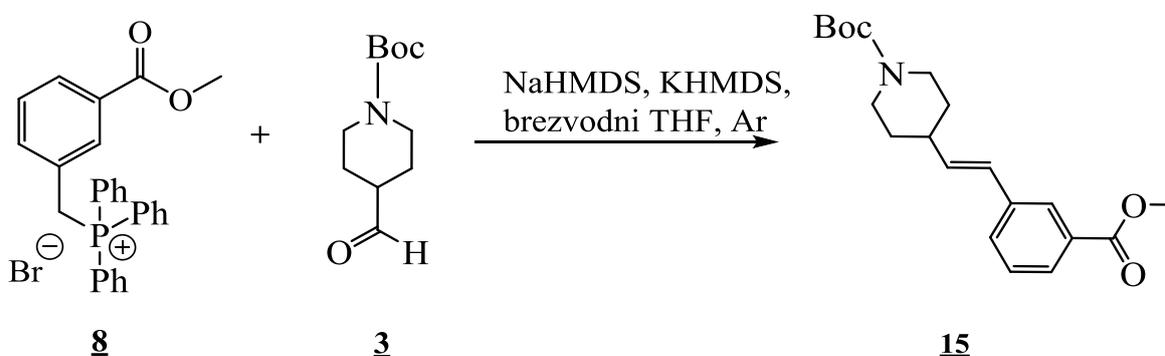
Tabela 8: Analizni podatki za spojino **13** in **14**

Videz	Bledo rumena oljnata snov (13) Umazano bela kristalna snov (14)
Tališča [°C]	/ (13) 69-74 (14)
Izkoristek	76 % (razmerje 13:14 = 3:1)
TLC	Rf= 0,22 (14) Rf= 0,16 (13) mobilna faza= eter/petrol eter = 1/5
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,39-1,44 (m, 2H, 2x piperidin-H); 1,47 (s, 9H, (CH ₃) ₃); 1,78-1,81 (m, 2H, 2x piperidin-H); 2,29-2,38 (m, 1H, piperidin-H); 2,81 (t, 2H, J = 11,6 Hz, 2x piperidin-H); 4,09-4,15 (m, 2H, 2x piperidin-H); 6,27 (dd, 1H, J ₁ = 6,9 Hz, J ₂ = 15,9 Hz, CH=CH); 6,54 (d, 1H, J = 15,9 Hz, CH=CH); 7,39-7,47 (m, 2H, 2x naftalen-H); 7,57 (dd, 1H, J ₁ = 8,6 Hz, J ₂ = 1,6 Hz, naftalen-H); 7,67-7,69 (m, 1H, naftalen-H); 7,76-7,79 (m, 3H, 3x naftalen-H) (13)

δ (ppm) = 1,38-1,42 (m, 2H, 2x piperidin-H); 1,46 (s, 9H, (CH₃)₃); 1,67-1,77 (m, 2H, 2x piperidin-H); 2,70-2,82 (m, 3H, 3x piperidin-H); 4,05-4,14 (m, 2H, 2x piperidin-H); 5,54 (dd, 1H, $J_1 = 11,5$ Hz, $J_2 = 10,1$ Hz, CH=CH); 6,55 (d, 1H, $J = 11,6$ Hz, CH=CH); 7,38 (dd, 1H, $J_1 = 8,5$ Hz, $J_2 = 1,5$ Hz, naftalen-H); 7,45-7,50 (m, 2H, 2x naftalen-H); 7,67-7,69 (m, 1H, naftalen-H); 7,80-7,83 (m, 3H, 3x naftalen-H) (**14**)

MS (ESI+) Spojini nista dali masnega pika v ESI tehniki

4.6.4 Sinteza *tert*-butil (*E*)-4-(3-(metoksikarbonil)stiril)piperidin-1-karboksilata (**15**)



Slika 18: Reakcijska shema sinteze spojine **15**

Spojino **15** smo sintetizirali po splošnem postopku B, tako da smo 2,72 g spojine **8** raztopili v 30 ml brezvodnega THF, dodali 0,78 g NaHMDS in 1,44 g KHMDS (1,2 ekv; 2 N raztopina v THF) ter kasneje še 1,28 g spojine **3**. Nastalo spojino smo očistili s kolonsko kromatografijo, pri čemer smo uporabili mobilno fazo etilacetat/*n*-heksan = 1/2.

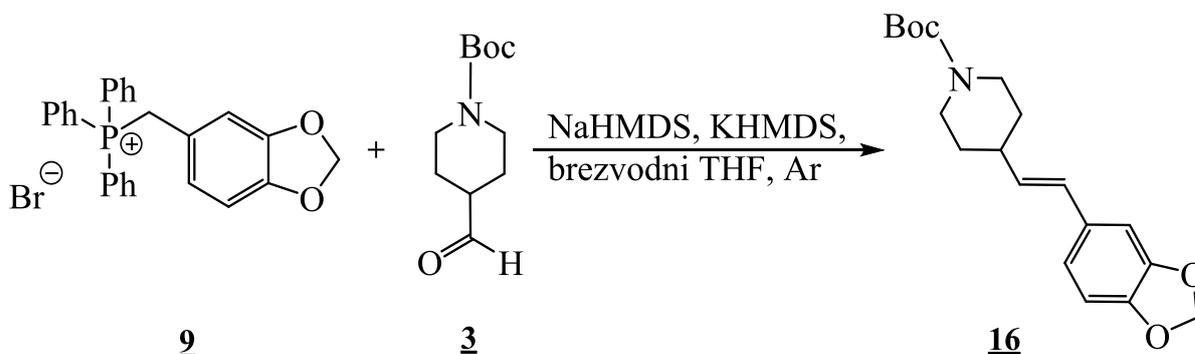
Tabela 9: Analizni podatki za spojino **15**

Videz	Transparentna oljnata snov
Tališča [°C]	/
Izkoristek	69 %
TLC	R _f = 0,36 mobilna faza = etilacetat/ <i>n</i> -heksan = 1/2
¹ H NMR (400	δ (ppm) = 1,36 (dt, 1H, $J_1 = 12,3$ Hz, $J_2 = 4,2$ Hz, piperidin-H); 1,39 (dt, 1H,

MHz, CDCl₃) $J_1 = 12,2$ Hz, $J_2 = 4,0$ Hz); 1,47 (s, 9H, (CH₃)₃); 1,73-1,80 (m, 2H, 2x piperidin-H); 2,26-2,35 (m, 1H, piperidin-H); 2,76-2,81 (m, 2H, 2x piperidin-H); 3,92 (s, 3H, O-CH₃); 4,04-4,20 (m, 2H, 2x piperidin-H); 6,23 (dd, 1H, $J_1 = 6,8$ Hz, $J_2 = 15,9$ Hz, CH=CH); 6,41 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz, CH=CH); 7,37 (t, 1H, $J = 7,7$ Hz, Aromat-H); 7,50-7,53 (m, 1H, Aromat-H); 7,86-7,88 (m, 1H, Aromat-H); 8,03 (t, 1H, $J = 1,7$ Hz, Aromat-H)

MS (ESI+) Spojina ni dala masnega pika v ESI tehniki

4.6.5 Sinteza *tert*-butil (E)-4-(2-(benzo[1,3]dioksol-5-il)vinil)piperidin-1-karboksilata (16)



Slika 19: Reakcijska shema sinteze spojine 16

Spojino 17 smo sintetizirali po splošnem postopku B, tako da smo 3,09 g spojine 9 raztopili v 30 ml brezvodnega THF, dodali 0,78 g NaHMDS in 1,44 g KHMDS (1,2 ekv; 2 N raztopina v THF) ter kasneje še 1,28 g spojine 3. Nastalo spojino smo očistili s kolonsko kromatografijo, pri čemer smo uporabili mobilno fazo eter/petrol eter = 1/5.

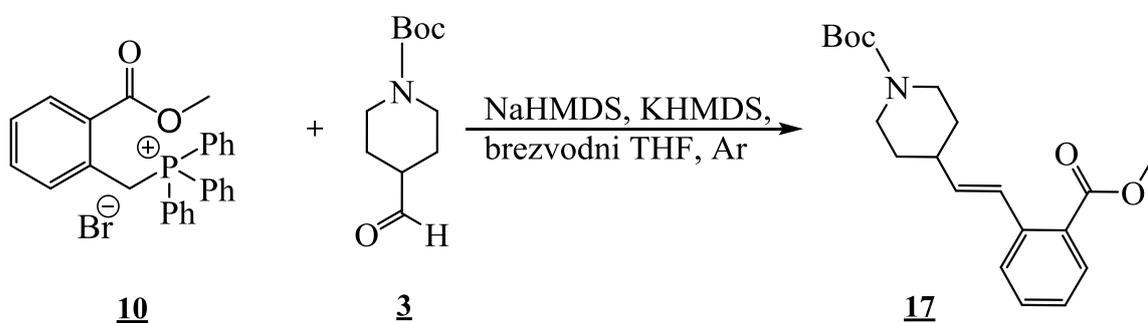
Tabela 10: Analizni podatki za spojino 16

Videz	Bledo rumena kristalna snov
Tališča [°C]	114-117
Izkoristek	65 %
TLC	R _f = 0,13 mobilna faza = eter/petrol eter = 1/5
¹H NMR (400	δ (ppm) = 1,30-1,41 (m, 2H, 2x piperidin-H); 1,47 (s, 9H, (CH ₃) ₃); 1,69-1,76

MHz, CDCl₃) (m, 2H, piperidin-H); 2,19-2,29 (m, 1H, piperidin-H); 2,68-2,80 (m, 2H, 2x piperidin-H); 3,99-4,19 (m, 2H, 2x piperidin-H); 5,94 (s, 2H, O-CH₂-O); 5,98 (dd, 1H, $J_1 = 15,9$ Hz, $J_2 = 6,7$ Hz, CH=CH); 6,30 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz, CH=CH); 7,50-7,53 (m, 1H, Aromat-H); 6,70-6,78 (m, 2H, 2x Aromat-H); 6,90 (s, 1H, Aromat-H)

MS (ESI+) Spojina ni dala masnega pika v ESI tehniki

4.6.6 Sinteza *terc*-butil (*E*)-4-(2-(metoksikarbonil)stiril)piperidin-1-karboksilata (17)



Slika 20: Reakcijska shema sinteze spojine 17

Spojino 17 smo sintetizirali po splošnem postopku B, tako da smo 2,72 g spojine 10 raztopili v 30 ml brezvodnega THF, dodali 0,78 g NaHMDS in 1,44 g KHMDS (1,2 ekv; 2 N raztopina v THF) ter kasneje še 1,47 g spojine 3. Nastalo spojino smo očistili s kolonsko kromatografijo, pri čemer smo uporabili mobilno fazo etilacetat/*n*-heksan = 1/2.

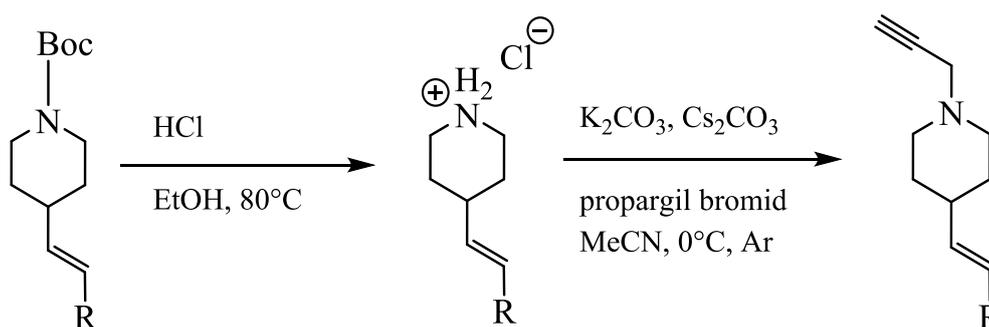
Tabela 11: Analizni podatki za spojino 17

Videz	Transparentna oljnata snov
Tališča [°C]	/
Izkoristek	45 %
TLC	R _f = 0,11 mobilna faza = etilacetat/ <i>n</i> -heksan = 1/2
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,35-1,44 (m, 2H, 2x piperidin-H); 1,47 (s, 9H, (CH ₃) ₃); 1,75-1,83 (m, 2H, 2x piperidin-H); 2,29-2,39 (m, 1H, piperidin-H); 2,74- 2,83 (m, 2H, 2x piperidin-H); 3,90 (s, 3H, O-CH ₃); 4,08-4,19 (m, 2H, 2x piperidin-H); 6,05 (dd, 1H, $J_1 = 15,9$ Hz, $J_2 = 6,8$ Hz, CH=CH); 7,19 (d, 1H, $J = 16,0$ Hz,

CH=CH); 7,25-7,29 (m, 1H, Aromat-H); 7,45 (dt, 1H, $J_1 = 7,9$ Hz, $J_2 = 1,2$ Hz, Aromat-H); 7,51-7,54 (m, 1H, Aromat-H); 7,45 (dd, 1H, $J_1 = 7,9$ Hz, $J_2 = 1,2$ Hz, Aromat-H)

MS (ESI+) Spojina ni dala masnega pika v ESI tehniki

4.7 ODSTRANITEV Boc ZAŠČITE in N-ALKILACIJA PIPERIDINA

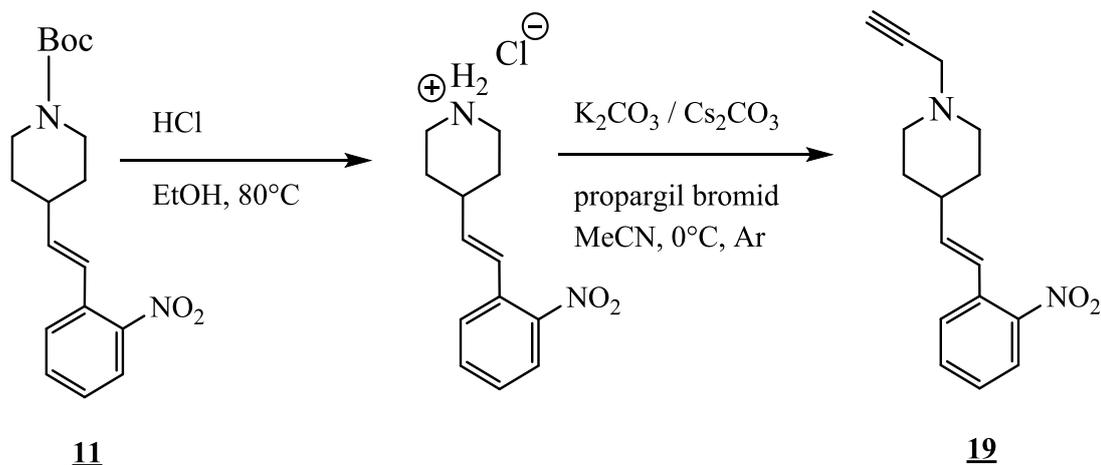


Slika 21: Reakcijska shema odstranitve Boc zaščite in N-alkilacije piperidina

Splošni postopek C:

Za odstranitev Boc zaščite smo uporabili kislinsko metodo. V raztopino Boc zaščitenega derivata (1,0 ekv.) v 10-15 ml EtOH smo dodali koncentrirano HCl (10,0 ekv.) pri sobni temperaturi. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 2 uri pri 80°C. Topilo smo odstranili z rotavapiranjem, surov produkt pa smo uporabili v naslednjem koraku brez nadaljnega čiščenja. N-alkiliranje smo izvedli tako, da smo intermediat piperidina (v obliki soli s HCl) raztopili v 30 ml brezvodnega MeCN pri 0 °C pod argonovo atmosfero. Raztopini smo dodali K₂CO₃ ali CsCO₃ (3,0 ekv.) ter po kapljicah propargil bromid (1,2 ekv.; 80% raztopina v toluenu). Nastalo suspenzijo smo pustili mešati pri sobni temperaturi 16-24 ur. Topilo smo odstranili z rotavapiranjem, preostanek pa raztopili v mešanici etilacetata (50 ml) in nasičene vodne raztopine NaHCO₃ (50 ml) ter jo prenesli v lij ločnik. Po ločitvi faz smo organsko fazo sprali z nasičeno vodno raztopino NaCl (50 ml), sušili z brezvodnim Na₂SO₄, odfiltrirali sušilno sredstvo in odparili topilo z rotavaporjem. Surov produkt smo nato očistili s kolonsko kromatografijo.

4.7.1 Sinteza (*E*)-4-(2-nitrostiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (**19**)



Slika 22: Reakcijska shema sinteze spojine **19**

Po splošnem postopku C smo iz spojine **11** izvedli sintezo spojine **19**. Za odstranitev Boc zaščite smo 80 mg spojini **11** dodali 58 μ l HCl. Za reakcijo N-alkiliranja pa smo potrebovali 78 mg K_2CO_3 in 27 μ l propargil bromida. Spojino **19** smo očistili s kolonsko kromatografijo, pri čemer smo uporabili mobilno fazo etilacetat/*n*-heksan = 1/2.

Tabela 12: Analizni podatki za spojino **19**

Videz	Svetlo rjava kristalna snov
Tališča [°C]	50-52
Izkoristek	54 %
TLC	R _f = 0,19 mobilna faza = etilacetat/ <i>n</i> -heksan = 1/2
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,53-1,63 (m, 2H, 2x piperidin-H); 1,80-1,86 (m, 2H, 2x piperidin-H); 2,16-2,23 (m, 1H, piperidin-H); 2,25 (t, 1H, $J = 2,4$ Hz, propargil-CH); 2,28 (dt, 2H, $J_1 = 11,7$ Hz, $J_2 = 2,5$ Hz, 2x piperidin-H); 2,91-2,96 (m, 2H, 2x piperidin-H); 3,32 (d, 2H, $J = 2,4$ Hz, propargil-CH ₂); 6,14 (dd, 1H, $J_1 = 15,8$ Hz, $J_2 = 7,1$ Hz, CH=CH); 6,85 (d, 1H, $J = 15,8$ Hz, CH=CH); 7,31-7,36 (m, 1H, Aromat-H); 7,50-7,54 (m, 1H, Aromat-H); 7,58 (dd, 1H, $J_1 = 7,9$ Hz, $J_2 = 1,5$ Hz, Aromat-H); 7,87 (dd, 1H, $J_1 = 8,2$ Hz, $J_2 = 1,1$ Hz, Aromat-H)
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 31,67; 38,97; 47,18; 52,05; 73,03; 78,93; 123,75; 124,38; 127,50;

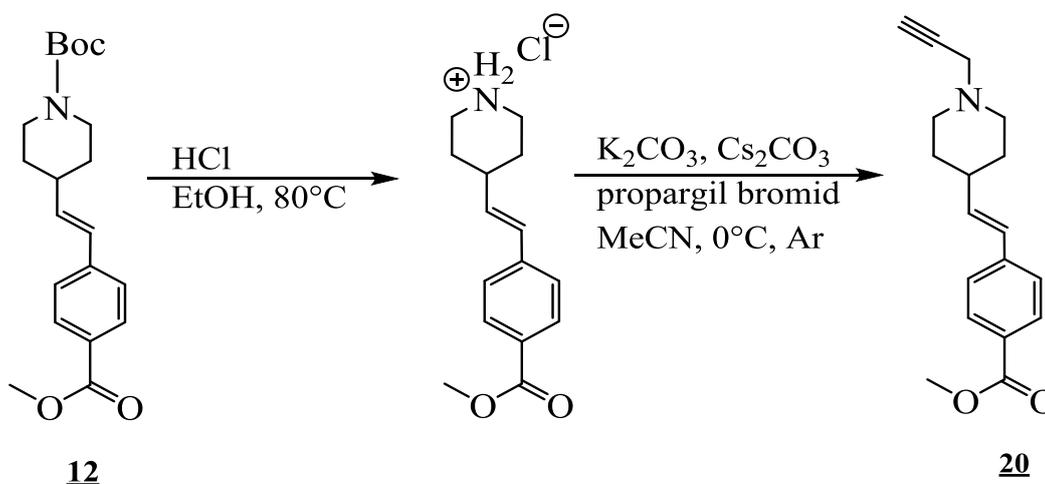
MHz, CDCl₃) 128,42; 132,83; 133,19; 140,36; 147,70

HRMS Izračunano za C₁₆H₁₉N₂O₂ (M+H)⁺: 271,1438

Teoretična: 271,1441

HPLC t_R = 5,957 min (94,0 %)

4.7.2 Sinteza metil (*E*)-4-(2-(1-(prop-2-in-1-il)piperidin-4-il)vinil)benzoata (20)



Slika 23: Reakcijska shema sinteze spojine 20

Po splošnem postopku C smo iz spojine 12 izvedli sintezo spojine 20. Za odstranitev Boc zaščite smo 300 mg spojine 12 dodali 209 μl HCl. Za reakcijo N-alkiliranja pa smo potrebovali 283 mg K₂CO₃ in 98 μl propargil bromida. Spojino 20 smo očistili s kolonsko kromatografijo, pri čemer smo uporabili mobilno fazo etilacetat/*n*-heksan = 1/3.

Tabela 13: Analizni podatki za spojino 20

Videz	Umazano bela kristalna snov
Tališča [°C]	nad 250
Izkoristek	49 %
TLC	R _f = 0,16 mobilna faza = etilacetat/ <i>n</i> -heksan = 1/3

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 1,55 (dt, 1H, $J_1 = 12,2$ Hz, $J_2 = 3,1$ Hz, piperidin-H); 1,58 (dt, 1H, $J_1 = 12,1$ Hz, $J_2 = 3,3$ Hz, piperidin-H); 1,77-1,84 (m, 2H, 2x piperidin-H); 2,10-2,19 (m, 1H, piperidin-H); 2,23-2,31 (m, 3H, 2x piperidin-H in propargil-CH); 2,90-2,95 (m, 2H, 2x piperidin-H); 3,31-3,32 (m, 2H, propargil-CH₂); 3,89 (s, 3H, O-CH₃); 6,28 (dd, 1H, $J_1 = 16,0$ Hz, $J_2 = 6,8$ Hz, CH=CH); 6,40 (d, 1H, $J = 16,0$ Hz, CH=CH); 7,38 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz, Aromat-H); 7,94 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz, Aromat-H)

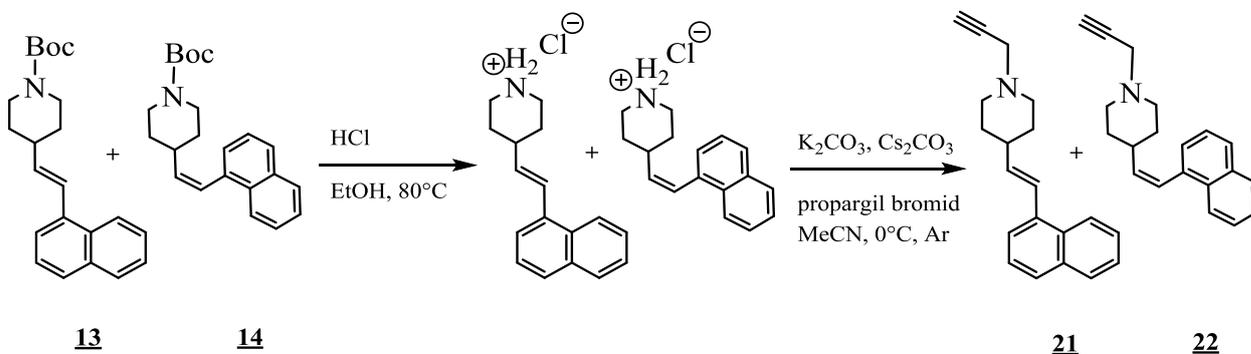
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 31,83; 38,97; 47,23; 52,00; 52,17; 73,00; 79,01; 125,86; 127,52; 128,41; 129,86; 137,77; 142,16; 166,95

HRMS Izračunano za C₁₈H₂₂NO₂ (M+H)⁺: 284,1642

Teoretična: 284,1645

HPLC $t_R = 6,043$ (92,3 %)

4.7.3 Sinteza (E)-4-(2-(naftalen-1-il)vinil)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (21) in (Z)-4-(2-(naftalen-1-il)vinil)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (22)



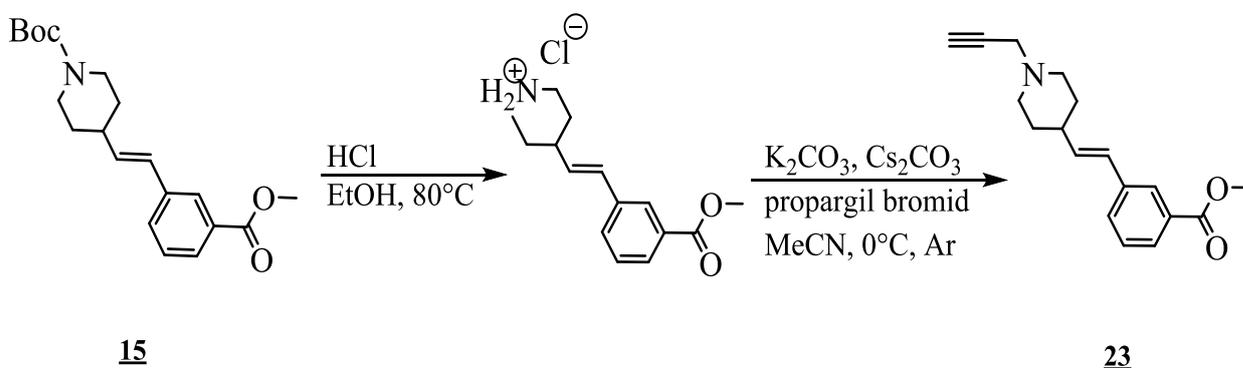
Slika 24: Reakcijska shema sinteze spojine 21 in 22

Po splošnem postopku C smo iz spojin 13 in 14 izvedli sintezo spojin 21 in 22. Za odstranitev Boc zaščite smo 250 mg spojini 13 dodali 228 μ l HCl, 70 mg spojini 14 pa 64 μ l HCl. Za reakcijo N-alkiliranja smo pri spojini 13 potrebovali 307 mg K₂CO₃ in 106 μ l propargil bromida, pri spojini 14 pa 86 mg K₂CO₃ in 30 μ l propargil bromida. Spojini 21 in 22 smo očistili s kolonsko kromatografijo, pri čemer smo uporabili mobilno fazo etilacetat/*n*-heksan = 1/3.

Tabela 14: Analizni podatki za spojino 21 in 22

Videz	Belo rumena kristalna snov (<u>21</u>) Umazano bela kristalna snov (<u>22</u>)
Tališča [°C]	75-80 (<u>21</u>) 57-60 (<u>22</u>)
Izkoristek	59 % (razmerje <u>21</u> : <u>22</u> = 3:1)
TLC	Rf= 0,21 (<u>21</u>) Rf= 0,17 (<u>22</u>) mobilna faza = etilacetat/ <i>n</i> -heksan = 1/3
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)	<p>δ (ppm) = 1,60 (dt, 1H, $J_1 = 12,3$ Hz, $J_2 = 3,2$ Hz, piperidin-H); 1,63 (dt, 1H, $J_1 = 11,9$ Hz, $J_2 = 3,2$ Hz, piperidin-H); 1,83-1,89 (m, 2H, 2x piperidin-H); 2,16-2,23 (m, 1H, piperidin-H); 2,26- 2,34 (m, 3H, 2x piperidin-H in propargil-CH); 2,93-2,99 (m, 2H, piperidin-H); 3,34 (d, 2H, $J = 2,4$ Hz, propargil-CH₂); 6,30 (dd, 1H, $J_1 = 15,9$ Hz, $J_2 = 7,0$ Hz, CH=CH); 6,55 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz, CH=CH); 7,39-7,47 (m, 2H, 2x naftalen-H); 7,57-7,61 (m, 1H, naftalen-H); 7,68-7,70 (m, 1H, naftalen-H); 7,75-7,78 (m, 3H, 3x naftalen-H) (<u>21</u>)</p> <p>δ (ppm) = 1,54-1,64 (m, 2H, 2x piperidin-H); 1,77-1,82 (m, 2H, piperidin-H); 2,17-2,26 (m, 3H, 2x piperidin-H in propargil-CH); 2,61-2,71 (m, 1H, piperidin-H); 2,88-2,93 (m, 2H, 2x piperidin-H); 3,30-3,32 (m, 2H, propargil-CH₂); 6,30 (dd, 1H, $J_1 = 15,9$ Hz, $J_2 = 7,0$ Hz, CH=CH); 6,55 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz, CH=CH); 7,39-7,47 (m, 2H, 2x naftalen-H); 7,57-7,61 (m, 1H, naftalen-H); 7,68-7,70 (m, 1H, naftalen-H); 7,75-7,78 (m, 3H, 3x naftalen-H) (<u>22</u>)</p>
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)	<p>δ (ppm) = 32,07; 39,00; 47,28; 52,29; 73,00; 79,09; 123,49; 125,51; 125,56; 126,13; 127,61; 127,81; 128,06; 128,37; 132,70; 133,66; 135,08; 135,38 (<u>21</u>)</p> <p>δ (ppm) = 32,33; 34,56; 47,24; 51,91; 73,03; 78,99; 125,71; 126,08; 126,96; 127,12; 127,56; 127,70; 127,89; 128,17; 132,16; 133,30; 135,19; 137,68 (<u>22</u>)</p>
HRMS	Izračunano za C ₂₀ H ₂₂ N (M+H) ⁺ : 276,1746 (<u>21</u>) 276,1745 (<u>22</u>) Teoretična: 276,1747 (<u>21</u>) 276,1747 (<u>22</u>)
HPLC	t _R = 7,823 min (98,4 %) (<u>21</u>) t _R = 7,903 min (97,1 %) (<u>22</u>)

4.7.4 Sinteza metil (*E*)-3-(2-(1-(prop-2-in-1-il)piperidin-4-il)vinil)benzoata (23)



Slika 25: Reakcijska shema sinteze spojine 23

Po splošnem postopku C smo iz spojine 15 izvedli sintezo spojine 23. Za odstranitev Boc zaščite smo 150 mg spojine 15 dodali 105 μ l HCl. Za reakcijo N-alkiliranja pa smo potrebovali 142 mg K_2CO_3 in 50 μ l propargil bromida. Spojino 23 smo očistili s kolonsko kromatografijo, pri čemer smo uporabili mobilno fazo etilacetat/*n*-heksan = 1/3.

Tabela 15: Analizni podatki za spojino 23

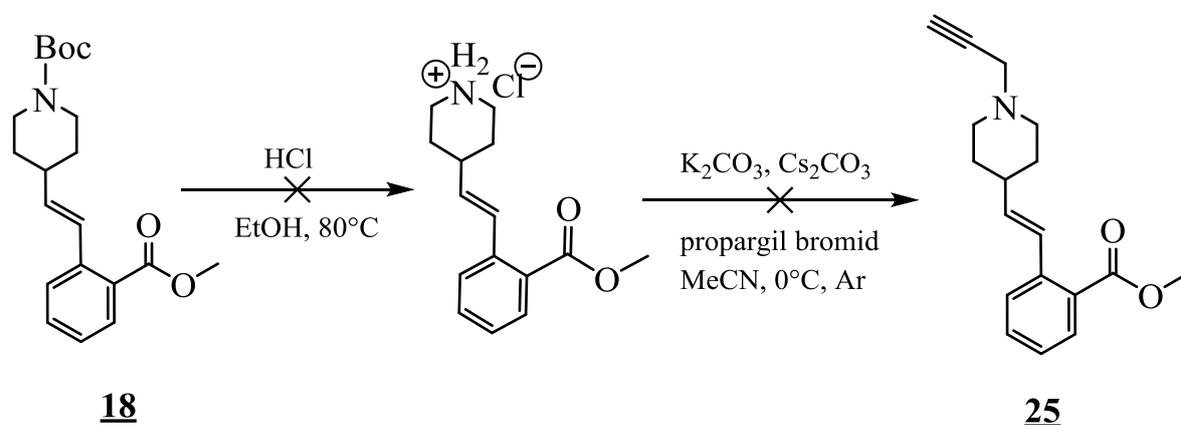
Videz	Rahlo rumena oljnata snov
Tališča [°C]	/
Izkoristek	49 %
TLC	R _f = 0,19 mobilna faza = etilacetat/ <i>n</i> -heksan = 1/3
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,52-1,62 (m, 2H, 2x piperidin-H); 1,79-1,85 (m, 2H, 2x piperidin-H); 2,11-2,20 (m, 1H, piperidin-H); 2,25-2,32 (m, 3H, 2x piperidin-H in propargil-CH); 2,91-2,97 (m, 2H, 2x piperidin-H); 3,32-3,34 (m, 2H, propargil-CH ₂); 3,92 (s, 3H, O-CH ₃); 6,25 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 6,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 16,0 Hz, CH=CH); 6,41 (d, 1H, <i>J</i> = 16,0 Hz, CH=CH); 7,34-7,39 (m, 1H, Aromat-H); 7,50-7,54 (m, 1H, Aromat-H); 7,86 (d, 1H, <i>J</i> = 7,6 Hz, Aromat-H); 8,01-8,03 (m, 1H, Aromat-H)
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)	31,91; 38,86; 47,24; 52,15; 52,21; 73,01; 79,03; 127,04; 127,33; 127,97; 128,54; 130,36; 130,44; 136,27; 137,97; 167,15
HRMS	Izračunano za C ₁₈ H ₂₂ NO ₂ (M+H) ⁺ : 284,1644 Teoretična: 284,1645

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 32,06; 38,70; 47,23; 52,25; 73,03; 79,00; 100,93; 105,41; 108,20;
120,38; 127,69; 132,15; 133,19; 146,69; 147,93

HRMS Izračunano za C₁₇H₂₀NO₂ (M+H)⁺: 270,1486
Teoretična: 270,1489

HPLC t_R = 6,013 min (97,0 %)

4.7.6 Poskus sinteze metil (*E*)-2-(2-(1-(prop-2-in-1-il)piperidin-4-il)vinil)benzoata (25)



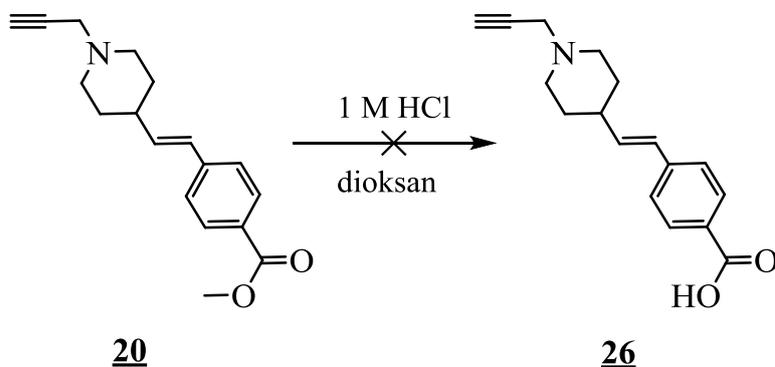
Slika 27: Reakcijska shema sinteze spojine 25

Po splošnem postopku C smo iz spojine 18 izvedli sintezo spojine 25. Za odstranitev Boc zaščite smo 220 mg spojine 18 dodali 153 μ l HCl. Za reakcijo N-alkiliranja pa smo potrebovali 208 mg K₂CO₃ in 72 μ l propargil bromida. Spojino 25 smo očistili s kolonsko kromatografijo, pri čemer smo uporabili mobilno fazo etilacetat/*n*-heksan = 1/2 \rightarrow 2/1. Reakcija je bila neuspešna, saj nismo dobili želene spojine.

Tabela 17: Analizni podatki za spojino 25

Videz	Umazano bela kristalna snov
Izkoristek	15 %
TLC	R _f = 0,19 mobilna faza = etilacetat/ <i>n</i> -heksan = 1/2 \rightarrow 2/1

4.7.7 Poskus sinteze (E)-4-(2-(1-(prop-2-in-1-il)piperidin-4-il)vinil)benzojske kisline (26)



Slika 28: Reakcijska shema sinteze spojine 26

Postopek:

V bučko smo natehtali 100 mg končne spojine **20** ter dodali 1 ml dioksana in 4 ml 1 M HCl. Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Topilo smo naslednjič odstranili z rotavapiranjem, nastali produkt pa posušili. Reakcija je bila neuspešna, saj nismo dobili zelene spojine.

5 RAZPRAVA IN REZULTATI

5.1 KOMENTAR SINTEZNEGA DELA

Sintezni del je bil sestavljen iz šestih reakcijskih stopenj, pri katerem smo uspešno sintetizirali 6 končnih spojin (**19**, **20**, **21**, **22**, **23** in **24**). Težave so se pojavile pri spojini **25**, pri kateri zadnjega koraka sinteze (*N*-alkiliranje) nismo mogli izvesti, saj je v prejšnji stopnji Wittigova reakcija imela zelo slab izkoristek. Razlog za to bi lahko bila sterična oviranost pri sintezi spojine **17** na elektrofilu zaradi bližine metil karboksilata, ki je prisoten na *orto* mestu na fenilnem obroču. Poleg tega pri zadnji stopnji reakcije (*N*-alkiliranje) nismo uspeli sintetizirati spojine, kakršne smo želeli. Na *orto* mestu fenilnega obroča je namesto estra nastal amid, kar smo tudi potrdili z nmr spektrom, na katerem so bili vidni podvojeni signali za propargilno skupino. Pri poskusu sinteze spojine **26** smo imeli veliko težav z izvedbo hidrolize. Po prvem neuspelem poskusu, kjer smo reakcijo hidrolize izvedli v zmesi dioksana in 1 M HCl pri sobni temperaturi, smo nato poskusili s kislinsko hidrolizo na refluxu, potem pa še z alkalno hidrolizo, kjer smo uporabili 1 M NaOH. V obeh primerih je bila hidroliza neuspešna, zato smo tokrat idejo o pripravi kislinskega derivata opustili, saj zaradi ostrih pogojev hidrolize nismo hoteli tvegati razpad končnega produkta. Vse končne spojine so optično čisti *trans* izomeri z izjemo spojine **7**, iz katere smo uspeli pridobiti tako *trans* (**21**) kot tudi *cis* izomer (**22**).

5.1.1 Uvedba zaščitne skupine Boc₂O

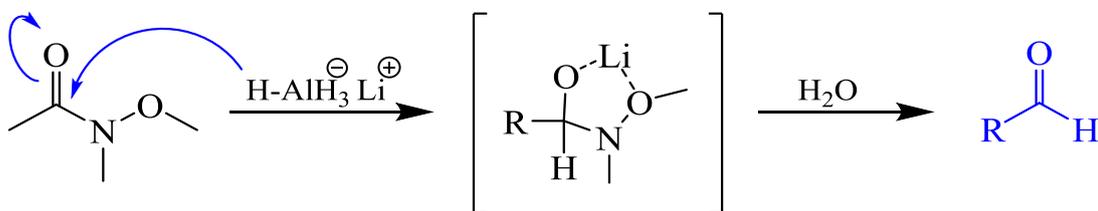
Pri sintezi spojine **1** smo izhajali iz komercialno dostopne piperidin-4-karboksilne kisline. Poleg elektrofilnega centra vsebuje spojina reaktiven nukleofilni center, ki ga predstavlja aminska skupina piperidina. (28) Naš prvi korak je bil zaščita te skupine, saj bi v nasprotnem primeru lahko v naslednjih stopnjah potekla reakcija na njej namesto na želenih mestih, poleg tega pa z zaščito aminske skupine preprečimo nastanek potencialnih stranskih produktov. Ker je sol piperidin-4-karboksilne kisline topna v vodi, di-*tert*-butil dikarbonat pa v dioksanu, smo za topilo uporabili zmes obeh ter s tem izboljšali njuno topnost. Večjo selektivnost reakcije smo dosegli z nizko temperaturo (uporaba ledene kopeli) in s postopnim dodajanjem raztopine Boc₂O. Reakcija poteka po mehanizmu nukleofilne substitucije, kjer aminska skupina nukleofilno napade elektrofilni C-atom

karbonilne skupine Boc₂O. Kot stranska produkta reakcije nastaneta CO₂ in *tert*-butanol, ki ga odstranimo z ekstrakcijo v dietil eter. Preostanek vodne faze, kjer se je nahajal naš produkt v obliki soli, smo nakisali in ga s tem pretvorili v neionizirano obliko, pri čemer se je tvorila oborina. Pri tem smo morali paziti, da vodne faze nismo preveč nakisali, saj bi s tem tvegali odščito aminske skupine. (29)

5.1.2 Sinteza Weinrebovega amida in njegova redukcija do aldehida

Naslednji korak je bila priprava Weinrebovega amida (*N*-metoksi-*N*-metilamida), ki omogoča selektivno redukcijo karboksilne kisline do ketona ali aldehida. Kot reagent smo uporabili *N,O*-dimetilhidroksilamin in piperidin-4-karboksilno kislino, ki smo jo zaščitili v prejšnji stopnji. Pri reakciji smo uporabili sklopitvena reagentna 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronijev tetrafluoroborat (TBTU) in 1-hidroksibenzotriazol (HOBt), katerih glavna funkcija je aktivacija slabše reaktivne karboksilne skupine. Dodatek, kot je HOBt, se močno priporoča pri vseh reakcijah tvorbe amidne vezi, saj dodatno poveča reaktivnost in je eden izmed najučinkovitejših reagentov, ki preprečijo racemizacijo pri reakcijah s sklopitvenimi reagenti. (30,31)

Pri redukciji do aldehida preko Weinrebovega amida smo uporabili LiAlH₄, ki je močan reducent. Reakcijo je bilo potrebno po 2 urah ustaviti z vodno raztopino, drugače bi lahko potekla redukcija do alkohola. V nepolarnih topilih (THF) se reakcija ustavi pri tvorbi tetraedričnega intermedijata kompleksiranega z litijem, ki se ob dodatku nasičene vodne raztopine NaHCO₃ pretvori v aldehyd. Tvori se sol, ki ostane v vodni fazi, aldehyd pa v organski fazi zaradi lipofilnih lastnosti. Ker LiAlH₄ burno reagira z vodo, pri čemer nastaja vodik, smo raztopino NaHCO₃ postopoma dodajali v reakcijsko zmes. (26,32)

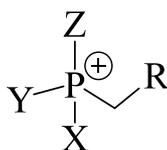


Slika 29: Redukcija Weinrebovega amida do aldehida (priprejeno po 32)

5.1.3 Priprava Wittigovega reagenta in Wittigova reakcija

Naš najpomembnejši korak je predstavljal Wittigova reakcija, ki jo je prvič odkril Georg Wittig leta 1979 in je široko uporabljena v organskih sintezah za pripravo alkenov. Reakcija omogoča pretvorbo aldehydov ali ketonov s fosfonijevim ilidom do alkenov, pri čemer nastane fosfin oksid.

Fosfonijevi ilidi so dipolarizirane spojine, ki v svoji strukturi vsebujejo pozitivno nabit fosfor in nanj vezan ogljik z negativnim nabojem. C-H vez tik ob fosforju je torej relativno kislila in se ob dodatku močnejše baze zlahka deprotonira. (33)



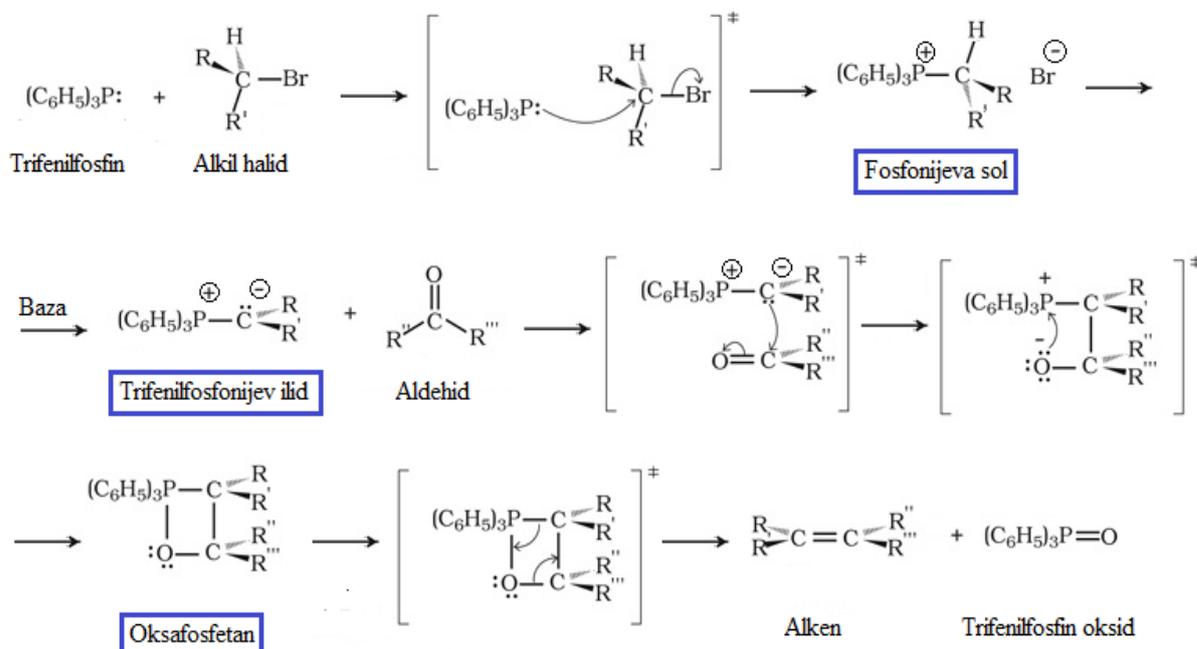
Slika 30: Struktura ilida

Fosfonijeve ilide delimo v tri skupine glede na naravo substituentov vezanih na α -ogljik (na sliki označen z R). Če je R alkilna skupina, je ilid destabiliziran in zlahka reagira z vlago iz okolice. Če R predstavlja arilna ali alkenilna skupina, je ilid manj nagnjen k hidrolizi zaradi stabilizacije konjugiranega sistema, zato je semi-stabiliziran. Ilidi, ki izhajajo iz trifenilfosfina (X, Y, Z = Ph) in R predstavlja karbonil, ester, nitril ali podobne konjugirane skupine, sodijo med stabilizirane ilide. Reaktivnost ilida je ključna lastnost, od katere je odvisna stereoselektivnost Wittigove reakcije. Pri reakciji z destabiliziranim ilidom nastanejo *cis* alkeni, pri reakciji s stabiliziranim ilidom pa *trans* alkeni. Pri uporabi semi-stabiliziranih ilidov večje stereospecifičnosti ne dosežemo. (34)

Za potek Wittigove reakcije je bilo predlaganih več mehanizmov, danes pa vemo, da glavni mehanizem poteka preko intermediata oksafosfetana (OPA). Fosfonijev ilid reagira s karbonilno skupino preko [2+2] cikloadicije, ki neposredno tvori OPA. Premikanje elektronskega para se nadaljuje, dokler se kisik ne odcepi od ogljika in se veže na fosfor. (33,34)

Za izvedbo reakcije smo morali najprej pripraviti Wittigov reagent oz. trifenilfosfonijev ilid, ki smo ga pridobili z reakcijo med trifenilfosfinom in ustreznim alkil halidom. Reakcija tvorbe reagenta je preprosta in je sestavljena iz 2 korakov, kjer najprej poteče

nukleofilna substitucija (S_N2), ki ji nato sledi acido-bazična reakcija. V našem primeru smo uporabili trifenilfosfin (PPh_3), ki je odličen nukleofil. Le-ta po S_N2 mehanizmu zamenja dobro izstopajočo skupino (halogeni) in tvori fosfonijevo sol. (35)



Slika 31: Shema priprave Wittigovega reagenta in mehanizem Wittigove reakcije (prirejeno po 33)

Tako pripravljen reagent smo naprej uporabili v Wittigovi reakciji. Da bi preprečili hidrolizo ilidov, smo morali zagotoviti brezvodne pogoje, zato je bilo topilo izbire brezvodni THF. V reakcijsko zmes smo dodali kombinacijo močnih baz NaHMDS in KHMDS, ki sta odcepili proton na ogljiku ilida. Reakcija je potekla po zgoraj opisanem mehanizmu. Ker smo pri reakciji uporabili semi-stabiliziran ilid, reakcija ni potekla stereoselektivno in nastala je zmes *cis* in *trans* alkenov.

5.1.4 Odstranitev BOC zaščite in *N*-alkiliranje

Ker je bila aminska skupina piperidina pri vseh korakih sinteze do tedaj zaščitena, smo jo nazadnje morali odščititi, da smo na njej lahko izvedli reakcijo *N*-alkiliranja. To smo izvedli z acidolizo, kjer smo uporabili koncentrirano HCl, kot topilo pa smo uporabili brezvodni EtOH. Pri reakciji alkiliranja smo potrebovali močno elektrofilno alkilirajoče

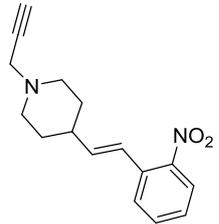
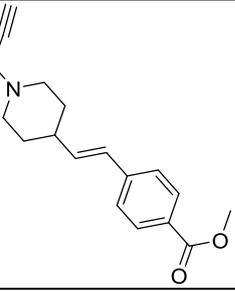
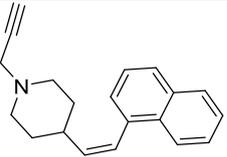
sredstvo, v našem primeru je to bil propargil bromid. V reakcijsko zmes smo dodali bazi K_2CO_3 in/ali Cs_2CO_3 , da smo nevtralizirali sproščeno HCl. Reakcijo je bilo potrebno izvesti v inertni atmosferi, ki jo je predstavljal argon.

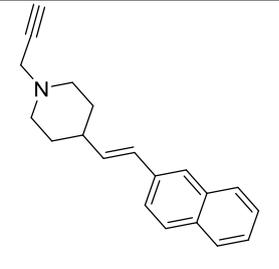
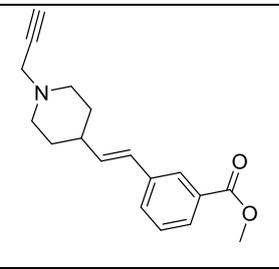
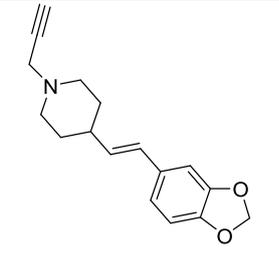
5.2 REZULTATI IN KOMENTAR BIOLOŠKEGA TESTIRANJA

5.2.1 Rezultati biološkega testiranja

Rezultati biološkega testiranja so prikazani v spodnji razpredelnici, kjer so s krepkim tiskom označene vrednosti IC_{50} izražene v nanomolarnih koncentracijah ter RA s poševnim tiskom izražene v odstotkih.

Tabela 18: Rezultati biološkega testiranja končnih spojin

Oznaka spojine	Strukturna formula	hMAO-A IC_{50} [nM] \pm SEM ali RA [%] pri 100 μ M	hMAO-B IC_{50} [nM] \pm SEM ali RA [%] pri 100 μ M
<u>19</u>		$IC_{50} = 7164.4 \pm 138.0$ nM	$IC_{50} = 4943.4 \pm 354.1$ nM
<u>20</u>		$IC_{50} = 58.3 \pm 6.4$ μM	$IC_{50} = 14.7 \pm 1.8$ nM
<u>22</u>		<i>RA = 82.3 \pm 0.9 %</i>	$IC_{50} = 1794.5 \pm 163.2$ nM

<u>21</u>		$RA = 80.8 \pm 0.2 \%$	$IC_{50} = 18.3 \pm 2.7 \text{ nM}$
<u>23</u>		$RA = 62.3 \pm 0.9 \%$	$IC_{50} = 367.9 \pm 46.7 \text{ nM}$
<u>24</u>		$IC_{50} = 58.1 \pm 2.3 \text{ }\mu\text{M}$	$IC_{50} = 211.0 \pm 25.5 \text{ nM}$

5.2.2 Komentar biološkega testiranja

Našim končnim spojinam smo ovrednotili zaviralno delovanje tako na MAO-A kot tudi na MAO-B, saj smo na ta način rezultate lahko primerjali in ugotovili, ali so spojine res selektivne za MAO-B. Spojinam smo pri koncentraciji 100 μM najprej določili rezidualno aktivnost encima (RA). Vrednost RA predstavlja razmerje med encimsko aktivnostjo v prisotnosti in odsotnosti zaviralca. Tistim spojinam, pri katerih je bila RA manjša od 50%, kar pomeni, da spojine zavirajo delovanje encima vsaj za polovico, smo naprej določili še vrednosti IC_{50} (koncentracija zaviralca, ki je potrebna za zaviranje delovanja encima za 50%). (26)

Iz rezultatov vidimo, da vseh 6 končnih spojin močneje zavira izoformo MAO-B kot MAO-A. Izmed njih 3 spojinam (**21**, **22**, **23**) pri MAO-A nismo mogli izračunati vrednosti IC_{50} (RA je bila večja od 50%), kar kaže na njihovo večjo selektivnost za MAO-B. Če pogledamo IC_{50} vrednosti spojine **19**, se koncentracije potrebne za zaviranje MAO-A in MAO-B ne razlikujejo veliko, zato lahko trdimo, da smo pridobili neselektiven zaviralec MAO. V nanomolarnem območju sta zaviralno aktivnost na MAO-B izkazali samo 2

spojini, izmed katerih encim najmočnejše zavira spojina **20** z $IC_{50} = 14,7$ nM, takoj za njo pa spojina **21** z $IC_{50} = 18,3$ nM, pri tem pa moramo upoštevati, da je slednja bolj selektivna za MAO-B.

Izsledki prejšnjih raziskovalnih del kažejo, da MAO-B močnejše zavirajo spojine s *trans* konfiguracijo. (24,28) V našem primeru *cis/trans* par predstavljata samo spojini **21** in **22**, kjer lahko dodatno potrdimo močnejše delovanje *trans* izomerov na izoformo MAO-B.

Ovrednotili smo tudi vpliv substituentov na zaviralno delovanje spojin. Ugotovili smo, da na zaviralno delovanje vplivata vrsta in pozicija substituenta na benzenovem obroču. Spojina substituirana na *para* mestu (**20**) je imela veliko večjo jakost delovanja v primerjavi s tistimi spojinami substituiranimi na *meta* ali *orto* mestu (**19** in **23**). Spojina **21**, ki v svoji strukturi vsebuje naftalenski fragment, je po jakosti delovanja druga najmočnejša. To bi lahko pripisali lastnostim naftalena, ki najverjetneje tvori hidrofobne in/ali π - π interakcije s tirozinskimi ostanki v aktivnem mestu.

Čeprav je spojina **20**, ki vsebuje ester na *para* mestu fenilnega obroča, izkazala največjo zaviralno delovanje (14,7 nM) pa se poraja vprašanje, ali bi priprava takšnih spojin kot zdravilnih učinkovin sploh bila smiselna. Vemo namreč, da so estri močno podvrženi metabolizmu in bi v našem primeru spojina **20** hidrolizirala, še preden bi dosegla tarčno mesto v možganih. (36) Ozirajoč se na prejšnje ugotovitve, lahko trdimo, da se je izmed vseh končnih spojin najbolje izkazala spojina **21** in bi lahko bila predmet nadaljnjih raziskav.

6 SKLEP

V okviru magistrskega raziskovalnega dela smo s sintezo sestavljeno iz šestih reakcijskih stopenj pridobili analoge znanega zaviralca MAO-B. Uspešno smo sintetizirali 6 končnih spojin, ki smo jim ovrednotili zaviralno delovanje na encimih MAO-A in MAO-B. Tekom celotnega dela smo prišli do naslednjih ugotovitev:

- Sinteznemu postopku, ki smo ga uporabili, potrjujemo ustreznost, saj smo vse spojine uspešno pridobili z dobrimi izkoristki. Izjema je le spojina **25**, katero po opisanem postopku nismo uspeli sintetizirati.
- Z Wittigovo reakcijo smo uspešno pripravili spojine z nenasičenimi (dvojnimi) vezmi; da je stereoselektivnost reakcije odvisna od reaktivnosti ilida, smo potrdili z uporabo semi-stabiliziranih ilidov, pri čemer smo dobili zmes *cis* in *trans* izomerov.
- Propargilna skupina je ključna za zaviralno delovanje na encimu MAO-B, saj smo vsem spojinam lahko določili IC_{50} pri biokemičnem testiranju.
- Vrsta in pozicija substituentov na benzenovem obroču vplivata na zaviralno delovanje na obe izoforni encima. Spojine substituirane na *para* mestu so imele veliko večjo jakost delovanja v primerjavi s tistimi, ki so substituirane na *meta* ali *orto* mestu.
- *Cis/trans* konfiguracija pomembno vpliva na jakost delovanja spojin. *Trans* izomeri v primerjavi *cis* izomeri močnejše zavirajo delovanje encima MAO-B.
- Izmed vseh spojin sta se najboljše izkazali spojina **20** z $IC_{50} = 14,7$ nM, takoj za njo pa spojina **21** z $IC_{50} = 18,3$ nM.

Če zaključimo, sta se spojin **20** in **21** s svojim delovanjem v nanomolarnem koncentracijskem območju izkazali kot obetavna selektivna zaviralca MAO-B in lahko predstavljata izhodišče pri načrtovanju novih zaviralcev MAO-B kot potencialnih zdravilnih učinkovin za zdravljenje Parkinsonove ter ostalih nevrodegenerativnih bolezni.

7 VIRI IN LITERATURA

1. Lemke TL, Williams DA, Roche WF, Zito SW: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 6. izdaja, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2008: 679 - 689
2. Živin M, Sket D: Temelji patološke fiziologije, 2.izdaja, UL MF Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2011: 308-313
3. Kare P, Bhat J, Sobhia ME: Structure-based design and analysis of MAO-B inhibitors for Parkinson's disease: using in silico approaches. *Molecular Diversity* 2013; 17(1): 111-122
4. De Lau LM, Breteler MM: Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurology* 2006; 5(6): 525-535
5. Trošt M: Parkinsonova bolezen. *Farmaceutski vestnik* 2008; 59(2): 60-63
6. https://www.researchgate.net/publication/282812862_New_insight_into_the_therapeutic_role_of_the_serotonergic_system_in_Parkinson's_disease (dostopano 17.4.2018)
7. Dexter DT, Jenner P: Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radical Biology & Medicine* 2013; 62: 132-144
8. Jenner P, Olanow CW: Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology* 1996; 47(6): 161-170
9. Qi Z, Miller GW, Voit EO: Computational Systems Analysis of Dopamine metabolism. *PLoS One* 2008; 3(6): e2444
10. <https://basicmedicalkey.com/parkinsons-disease-4/> (dostopano 19.4.2018)
11. Kalia LV, Kalia SK: α -Synuclein and Lewy pathology in Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurology* 2015; 28(4): 375-381
12. Kalia LV, Lang AE: Parkinson's Disease. *Lancet* 2015; 386(9996): 896-912
13. Alafuzoff I, Parkkinen L: Staged pathology in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders* 2014; 20(1): 57-61
14. Gaweska H, Fitzpatrick PF: Structures and mechanism of monoamine oxidase family: Monoamine oxidases A and B. *BioMolecular Concepts* 2011; 2(5): 365-377
15. Binda C, Mattevi A, Edmondson DE: Structural properties of human monoamine oxidases A and B. *International Review of Neurobiology* 2011; 100: 1-11
16. Lemke TL, Williams DA, Roche WF, Zito SW: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 6. izdaja, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2008: 588 - 591

17. Thorpe LW, Westlund KN, Kochersperger LM, Abell CW, Denney RM: Immunocytochemical localization of monoamine oxidases A and B in human peripheral tissues and brain. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1987; 35(1): 23-32
18. <https://www.ki.si/odseki/d01-teoreticni-odsek/laboratorij-za-racunsko-biokemijo-in-nacrtovanje-ucinkovin/dejavnosti/parkinsonova-bolezen-in-mao/> (dostopano 1.5.2018)
19. https://www.researchgate.net/publication/285263300_Non-P450_Mediated_Oxidative_Metabolism_of_Xenobiotics?sg=iEy4kjGoXuJ-cqhMgbFBwbZT-JT9tFhJYN3RGKETaRRuHMwoHU8cPHm8C6_TR_fuQYv8KSbEw (dostopano 4.5.2018)
20. Yamada M, Yasuhara H: Clinical Pharmacology of MAO Inhibitors: safety and future. *Neurotoxicology* 2004; 25(1-2): 215-221
21. Tong J, Rathitharan G, Meyer JH, Furukawa Y, Ang LC, Boileau I, Guttman M, Hornykiewicz O, Kish SJ: Brain monoamine oxidase B and A in human parkinsonian dopamine deficiency disorders. *Brain: A Journal of Neurology* 2017; 140(9): 2460-2474
22. Youdim MB, Bakhle YS: Monoamine oxidase isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. *British Journal of Pharmacology* 2006; 147(1): 287-296
23. Finberg JP, Gillman K: Selective inhibitors of monoamine oxidase type B and the »cheese effect«. *International Review of Neurobiology* 2011; 100: 169-190
24. Kojc P: Sinteza in vrednotenje potencialnih zaviralcev monoamin oksidaze tipa A in B z 1-propargilazetidinskim in 4-stiril-1-propargilpiperidinskim osnovnim skeletom. Magistrska naloga. Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani, 2017
25. Finberg JP, Rabey JM: Inhibitors of MAO-A and MAO-B in Psychiatry and Neurology. *Frontiers in Pharmacology* 2016; 7(340): 1-15
26. Huremović D: Načrtovanje in sinteza derivatov N-propargilpiperidina kot potencialnih zaviralcev monoaminooksidaze tipa B in butirilholinesteraze. Magistrska naloga. Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani, 2016
27. Szökő E, Tábi T, Riederer P, Vecsei L, Magyar K: Pharmacological aspects of the neuroprotective effects of irreversible MAO-B inhibitors, selegiline and rasagiline,

- in Parkinson's disease. Journal of Neural Transmission 2018.
<https://doi.org/10.1007/s00702-018-1853-9>
28. Dolšak A: Načrtovanje, sinteza in vrednotenje zaviralcev monoamin oksidaz A in B na osnovi 1-(prop-2-in-1-il)piperidina. Magistrska naloga. Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani, 2017
29. Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, Pečar S: Farmaceutvska kemija III: Vaje in seminarji. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2010: 1-10
30. http://pubs.acs.org/subscribe/journals/ci/30/i12/html/12georg_box.html (dostopano 23.5.2018)
31. [https://www.bachem.com/fileadmin/user_upload/pdf/Monographs/Coupling Reagents.pdf](https://www.bachem.com/fileadmin/user_upload/pdf/Monographs/Coupling_Reagents.pdf) (dostopano 24.5.2018)
32. Bruckner R: Organic Mechanisms; Reactions, Stereochemistry and Synthesis, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010; 3. izdaja: 797-800
33. www.wikipremed.com/03_organicmechanisms.php?mch_code=030208_050 (dostopano 24.5.2018)
34. Byrne PA, Gilheany DG: The modern interpretation of the Wittig reaction mechanism. Chemical Society Reviews 2013; 42(16): 6670-6696
35. <https://www.masterorganicchemistry.com/2018/02/06/wittig-reaction/> (dostopano 25.5.2018)
36. Laizure SC, Herring V, Hu Z, Witbrodt K, Parker RB: The role of human carboxylesterases in drug metabolism: have we overlooked their importance?. Pharmacotherapy 2013; 33(2): 210-222
37. Lešnik S, Škrlj B, Eržen N, Bren U, Gobec S, Konc J, Janežič D: BoBER: web interface to the base of bioisosterically exchangeable replacements. Journal of Cheminformatics 2017; 9(1): 62