

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA HORVAT

MAGISTRSKO DELO

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJE

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



ANJA HORVAT

**OPTIMIZACIJA SINTEZE CIANACETAMIDNIH IN AKRILAMIDNIH
ZAVIRALCEV TREONINSKIH PROTEAZ**

**OPTIMISATION OF SYNTHESIS OF CYANACETAMIDE AND
ACRYLAMIDE THREONINE PROTEASIS INHIBITORS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJE

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Aleša Obreze, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Marka Jukiča, mag. farm. Vse eksperimente, ki smo jih opravili med raziskovanjem, smo izvedli na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko kemijo. Vso potrebno analitiko smo opravili na Fakulteti za farmacijo. Pod analitske metode spadajo ^1H NMR, IR, MS, ^{13}C NMR ter določanje tališča.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Alešu Obrezi, mag. farm., in somentorju asist. dr. Marku Jukiču, mag. farm., za vso pomoč in napotke pri delu v laboratoriju in za ostale izkušnje, ki sem jih pridobila tekom dela na fakulteti.

Zahvala tudi ostalim zaposlenim na fakulteti, ki so mi vedno priskočili na pomoč, ko sem jo rabila.

Posebna zahvala je namenjena mojim najbližjim, ki so mi v času študija stali ob strani.

Izjava

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

Anja Horvat

Predsednica magistrske komisije: prof. dr. Marija Bogataj, mag. farm.

Članica magistrske komisije: izr. prof. Nina Kočever Glavač, mag. farm.

Ljubljana, 2018

VSEBINA

1. UVOD	10
1.1 PROTEAZE	10
1.1.1 Ubikvitin-proteasomski sistem.....	10
1.2 PROTEASOM	11
1.3 IMUNOPROTEASOM	13
1.4 ZAVIRALCI PROTEASOMA IN IMUNOPROTEASOMA.....	14
1.4.1 Mehanizem zaviranja proteasoma in imunoproteasoma.....	16
1.4.2 »Elektrofilne bojne glave«	18
1.4.2.1 Aldehidi.....	18
1.4.2.2 Vinil sulfoni.....	18
1.4.2.3 Vinil amidi (N-vinilacetamidi).....	19
1.4.2.4 Boronati.....	20
1.4.2.5 α' , β' -epoksiketoni in α -ketoaldehidi.....	20
1.4.2.6 β -laktoni.....	22
1.4.3 Selektivni zaviralci imunoproteasoma.....	22
2. NAČRT DELA	25
3. MATERIALI IN METODE	27
3.1 MATERIALI	27
3.2 METODE	27
4. EKSPERIMENTALNO DELO	30
4.1 SINTEZA 1-(4-BROMOBENZIL)PIPERIDIN-4-KARBOKSAMIDA (1) IN 1-(4-BROMOBENZIL)PIPERIDIN-3-KARBOKSAMIDA (2).....	30
4.2 SINTEZA 1-([1,1'-BIFENIL]-4-ILMETIL)PIPERIDIN-3-KARBOKSAMIDA (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9).....	32
4.3 SINTEZA 1-((6-BROMOPIRIDIN-3-IL)METIL)PIPERIDIN-3-KARBOKSAMIDA (10).....	38
4.4 SINTEZA 1-((6-FENILPIRIDIN-3-IL)METIL)PIPERIDIN-3-KARBOKSAMIDA (11).....	39
4.5 SINTEZA 1-((6-FENILPIRIDIN-3-IL)METIL)PIPERIDIN-3-KARBOKSAMIDA (12).....	40
4.6 SINTEZA 1-([1,1'-BIFENIL]-4-KARBONIL)PIPERIDIN-4-KARBOKSAMIDA (13)	41
4.7 SINTEZA 1-([1,1'-BIFENIL]-4-ILMETIL)PIPERIDIN-4-IL)METANAMINA (14)	42
4.8 SINTEZA N-((1-([1,1'-BIFENIL]-4-ILMETIL)PIPERIDIN-4-IL)METIL)-2-CIANOACETAMIDA (15).....	43
4.9 SINTEZA N-((1-([1,1'-BIFENIL]-4-ILMETIL)PIPERIDIN-4-IL)METIL)AKRILAMIDA (16).....	44
4.10 SINTEZA 1-(5-FENILNIKOTINOL)PIPERIDINE-4-KARBOKSAMIDA (17)	46
4.11 SINTEZA (4-(AMINOMETIL)PIPERIDIN-1-IL)(5-FENILPIRIDIN-3-IL)METANONA (18)	47
4.12 SINTEZA (1-(4-BROMOBENZIL)PIPERIDIN-4-IL)METANAMINA (19)	48
4.13 SINTEZA (1-((6-BROMOPIRIDIN-3-IL)METIL)PIPERIDIN-3-IL)METANAMINA (20)	49
4.14 SINTEZA N-((1-((6-BROMOPIRIDIN-3-IL)METIL)PIPERIDIN-3-IL)METIL)AKRILAMIDA (21).....	50
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	52
5.1 ALKILIRANJE	52
5.2 SUZUKIJEVA REAKCIJA	53
5.3 REDUKTIVNO AMINIRANJE ALDEHIDA	55
5.4 SCHOTTEN – BAUMANNOVA REAKCIJA	55
5.5 REDUKCIJA AMIDA.....	56
5.6 COUPLING REAKCIJE	56
6. SKLEP	58
7. LITERATURA	59

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz ubikvitin-proteasomskega sistema (prirejeno po (4))	11
Slika 2: 3D prikaz proteasoma s pripadajočimi α in β podenotami (prirejeno po (3))	12
Slika 3: Regulatorji 20S proteasoma, ki se lahko vežejo na α podenoti (prirejeno po (3))	12
Slika 4: 3D prikaz proteasoma in imunoproteasoma (prirejeno po (3))	13
Slika 5: Slikovni prikaz kako konstitutivni proteasom razgradi epitop, ki je prepoznaven za CD8+ T celice, imunoproteasom pa ga ohrani (prirejeno po (11))	14
Slika 6: Prikaz mehanizma zaviranja proteasoma (prirejeno po (4))	16
Slika 7: Sferična kvarтерна struktura iCP s prikazanim mestom kjer poteka cepitev proteinov. Slednje se nahaja med dvema β obročema. Proteolitsko aktivne podenote β so označene s krepko pisavo. (prirejeno po (18))	17
Slika 8: Vezavna mesta v β podenotah proteasoma S in S' ter pripadajoče stranske verige P in P' (prirejeno po (18))	17
Slika 9: Strukturna formula peptida z aldehidno funkcionalno skupino (prirejeno po (4))	18
Slika 10: Strukturna formula peptida z vinil sulfonsko funkcionalno skupino (prirejeno po (4))	19
Slika 11: Strukturna formula Siringolina A (prirejeno po (21))	19
Slika 12: Strukturna formula bortezomiba (prirejeno po (14))	20
Slika 13: Strukturna formula karfilzomiba (prirejeno po (14))	21
Slika 14: Strukturna formula oprozomiba (prirejeno po (14))	21
Slika 15: Strukturna formula marizomiba (prirejeno po (14))	22
Slika 16: Strukturna formula ONX 0914 (prirejeno po (14))	23
Slika 17: Strukturna formula PR-924 (prirejeno po (14))	23
Slika 18: Strukturna formula UK-101 (prirejeno po (14))	24
Slika 19: Strukturna formula IPSI-001 (prirejeno po (14))	24
Slika 20: Načrt sinteznih postopkov za eksperimentalni del magistrske naloge	26
Slika 21: Reakcijska shema sinteze 1-(4-bromobenzil)piperidin-4-karboksamida (1)	30
Slika 22: Reakcijska shema sinteze 1-(4-bromobenzil)piperidin-3-karboksamida (2)	30
Slika 23: Reakcijska shema sinteze 1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-3-karboksamida (3)	32
Slika 24: Reakcijska shema sinteze 1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-3-karboksamida (4)	33
Slika 25: Reakcijska shema sinteze 1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-3-karboksamida (5)	33
Slika 26: Reakcijska shema sinteze 1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-3-karboksamida (6)	34
Slika 27: Reakcijska shema sinteze 1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-3-karboksamida (7)	35
Slika 28: Reakcijska shema sinteze 1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-3-karboksamida (8)	36
Slika 29: Reakcijska shema sinteze 1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-3-karboksamida (9)	37
Slika 30: Reakcijska shema sinteze 1-((6-bromopiridin-3-il)metil)piperidin-3-karboksamida (10)	38
Slika 31: Reakcijska shema sinteze 1-((6-fenilpiridin-3-il)metil)piperidin-3-karboksamida (11)	39
Slika 32: Reakcijska shema sinteze 1-((6-fenilpiridin-3-il)metil)piperidin-3-karboksamida (12)	40
Slika 33: Reakcijska shema sinteze 1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-4-karboksamida (13)	41
Slika 34: Reakcijska shema sinteze 1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-4-il)metanamina (14)	42
Slika 35: Reakcijska shema sinteze N-((1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-4-il)metil)-2-cianoacetamida (15)	43
Slika 36: Reakcijska shema sinteze N-((1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-4-il)metil)akrilamida (16)	44
Slika 37: Reakcijska shema sinteze 1-(5-fenilnikotinol)piperidine-4-karboksamida (17)	46
Slika 38: Reakcijska shema sinteze 4-(aminometil)piperidin-1-il)(5-fenilpiridin-3-il)metanona (18)	47
Slika 39: Reakcijska shema sinteze 1-(4-bromobenzil)piperidin-4-il)metanamina (19)	48
Slika 40: Reakcijska shema sinteze 1-((6-bromopiridin-3-il)metil)piperidin-3-il)metanamina (20)	49
Slika 41: Reakcijska shema sinteze N-((1-((6-bromopiridin-3-il)metil)piperidin-3-il)metil)akrilamida (21)	50

POVZETEK

Med sintezo proteinov se pogosto zgodi, da se le ti ne tvorijo pravilno, bodisi se napačno zvijejo, vsebujejo nepravilno zaporedje aminokislin ali pa se napačno povežejo. Taki proteini se nato kopičijo v celicah v agregatih, npr. amiloidnih plakih. Poškodovane proteine lahko imunski sistem prepozna kot antigene, lahko pa so tudi vzrok za nevrodegenerativne in avtoimune bolezni. V telesu zato ves čas poteka razgradnja proteinov, katalizirana z encimi, ki jih imenujemo proteaze. Mednje sodita tudi proteasom in imunoproteasom. Slednji se pogosteje izraža v celicah imunskega sistema. Odgovoren je za predstavitev antigenov molekulam razreda I, ki tvorijo kompleks tkivne skladnosti. Ta kompleks prepozna antigene citosolnih proteinov in jih naprej predstavijo limfocitom T. Povišane vrednosti imunoproteasoma so povezane s patogenezo vnetnih bolezni, nevrodegenerativnih in avtoimunih bolezni ter z nekaterimi oblikami raka.

Naš namen je bil sintetizirati spojine za peroralno aplikacijo z osnovnim nipekotinskim skeletom in elektrofilno skupino, ki bi se selektivno vezala v aktivno mesto podenote $\beta 5i$ humanega imunoproteasoma. Kot elektrofil smo izbrali cianacetamidno in akrilamidno skupino. Zaradi slabih izkoristkov pri nekaterih reakcijah smo se osredotočili na optimizacijo reakcijskih postopkov za pripravo končnih spojin. Najdlje smo se ukvarjali z vezavo biarilnih derivatov na sekundarno aminske skupino piperidina. Z alkiliranjem nismo imeli večjih težav, prav tako z aciliranjem in reduktivnim aminiranjem. Problematično je bilo pripenjanje dodatnega arilnega obroča, kjer bi z uporabo Suzukijeve reakcije lahko pripravili nabor številnih strukturno različnih derivatov za študijo odnosa med strukturo in delovanjem. Uspelo nam je pripraviti manjše količine produktov, ki pa so premajhne za uspešno večstopenjsko sintezo.

Vse produkte reakcij smo očistili s kromatografskimi metodami (tankoplastna in kolonska kromatografija) in strukturo potrdili s spektroskopskimi (masna spektrometrija, jedrska magnetna resonanca, infrardeča spektroskopija) metodami. Uspešno smo sintetizirali tri končne spojine, ki bi lahko kovalentno zavirale imunoproteasom. V prihodnosti jih bodo biokemijsko ovrednotili na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

ABSTRACT

During the synthesis of proteins, it often happens that they do not form properly, either they twist wrongly, contain an incorrect amino acid sequence, or they malfunction because of incorrect connections. Such proteins are then accumulated in cells in aggregates, e.g. amyloid plaques. Damaged proteins are recognized by the immune system as an antigen, or may be the cause of neurodegenerative and autoimmune diseases. Therefore, the body's degradation of proteins, catalyzed by enzymes called proteases, is ongoing. Proteases also include proteasome and immunoproteasome. The latter is more often expressed in cells of the immune system. It is responsible for the presentation of antigens to class I molecules that form a major histocompatibility complex. This complex recognizes the antigens of cytosolic proteins and presents them to T lymphocyte. Elevated immunoproteasome values are associated with the pathogenesis of inflammatory, neurodegenerative and autoimmune diseases, and some forms of cancer.

Our intention was to synthesize compounds for oral administration with basic nipecotamide skeleton and an electrophilic group that would selectively bind to the active site of the $\beta 5i$ subunit of human immunoproteasome. The cyanacetamide and acrylamide groups were chosen as electrophiles. Due to poor efficiency in some reactions, we focused on the optimization of the reaction processes for preparing the final compounds. Mostly we focused on the introduction of biaryl derivatives on secondary amino group of piperidine. Alkylation, acylation and reductive amination did not present major obstacles, however the coupling of another aromatic ring was highly problematic. With the use of Suzuki reaction we would be able to obtain several derivatives, interesting for study of SAR, unfortunately most of reactions were not successful and we isolated only small amount of products that did not suffice for multistep synthesis of final compounds.

All the products of the reactions were purified by chromatographic methods (thin layer chromatography and column chromatography) and the structure was confirmed by spectroscopic methods (mass spectrometry, nuclear magnetic resonance and infrared spectroscopy). We successfully synthesized three final compounds that could covalently inhibit immunoproteasome. To confirm their effectiveness, the compounds will be biochemically evaluated at the Faculty of pharmacy in Ljubljana.

KLJUČNE BESEDE

Treoninske proteaze, proteasom, imunoproteasom, selektivni zaviralci imunoproteasoma, optimizacija sinteze

SEZNAM OKRAJŠAV

ATP – adenzotriposfat

CP – konstitutivni proteasom

CDCl_3 – devteriran kloroform

CH_2Cl_2 – diklorometan

d – dublet (jedrska magnetna resonanca)

DMF – dimetilformamid

DMSO- d_6 – dimetilsulfoksid

EDC – sodeluje pri tvorbi amidne vezi med karboksilno kislino in aminom

ER – endoplazemski retikulum

Et_3N – trietilamin

EtOAc – etil acetat

E1 – ubikvitin-aktivirajoči encim

E2 – ubikvitin-konjugirajoči sistem

E3 – ubikvitin ligaza

Hex – heksan

HOBT – sodeluje pri tvorbi amidne vezi med karboksilno kislino in aminom

iCP – imunoproteasom

IFN- γ – interferon gama

IL – interlevkin

IR – infrardeča spektroskopija

K_2CO_3 – kalijev karbonat

kDA – kilodaltoni; mera za ovrednotenje velikosti večjih molekul kot so proteini

KKR – kolonska kromatografija

LiAlH_4 – litijev aluminijev hidrid, reducent

m – multiplet (jedrska magnetna resonanca)

MeOH – metanol

Mf – mobilna faza

MHC – poglavitni kompleks tkivne skladnosti (ang: major histocompatibility complex); v imunskem sistemu imajo te celice vlogo prepoznavanja in predstavitve tujih antigenov limfocitom T, ki nato sprožijo primeren imunski odziv

MS – masna spektrometrija

NaCl – natrijev klorid

Na₂CO₃ – natrijev karbonat

Na₂SO₄ – natrijev sulfat, sušilno sredstvo

Na(OAc)₃BH – natrijev triacetoksi borhidrid, reducent

NF-κB – jedrni dejavnik kapa B

NMM – N-metilmorfolin

NMR – jedrska magnetna resonanca

p53 – tumorje zaviralni protein

q – kvartet (jedrska magnetna resonanca)

Rf – retencijski faktor

s – singlet (jedrska magnetna resonanca)

t – triplet (jedrska magnetna resonanca)

TBTU – sodeluje pri tvorbi amidne vezi med karboksilno kislino in aminom

THF – tetrahidrofuran

Thr1 – treoninski ostanek

TLC – tankoplastna kromatografija

TMS – tetrametilsilan

TNF-α – dejavnik tumorske nekroze alfa

UPS – ubikvitin-proteasomski sistem

UV – ultravijolična svetloba

λ – valovna dolžina

J – sklopitvena konstanta

δ – kemijski premik (jedrska magnetna resonanca)

η – izkoristek reakcije

1. UVOD

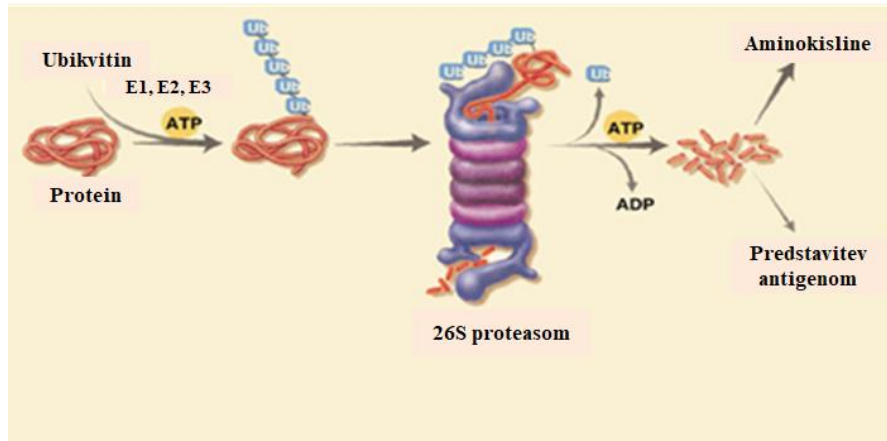
1.1 Proteaze

Proteoliza je skupno ime za biokemijske reakcije hidrolize peptidne vezi, ki jih katalizirajo proteaze. Glede na fizikalno-kemijske lastnosti ključne aminokislina v aktivnem mestu proteaze in glede na mehanizem cepitve peptidne vezi lahko proteaze razdelimo v šest različnih skupin: cisteinske, serinske, treoninske, glutaminske, aspartatne in metaloproteaze. V prisotnosti vode cepijo peptidno vez aspartatne, metalo in glutaminske proteaze. Pri ostalih treh poteka cepitev peptidne vezi preko aktivacije histidinskih ostankov v molekuli proteaze. V zdravih celicah so proteaze nujno potrebne, saj izvajajo in regulirajo esencialne celične procese; kot so na primer genska ekspresija, diferenciacija celic in celična smrt (1). Proteaze so vpletene tudi pri nekaterih patofizioloških procesih v telesu, na primer pri hipertenziji, avtoimunskih in vnetnih boleznih, motnjah strjevanja krvi, HIV in drugih virusnih obolenjih, bakterijskih in parazitskih infekcijah ter raku (2).

1.1.1 Ubikvitin-proteasomski sistem

Je glavni proteolitski sistem v vseh evkariontskih celicah. Proteolitske reakcije potekajo v medceličnici in jedru evkariontskih celic v proteasomu 26S (3). Ubikvitin-proteasomski sistem (UPS) ima tako pozitivne kot negativne učinke v telesu. Med pozitivne učinke spada to, da je odgovoren za razgradnjo večine celičnih proteinov in za regulacijo številnih celičnih mehanizmov. Sodeluje zlasti pri odstranjevanju poškodovanih, mutiranih in napačno zvitih celičnih proteinov in ima pomembno vlogo pri uravnavanju imunskega odziva (4). Takšnih je v telesu približno ena tretjina in so pogosto vzrok genetskim boleznim, kot je na primer cistična fibroza (5). Med negativne učinke spada na primer povečana razgradnja tumor supresorskega dejavnika p53, kar lahko vodi do kancerogeneze. Razgradnja proteinov z UPS se začne s kovalentno vezavo več molekul ubikvitina, ki je sestavljen iz 76 aminokislin, na protein. Pri tem se tvori amidna vez, ki jo imenujemo tudi izopeptidna vez, med C-koncem na ubikvitinu in amino skupino na lizinskih ostankih akceptorskih proteinov (6). Ubikvitin je sorazmerno majhen protein, velik 8 kDa (4). Pripenjanje ubikvitina katalizirajo trije encimi E1, E2 in E3 (slika 1). Encim E1 je ubikvitin-aktivirajoči encim, ki s pomočjo energije v obliki ATP omogoči tvorbo energijsko bogate tioesterske vezi med končno karboksilno skupino ubikvitina in cisteinskim ostankom E1. E1 nato prenese ubikvitin do aktivnega mesta

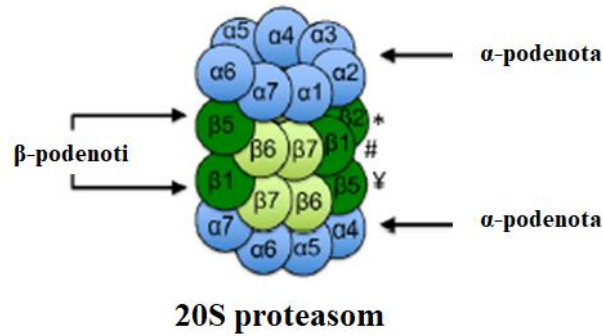
naslednjega encima v kaskadi, ubikvitin-konjugacijskega encima E2, z reakcijo transesterifikacije. Naprej poteka reakcija s pomočjo encima ubikvitin ligaze E3, ki poveže ubikvitin z lizinskimi stranskimi verigami proteina, določnega za razgradnjo (7). Tako nastali protein, označen z ubikvitinsko verigo, potuje do proteasoma 26S, ki ga prepozna, in nato do sredice 20S, kjer se razgradi. Pri tej razgradnji se sprošča ADP. Za razgradnjo ostankov proteina do aminokislin in pri predstavitvi peptidov antigenom se porablja energija ATP (4).



Slika 1: Prikaz ubikvitin-proteasomskega sistema (prirejeno po (4))

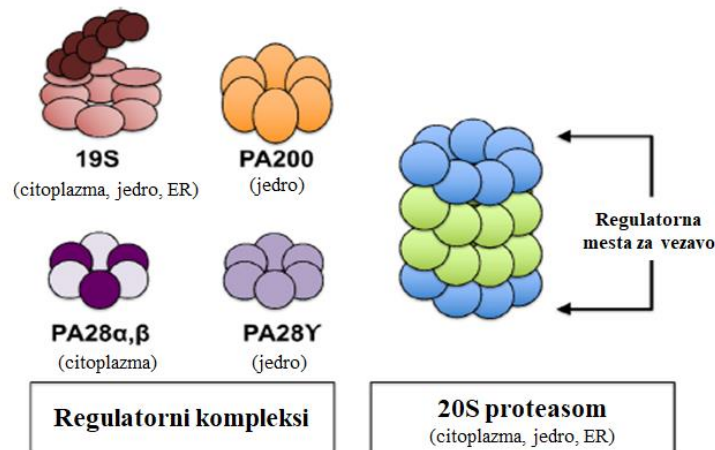
1.2 Proteasom

Proteasom je v citoplazmi in jedru skoraj vseh živih celic in je odgovoren za razgradnjo večine plazemskih proteinov v evkariontskih celicah (8). Evkariontski proteasom 26S sestoji iz dveh regulatornih delov 19S in katalitske sredice 20S. Proteasomska razgradnja proteinov poteka na dva načina, in sicer od ubikvitina odvisna razgradnja s proteasomom 26S in od ubikvitina neodvisna razgradnja s proteasomom 20S. 20S je latentna oblika, dokler ne veže regulatornih podenot 19S, kar vodi do nastanka katalitsko aktivnega proteasoma 26S. Proteasom 20S predstavlja največji delež vseh proteasomskih sistemov in vključuje okrog 1 % vseh celičnih proteinov. Proteasom 20S je lahko neposredno pritrjen na različne celične organele, predvsem na endoplazemski retikulum (ER), kjer razgrajuje substrate, vezane na njegovo membrano. Proteasom velikosti 700 kDa je sestavljen iz štirih obročev, ki so zloženi v obliko soda. Obroči so dveh vrst, zunanjo imenujemo α , notranjo, ki je katalitična, pa β . Oba obroča sestojita iz sedmih podenot (slika 2).



Slika 2: 3D prikaz proteasoma s pripadajočimi podenotami α in β (prirejeno po (3))

Podenote $\beta 1$, $\beta 2$ in $\beta 5$ v β obročih tvorijo 6 proteolitičnih mest, ki so sestavljena iz tripsinu podobnih, kimotripsinu podobnih in kaspazam podobnim hidrolizirajočim mestom, ki jih lahko zaviramo na različne načine. Vloga zunanjih obročev α je, da omogočajo povezavo proteasoma 20S z različnimi regulatornimi kompleksi (slika 3) in da nadzirajo prehajanje substratov v katalitično votlino (3).

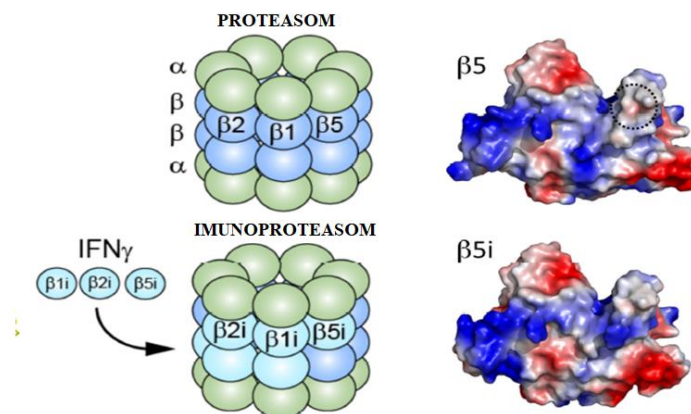


Slika 3: Regulatorji 20S proteasoma, ki se lahko vežejo na α podenote (prirejeno po (3))

Vezava substrata na obroč α povzroči konformacijsko spremembo, ki traja še nekaj časa po tem, ko je substrat že prešel v notranjost. Da pride do razgradnje proteinov, morata biti zunanja obroča α odprta in tako omogočati vstop proteinom do katalitičnega območja β . Proteasom je sterično zelo prilagodljiva struktura in lahko v prisotnosti različnih spojin spreminja svojo strukturo. Na primer, v prisotnosti hidrofobnih substratov, kot so oksidativno poškodovani proteini, se odpre obroč α , kar poveča hitrost razgradnje proteinov (3).

1.3 Imunoproteasom

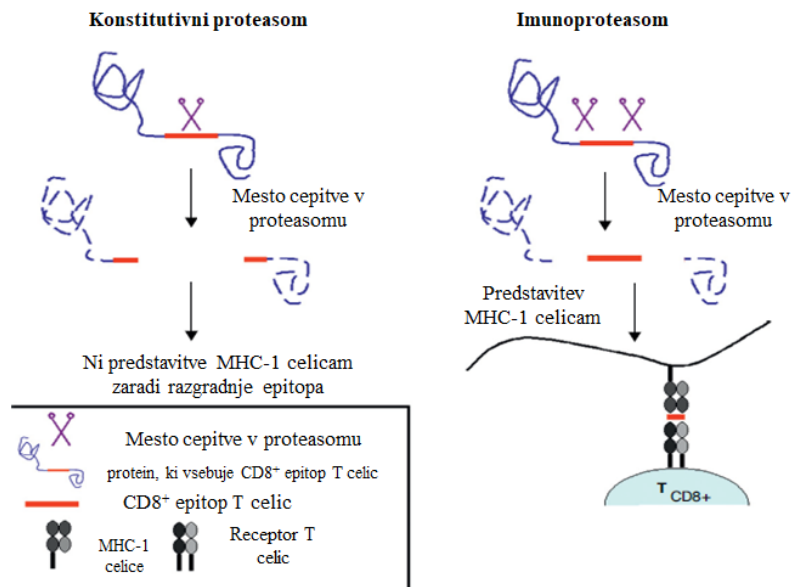
Imunoproteasom je tkivno specifična struktura, saj se izraža v celicah imunskega sistema, kot so limfociti T in B, monociti, makrofagi, dendritične celice ali epiteljske celice priželjca (9, 10). Nastane po stimulaciji konstitutivnega proteasoma s provnetnim citokinom interferonom γ (IFN- γ) ali z dejavnikom tumorske nekroze alfa (TNF- α). Takrat se imunoproteasom izraža tudi v celicah, ki niso hematopoetskega izvora. Nove študije so dokazale, da je imunoproteasom vključen v patogenezo vnetnih bolezni (3) in ima pomembno vlogo pri proizvodnji peptidov, ki naprej sodelujejo pri predstavitvi antigenom (9). Po pretvorbi konstitutivnega proteasoma v imunoproteasom se vsa tri mesta, ki vsebujejo aktivne podenote, nadomestijo z ustreznimi homolognimi podenotami: $\beta 1i$, $\beta 2i$ in $\beta 5i$ (slika 4).



Slika 4: 3D prikaz proteasoma in imunoproteasoma (prirejeno po (3))

Pri tem pride do strukturnih sprememb v aktivnih mestih homolognih podenot, kar spremeni način cepitve amidne vezi, s čimer se spremenita struktura in količina nastalih peptidov za predstavitev molekulam MHC razreda I. Slednjega sestavljajo molekule poglavitnega kompleksa tkivne skladnosti razreda I in kratki peptidi, katerih glavna naloga je signaliziranje celicam limfocitov T CD8⁺ (11). Kakršnekoli spremembe v izražanju MHC celic razreda I se lahko odražajo pri spremembi razvoja tumorskih celic. Do tega pride zato, ker je naloga antigenov MHC poleg predstavitve drugih antigenov limfocitom T tudi regulacija celičnih funkcij naravnih celic ubijalk (12). Glavne funkcije limfocitov T so premagovanje okužb preko aktivacije drugih celic, kot so makrofagi in limfociti B. Imunoproteasom poveča obseg in raznolikost ligandov razreda I. Razlaga za to je, da je vezavno mesto $\beta 1$ obkroženo s hidrofobnimi aminokislinami, ki povečajo nastanek epitopov MHC razreda I s končnimi

majhnimi nepolarnimi ostanki. Z $\beta 5i$ posredovana hidroliza peptidne vezi je, glede na kinetiko, prednostna, saj je hidrofilitnost aktivnega mesta povečana in prisotnih je tudi več vodikovih vezi. Imunoproteasom cepi proteine na tak način, da ohrani epitop, ki ga prepoznajo MHC celice razreda I (slika 5). S tem omogoči, da pride do predstavitve proteinov T celicam in dalje do primernega imunskega odziva (13, 10).



Slika 5: Slikovni prikaz, kako konstitutivni proteasom razgradi epitop, ki je prepoznaven za CD8⁺ T celice, imunoproteasom pa ga ohrani (prirejeno po (11))

Med temi ima podenota $\beta 5i$ najbolj hidrofilno okolico za aktivno mesto treonina in tvori specifične vodikove vezi, ki stabilizirajo tetraedrično geometrijo med potekom katalize. Kinetika procesa tako favorizira peptidolitično aktivnost podenote $\beta 5i$ (9).

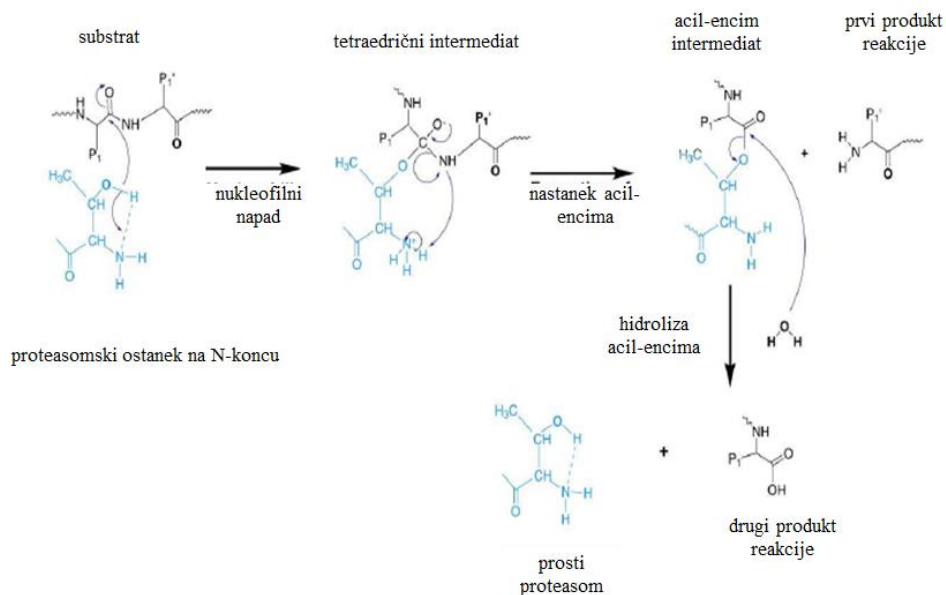
1.4 Zaviralci proteasoma in imunoproteasoma

Zaviranje delovanja konstitutivnega proteasoma se kaže kot akumulacija napačno zviti proteinov in reaktivnih kisikovih zvrsti, kar povzroči ustrezen odgovor celice oziroma organizma. Zaviranje proteasoma in imunoproteasoma ima na telo tako pozitivne kot tudi negativne učinke. Med pozitivne učinke prištevamo preprečitev razgradnje tumor supresorskih proteinov, kot je na primer zaviralec ciklin-kinaze p27, in zmanjšanje dejavnosti

provnetnih poti v telesu, na primer proteinskega kompleksa κ B, ki sodeluje pri imunskem odgovoru. Posledično pride do akumulacije proapoptičnih dejavnikov, kar je negativen učinek in se kaže v zavrtju celičnega cikla in apoptozi (14). Zdravilni učinkovini bortezomib in karfilzomib, delujeta na katalitsko aktivno podenoto β 5 konstitutivnega in imunoproteasoma. Najpomembnejši negativen učinek je citotoksičnost, ki je posledica zaviranja obeh oblik proteasoma in je glavna omejitev pri klinični uporabi tovrstnih zaviralcev širokega spektra. Pri večini zaviralcev je še dodatna težava, saj so mnoge spojine zelo podobne peptidom, kar pomeni, da so metabolno nestabilne in imajo omejeno biološko uporabnost. Da bi se izognili tovrstnim oviram, so se raziskovalci lotili drugačnih poti načrtovanja novih učinkovin: izdelava reverzibilnih zaviralcev proteasoma, izdelali so visoko selektivne in hidrokatalitsko bolj stabilne peptidne strukture, visoko selektivne nepeptidne strukture in selektivne elektrofilne »bojne glave«. Večina teh struktur je značilnih za ireverzibilne kovalentne zaviralce, ki vsebujejo elektrofilni del, ki je sposoben reagirati z N-končnim delom treoninskega ostanka v aktivnem mestu preiskovane proteaze (2). Med pozitivne učinke še prištevamo rezultate študij, ki potrjujejo, da zaviranje proteasoma pomaga pri terapiji bolnikov z rakom. Rakave celice se delijo hitreje kot zdrave in so tudi bolj dovzetne za zaviranje konstitutivnega proteasoma, ker poteka njihov celični cikel hitreje kot pri zdravih celicah. Zaviranje proteasoma tako pri rakavih celicah povzroči smrt, pri zdravih celicah pa ne, saj tolerirajo tovrsten stres (14). Medtem ko so povišane koncentracije konstitutivnega proteasoma značilne za tumorske celice, so bile povišane koncentracije imunoproteasoma povezane z razvojem in napredovanjem nevrodegenerativnih in avtoimunih bolezni ter z nekaterimi oblikami raka. S povišano koncentracijo provnetnih citokinov in povišano aktivnostjo imunoproteasoma naj bi bile povezane Alzheimerjeva bolezen, Huntingtonova bolezen in makularna degeneracija. Povišane vrednosti iCP so zaznali tudi pri rakavih boleznih na pljučih, prostati in črevesju, fibrosarkomu in multiplem mielomu (14, 15). Pri boleznih, kot so revmatoidni artritis, miofibrilarna miopatija, amiotrofična lateralna skleroza in chronova bolezen, so opazili povišane le vrednosti podenote β 1i. Ugotovili so, da delujejo zaviralci proteasoma v nizkih koncentracijah nevroprotektivno. Zmožnost nevroprotektivnega delovanja je posledica aktivacije transkripcijskega dejavnika NF- κ B. Dokazano je, da dejavnik NF- κ B zaščiti nevronske celice med zdravljenjem z zaviralci proteasoma (16).

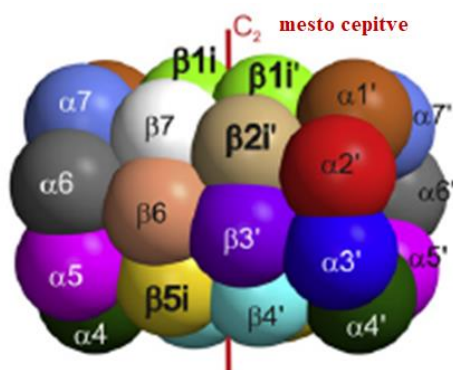
1.4.1 Mehanizem zaviranja proteasoma in imunoproteasoma

Treonin v aktivnem mestu proteasoma, ki ima vlogo nukleofila, napade karbonilni C-atom v peptidni vezi substrata. To privede do nastanka intermediata acil-encim in peptidnega fragmenta, ki ima novo nastali N-konec. Sledi hidroliza intermediata s pomočjo vode, ki deluje kot nukleofil. Ta povzroči obnavljanje aktivnega mesta in zaključi reakcijo s sproščanjem karboksilne kisline (slika 6) (4).



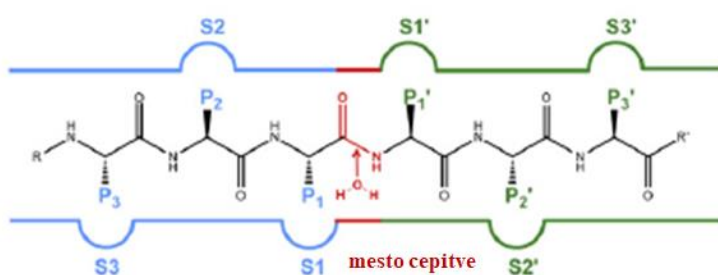
Slika 6: Prikaz mehanizma zaviranja proteasoma (prirejeno po (4))

Ker je način delovanja farmakoforov enak za vse podenote proteasoma, ne glede na vrsto proteasoma, lahko selektivnost peptidomimetikov za posamezne podenote dosežemo z modifikacijo njihovih stranskih verig (14). Proteolitsko aktivnost v proteasomu imajo podenote β_1 , β_2 in β_5 . Podenota β_1 je po načinu delovanja podobna kaspazam in razgrajuje vezi kislih ostankov, podenota β_2 je podobna tripsinu in razgrajuje vezi bazičnih ostankov, podenota β_5 pa ima kimotripsinu podobno delovanje in razgrajuje nevtralne hidrofobne ostanke (17). Ker sta v jedru proteasoma dva obroča β , vsebuje proteasom šest proteolitsko aktivnih mest (slika 7) (18).



Slika 7: Sferična kvarтерна struktura iCP s prikazanim mestom kjer poteka cepitev proteinov. Slednje se nahaja med dvema β obročema. Proteolitsko aktivne podenote β so označene s krepko pisavo. (prirejeno po (18))

Vsaka podenota ($\beta 1$, $\beta 2$ in $\beta 5$) vsebuje zanj značilna vezavna mesta S1, S2 in S3. Glede na vezavna mesta se podobno označijo tudi stranske verige proteina, označenega za razgradnjo P1, P2 in P3 (slika 8) (18).



Slika 8: Vezavna mesta v β podenotah proteasoma S in S' ter pripadajoče stranske verige P in P' (prirejeno po (18))

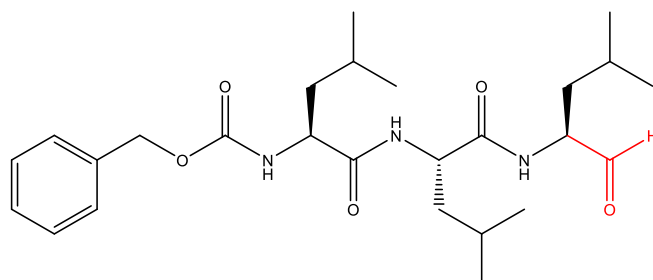
S poznavanjem lastnosti in razlik vezavnih mest iCP ter cCP lahko vplivamo na selektivnost in afiniteto zaviralcev. S pomočjo kristalnih struktur iCP in cCP so ugotovili značilne razlike med vezavnimi mesti podenot $\beta 5i/\beta 5c$ in $\beta 1i/\beta 1c$, medtem ko med podenotami $\beta 2i/\beta 2c$ significantnih razlik v vezavnih mestih niso odkrili. Vezavno mesto S1 podenote $\beta 5i$ je večje kot vezavno mesto S1 podenote $\beta 5c$, zato lahko veže večje stranske verige na mestu P1. S1 pri podenoti $\beta 5i$ je tudi bolj hidrofobno, zato selektivnost dosežemo z lipofilnimi, aromatskimi fragmenti. Razlika je tudi pri vezavnem mestu S3, ki pri podenoti $\beta 5i$ veže manjše polarne fragmente P3. Vezavno mesto S1 podenote $\beta 1i$ je bolj hidrofobno, zato lahko veže hidrofobne stranske verige na mestu P1. Vezavno mesto S1 podenote $\beta 1c$ pa je manj hidrofobno in veže kisle ostanke na P1. Tudi tukaj je razlika v vezavnem mestu S3, ki je tako kot pri podenoti $\beta 5i$ manjše in bolj polarno (18).

1.4.2 »Elektrofilne bojne glave«

Za dosego ne le specifičnosti, temveč tudi ustrezne moči zaviranja, ima večina spojin funkcionalno reaktivno »elektrofilno glavo«, ki bodisi ireverzibilno ali reverzibilno reagira s Thr1 ostanki v proteasomskih podenotah β s tvorbo kovalentne vezi (14). Strukture, ki reagirajo s tvorbo kovalentne vezi, lahko razdelimo v sedem skupin: aldehidi, vinil sulfoni, vinilamidi (sirraktini), boronati, α,β' -epoksiketoni, α -ketoaldehidi in β -laktoni (14, 19).

1.4.2.1 Aldehidi

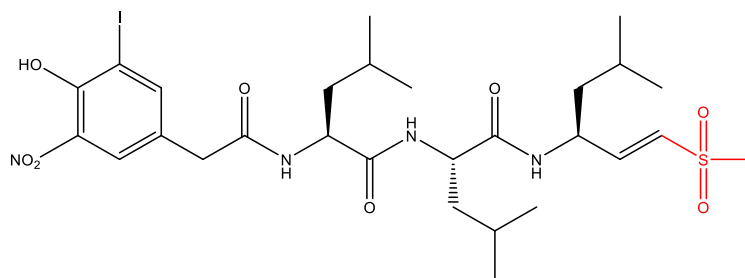
Peptidi z alhidno skupino so bili prvi odkriti zaviralci proteasoma (slika 9) (4). Njihov elektrofilni C-atom reagira z N-končnim ostankom Thr1 proteolitsko aktivne podenote β , pri čemer pride do tvorbe tetraedričnih intermediatov (14). Tak mehanizem reakcije omogoča alhidom, da hkrati reagirajo tudi s serinskimi in cisteinskimi proteazami. Ker se aldehidi zlahka inaktivirajo z oksidacijo, imajo omejen terapevtski potencial (14). Ti zaviralci se na aktivno mesto vežejo počasi, v celico pa vstopajo hitro in so reverzibilni (4).



Slika 9: Strukturna formula peptida z alhidno funkcionalno skupino (prirejeno po (4))

1.4.2.2 Vinil sulfoni

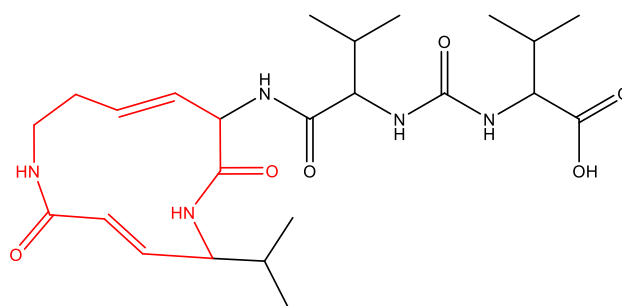
Vinil sulfoni so ireverzibilni zaviralci proteasoma, ki se kovalentno vežejo na podenote β (slika 10) (4). Reakcija poteka tako, da elektrofilni del vinil sulfona reagira po mehanizmu Michaelove 1,4-adicije s proteasomskim Thr1 ostankom, pri čemer se tvori ireverzibilna etrska vez (14). Delovanje vinil sulfonov je nespecifično za treoninske proteaze. Reagirajo lahko tudi s tiolnimi skupinami v cisteinskih proteazah (14). Vinil sulfone je glede na ostale zaviralce zelo enostavno sintetizirati (4).



Slika 10: Strukturna formula peptida z vinil sulfonsko funkcionalno skupino (prirejeno po (4))

1.4.2.3 Vinil amidi (N-vinilacetamidi)

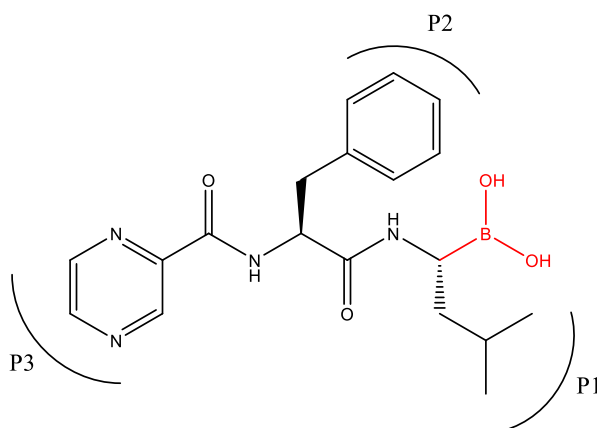
Tudi pri vinil amidih poteka zaviranje preko Michaelove 1,4-adicije. Sirobaktini reagirajo preko vinil amidne funkcionalne skupine s Thr1 na podoben način kot vinil sulfoni (14). Imajo α,β -nenasičen laktamski obroč, s katerim tvorijo kovalentno vez s katalitičnim ostankom Thr1 podenote proteasoma. So družina bakterijskih, makrocikličnih, peptidnih naravnih produktov z 12-členskim laktamskim obročem, ki zavirajo evkariontski proteasom (20). Siringolin A (slika 11), ki ga proizvaja *Pseudomonas syringae*, je selektiven za podenote β proteasoma. Študije so pokazale, da ima antiapoptotično delovanje in drugačne lastnosti kot bortezomib, zato je obetavna molekula pri terapiji bolnikov z rakom, ki se trenutno lahko zdravijo le z bortezomibom (21).



Slika 11: Strukturna formula siringolina A (prirejeno po (21))

1.4.2.4 Boronati

Po odobritvi bortezomiba (slika 12) s strani FDA so postali derivati borove kisline najpomembnejši zaviralci proteasoma (14, 10). Boronati tvorijo reverzibilno tetraedrično prehodno stanje z nukleofilnim Thr1 ostankom.

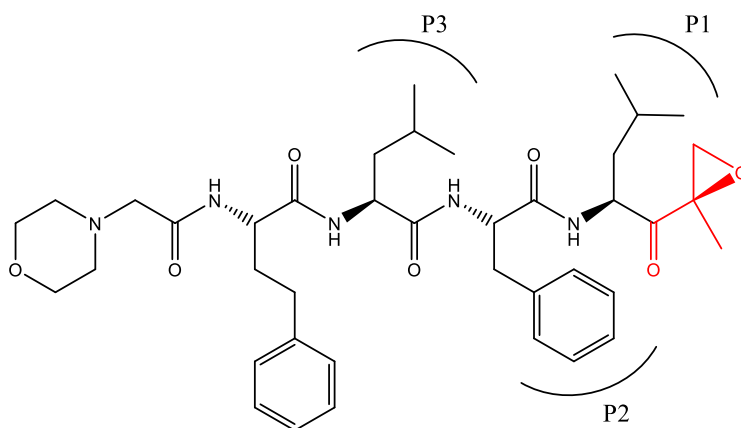


Slika 12: Strukturna formula bortezomiba (prirejeno po (14))

Boronati so močnejši in bolj selektivni zaviralci proteasoma kot aldehidi. Čeprav veljajo za reverzibilne zaviralce, je interakcija v osnovi ireverzibilna (4). Trenutno je bortezomib indiciran za zdravljenje diseminiranega plazmocitoma in limfoma plaščnih celic. Zelo učinkovit je pri zdravljenju hematoloških malignih bolezni, pri trdnih tumorjih, vključno z rakom na pljučih, pa so bili rezultati slabši (22). Bortezomib zavira podenoti $\beta 5c$ in $\beta 5i$ z enako afiniteto (14). Kljub uspehu na tržišču pa ima terapija z njim več slabosti. Med njimi so intravenska aplikacija in resni neželeni učinki, kot so trombocitopenija in nevtropenija ter gastrointestinalne motnje. Več kot 30 % bolnikov, ki so se, ali se še zdravijo z bortezomibom, trpi zaradi močnih, a reverzibilnih nevrodegenerativnih motenj, vključno z nevrotoksičnostjo, tremorjem in zmanjšano hitrostjo prevajanja dražljajev po nevronih (14, 15, 23). Pri terapiji z bortezomibom sčasoma pride tudi do odpornosti, kar predstavlja oviro pri uspešni terapiji (22).

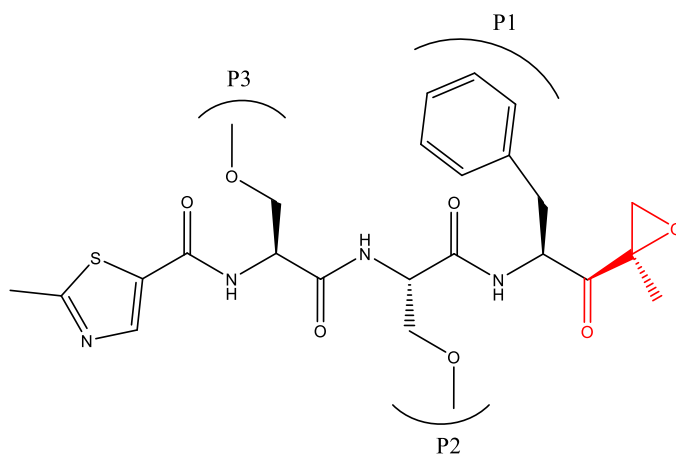
1.4.2.5 α',β' -epoksiketoni in α -ketoaldehidi

Oboji reagirajo po dvostopenjskem mehanizmu s hidroksilno in amsko skupino v nukleofilnem mestu Thr1 ostanka. Med najbolj obetavnimi kandidati za zdravljenje je tetrapeptidni derivat epoksomicina karfilzomib (slika 13) (14, 10).



Slika 13: Strukturna formula karfilzomiba (prirejeno po (14))

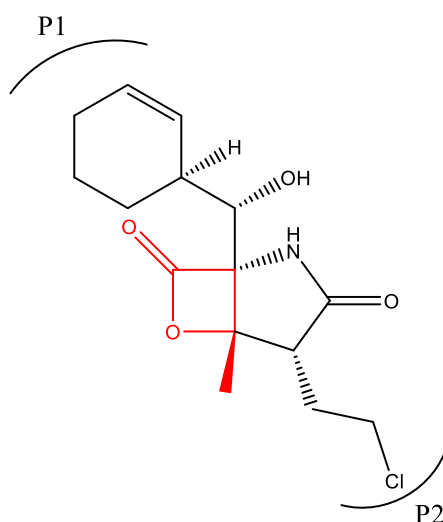
Na podenotah $\beta 5c$ in $\beta 5i$ deluje bolj selektivno kot bortezomib. Zaradi stranske verige, ki vsebuje levcin na mestu P1, se močnejše veže v vezavno mesto S1 podenote $\beta 5c$. Ker povzroča celično smrt pri več tumorskih vrstah je karfilzomib trenutno v tretji fazi kliničnih študij za zdravljenje multiplega mieloma in v prvi fazi za zdravljenje trdnih tumorjev. Podobno kot pri bortezomibu se pojavijo od koncentracije odvisni neželeni učinki, kot sta nevtropenija in trombocitopenija, ne povzroča pa periferne nevrotoksičnosti (14). V največjem deležu so se pri karfilzomibu pojavili neželeni učinki, kot so dispneja, hipertenzija in odpoved srca (24). Da bi se izognili njegovim pomanjkljivostim, so pripravili novo učinkovino ONX 0912 (oprozomib) (slika 14), ki je tripeptid in ima tudi epoksiketonsko skupino. Na stranski verigi P1 vsebuje fenilno skupino, kar pomeni, da se močnejše veže na podenoto $\beta 5i$. Je prvi $\beta 5i$ selektivni zaviralec, ki ireverzibilno zavira imunoproteasom. ONX 0912 je trenutno v fazi 1 kliničnih študij za zdravljenje trdnih tumorjev in hematoloških malignih obolenj in je uporaben peroralno (14).



Slika 14: Strukturna formula oprozomiba (prirejeno po (14))

1.4.2.6 β -laktoni

β -laktoni predstavljajo naslednji obetavni farmakofor, ki je pomemben za razvoj novih učinkovin. Napad Thr1 ostanka na karbonilni C-atom estrske skupine, povzroči odprtje β -laktonskega obroča, nastanek hidroksilne skupine in acil estra encima (14). Najmočnejši zaviralec iz te družine je marizomib (slika 15), ki za razliko od bortezomiba in karfilzomiba ireverzibilno zavira vse tri podenote proteasoma 20S in je trenutno edini nepeptidni zaviralec proteasoma (25, 26).



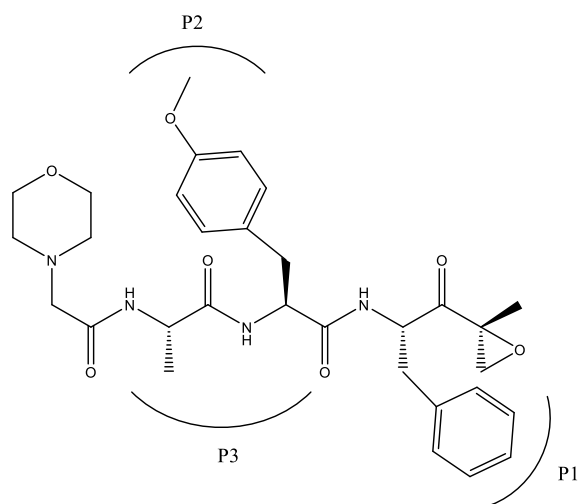
Slika 15: Strukturna formula marizomiba (prirejeno po (14))

1.4.3 Selektivni zaviralci imunoproteasoma

Selektivno zaviranje iCP predstavlja obetavno področje razvoja zdravil za nevrodegenerativne in avtoimune bolezni ter nekatere oblike raka. Do zdaj je znanih le nekaj selektivnih zaviralcev iCP (14).

- **ONX 0914**

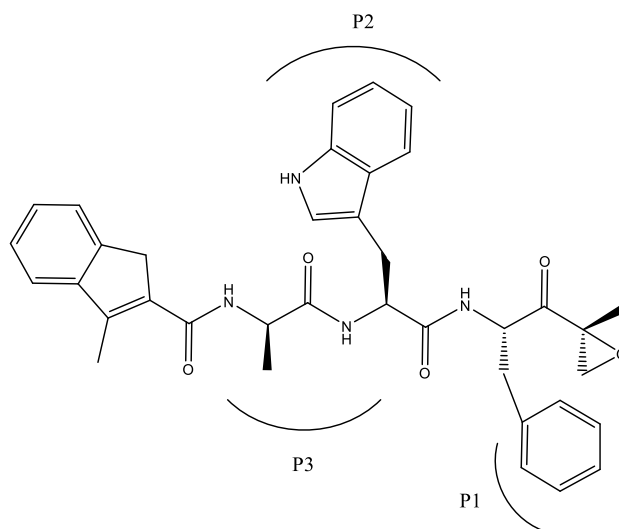
Spada v skupino α,β' -epoksiketonov in deluje selektivno zaviralno na podenoto $\beta 5i$ iCP. To mu omogoča aromatska skupina na mestu P1, ki se veže v vezavno mesto S1 in manjši polarni fragment na mestu P3, ki se veže v vezavno mesto S3 podenote $\beta 5i$ (slika 16). Spojina je bila v študijah uspešna pri preprečevanju vnetnih bolezni, kot so revmatoidni artritis, vnetje črevesja in sistemski lupus (14).



Slika 16: Strukturna formula ONX 0914 (prirejeno po (14))

- **PR-924**

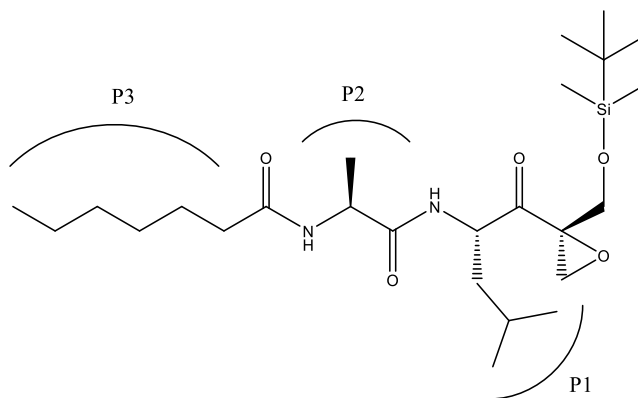
Spada v skupino α,β' -epoksiketonov in deluje selektivno zaviralno na podenoto $\beta 5i$ iCP. Uporablja se za zdravljenje multiplega mieloma. Na mestu P1 vsebuje aromatsko skupino in polarni fragment na mestu P3, kar mu omogoča večjo selektivnost do iCP (slika 17) (14).



Slika 17: Strukturna formula PR-924 (prirejeno po (14))

- **UK-101**

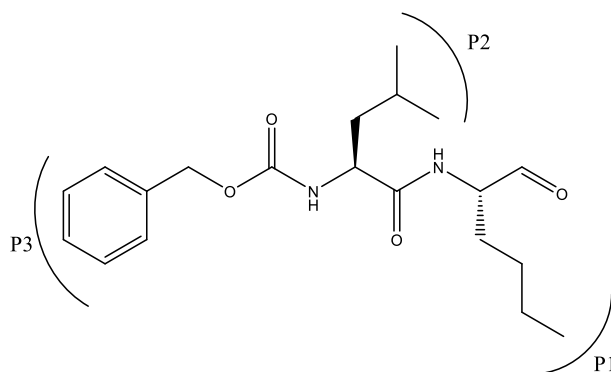
Kemijska struktura te spojine temelji na dihidroeponepicinu in deluje selektivno zaviralno na podenoto iCP $\beta 1i$. Na mestu P3 vsebuje linearno hidrofobno heptanojsko verigo, ki se veže v vezavno mesto S3, kar vpliva na selektivnost (slika 18). Spojina deluje na celice raka prostate, v katerih je prekomerno izražanje podenote $\beta 1i$ (14).



Slika 18: Strukturna formula UK-101 (prirejeno po (14))

- **IPSI-001**

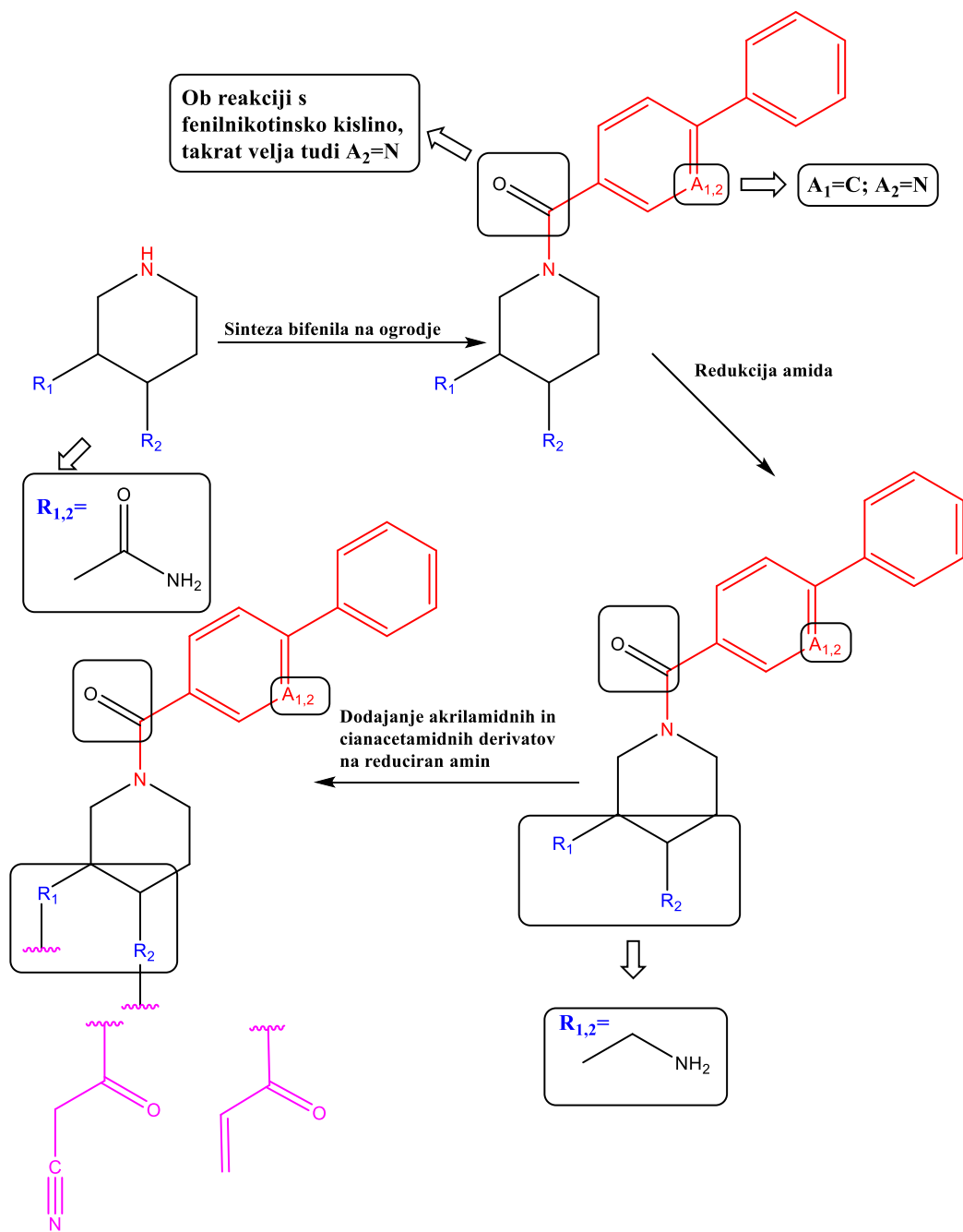
Po kemijski strukturi je ta spojina peptidni aldehyd, ki deluje selektivno na podenoto β 1i iCP. Za selektivnost je odgovoren C-končni del, ki vsebuje hidrofobne amino kisline (slika 19). Spojina je učinkovita pri hematoloških obolenjih, kjer so povišane vrednosti iCP, in pri celicah, ki so odporne na terapijo z bortezomibom (14).



Slika 19: Strukturna formula IPSI-001 (prirejeno po (14))

2. NAČRT DELA

Pri načrtovanju raziskovalnega dela za magistrsko nalogo bomo najprej z računalniškim modeliranjem določili osnovne strukturne značilnosti končnih spojin. Kot najprimernejše ogrodje bomo uporabili nipekotinsko kislino oziroma njen položajni izomer izonipekotinsko kislino. Nanj bomo pripeli večji planarni lipofilni fragment, bifetil. Vzporedno z iskanjem osnovnega ogrodja bomo med v literaturi že objavljenimi elektrofilnimi skupinami izbrali ustrezen elektrofilni fragment. Osredotočili se bomo na cianacetamidne in akrilamidne derivate osnovne spojine. Reakcije bomo izvajali po vnaprej načrtovani reakcijski shemi (slika 20). Na sekundarni dušik v nipekotinskem skeletu bomo na različne načine skušali pripeti bifetil. Najprej bomo uporabili Suzukijevo reakcijo, kjer z alkiliranjem pripravimo halogenirano fenilno skupino, nato pa s pomočjo fenilboronske kisline še drugi obroč. V kolikor Suzukijeva reakcija ne bo potekla, bomo s spreminjanjem topil, reagentov, pogojev in aparatur poskušali optimizirati potek reakcije. Druga možnost je reduktivno aminiranje, pri čemer bomo uporabili bifetilni derivat z vezano karbonilno skupino. Kot reducent bomo uporabili $\text{Na}(\text{OAc})_3\text{BH}$. Sledila bo redukcija amidne skupine do primarnega amina. Tukaj bomo kot reducent uporabili LiAlH_4 . Sledila bo vezava akrilne in 2-cianoocetne kisline na primarni amin z uporabo sklopitvenih reagentov. Reakcijska shema (slika 20) je podana kot primer, kako bomo načrtovali potek sinteze do končnih spojin, to so spojine, ki bodo vsebovale osnovni nipekotinski skelet, bifetil in akrilno oziroma 2-cianoocetno kislino kot elektrofil. Vse sintezne stopnje bomo skušali optimizirati z vidika izkoristkov reakcij, uporabe ustreznih in čim cenejših reagentov in možnosti priprave sorodnih spojin v bodoče. Vse končne spojine kot tudi vmesne produkte sinteze bomo identificirali s pomočjo ^1H NMR, IR, MS in ^{13}C NMR.



Slika 20: Načrt sinteznih postopkov za eksperimentalni del magistrske naloge

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

REAGENTI IN TOPILA:

Pri delu smo uporabljali reagente in topila proizvajalcev Acros Organics, Fluka, Merck, Sigma-Aldrich, Panreac in so bili ustrezne čistosti, kot je navedel proizvajalec. Brezvodni CH_2Cl_2 in THF smo pripravili tik pred uporabo po standardnem postopku z destilacijo in ju shranjevali nad molekularnimi siti (velikost por 4 Å). Voda, ki smo jo uporabljali za pripravo raztopin in pri ekstrahiranjih, je bila prečiščena.

LABORATORIJSKA OPREMA:

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

3.2 METODE

KROMATOGRAFSKE METODE:

Tankoplastna kromatografija (TLC):

Metodo TLC smo uporabljali za spremljanje poteka kemijskih reakcij in ugotavljanja homogenosti in čistosti produkta. Za izvedbo TLC smo kot stacionarno fazo uporabljali plošče proizvajalca Merck, TLC Silica gel 60 F254 z 0,2 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem in različne mobilne faze, najpogosteje zmesi CH_2Cl_2 , MeOH, EtOAc, Hex. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabljali UV svetilko pri valovni dolžini 254 nm in orositvene reagente ninhidrin, bromkrezolno zeleno, fosfomolibdensko kislino in 2,4-dinitrofenilhidrazin.

Kolonska kromatografija (KKR):

Metodo KKR smo uporabljali za končno čiščenje produkta. Kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel proizvajalca Merck, Silica Gel 60 z velikostjo delcev 0,040–0,063 mm in različne mobilne faze, največkrat zmesi CH₂Cl₂, MeOH, EtOAc in Hex. Optimalno mobilno fazo smo izbrali na podlagi R_f produktov, ki smo jih predhodno določili s TLC. Uporabljali smo steklene kolone različnih premerov in dolžin. Pretok mobilne faze smo pospeševali z uvajanjem nadtlaka (»flash kromatografija«).

SPEKTROSKOPSKE METODE:

Jedrska magnetna resonanca (NMR):

Spektri so bili posneti na spektrometru Bruker Avance DPX400 na Fakulteti za Farmacijo Univerze v Ljubljani. Vzorci so bili raztopljeni v CDCl₃ ali DMSO-d₆. Kot interni standard je bil uporabljen tetrametilsilan (TMS). Kemijski premiki (δ) so bili podani v ppm, sklopitvene konstante (J) pa v Hz.

Masna spektrometrija (MS):

Spektri so bili posneti na spektrometru VG-Analytical Autospec Q proizvajalca Micromass v Centru za masno spektrometrijo na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani. Uporabljena je bila ESI tehnika ionizacije.

Infrardeča spektroskopija (IR):

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

DOLOČEVANJE TALIŠČ:

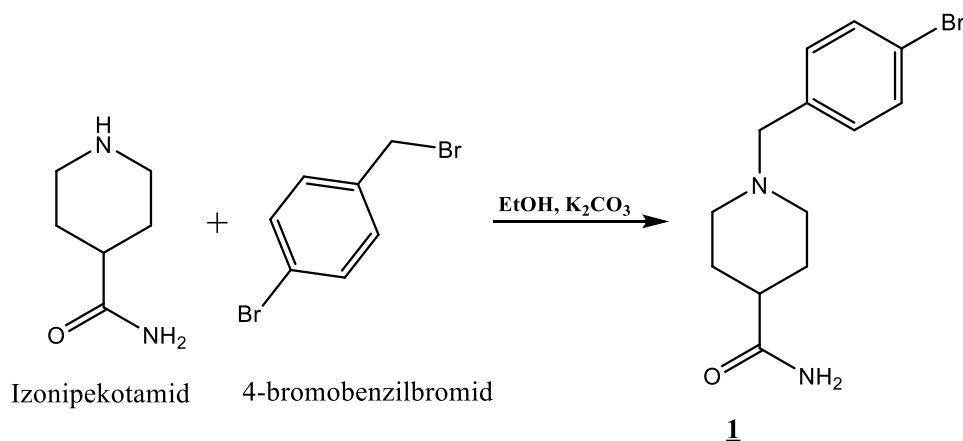
Temperaturo tališč smo določevali na Koflerjevem talilnem mikroskopu z ogrevalno mizico proizvajalca Leica in so nekorrigirana.

RAČUNALNIŠKA PROGRAMSKA OPREMA:

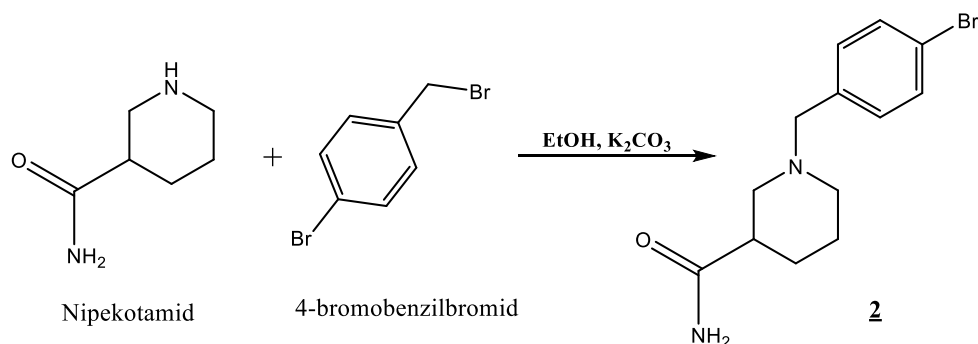
Za risanje in poimenovanje spojin smo uporabljali računalniški program ChemBioDraw Ultra 13.0 podjetja PerkinElmer Informatics. NMR spektre smo procesirali s programom MestReC 4.8.6.0 podjetja Mestrelab Research SL. Znanstvene članke smo iskali s pomočjo Brskalnika ScienceDirect, sintezne postopke pa s programom SciFinder Scholar.

4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 Sinteza 1-(4-bromobenzil)piperidin-4-karboksamida (1) in 1-(4-bromobenzil)piperidin-3-karboksamida (2)



Slika 21: Reakcijska shema sinteze 1-(4-bromobenzil)piperidin-4-karboksamida (1)



Slika 22: Reakcijska shema sinteze 1-(4-bromobenzil)piperidin-3-karboksamida (2)

V 50-mililitrsko bučko za sintezo spojine 1 smo zatehtali 0,500 g izonipekotamida (3,8760 mmol), 0,9675 g 4-bromobenzil bromida (3,8760 mmol), 1,068 g K₂CO₃ (7,7520 mmol) in 30 mL brezvodnega etanola. V 50-mililitrsko bučko za sintezo spojine 2 smo zatehtali 0,500g nipekotamida (3,8760 mmol), 1,268 g 4-bromobenzil bromida (5,0720 mmol), 1,068 g K₂CO₃ (7,7520 mmol) in 30 mL brezvodnega etanola. Reakcijski zmesi smo 15 minut preprihivali z argonom in nato čez noč segrevali ob vrenju. Naslednji dan smo pri znižanem tlaku odparili etanol. Suhima ostankoma smo dolili 20 mL DKM in 20 mL H₂O. Ko sta se fazi ločili, smo vodni fazi ekstrahirali z DKM (3 × 20 mL). Zbrane organske faze smo sprali z NaCl, dodali

sušilno sredstvo Na₂SO₄, čez pol ure filtrirali in uparili DKM pri znižanem tlaku. Suha ostanka smo prelili s heksanom in bučki za eno noč postavili v hladilnik. Naslednji dan smo oborini odfiltrirali s presesavanjem.

Ime: *1-(4-bromobenzil)piperidin-4-karboksamid (1)*

Molekulska formula: C₁₃H₁₇BrN₂O

Molska masa: 297,20 g/mol

Izgled: trd bel produkt

TLC: R_f = 0,60 (Mf: EtOAc : MeOH = 1 : 1)

Orositveni reagent: ninhidrin

Izkoristek: η = 84,5%

Tališče: 130,3 – 132,1 °C

¹H (400 MHz, DMSO), δ (ppm): 1.48 – 1.58 (m, 2H, CH₂), 1.63 – 1.66 (m, 2H, CH₂), 1.87 – 1.92 (m, 2H, NCH₂), 2.01 – 2.07 (m, 1H, CH), 2.76 – 2.78 (m, 2H, NCH₂), 3.40 (s, 2H, CH₂), 6.73 (s, 1H, NH₂), 7.21 (s, 1H, NH₂), 7.25 – 7.27 (m, 2H, Ar-H), 7.50 – 7.52 (m, 2H, Ar-H)

¹³C NMR (400MHz, CDCl₃), δ (ppm): 28.49, 39.47, 41.62, 52.64, 61.44, 119.76, 130.82, 130.98, 138.06, 176.51

MS (ESI+): m/z = 318,86 [M+Na]⁺, izračunan m/z = 296,05

IR (ATR): ν [cm⁻¹] = 521, 582, 632, 642, 672, 713, 788, 804, 816, 850, 931, 981, 1003, 1013, 1043, 1071, 1094, 1106, 1136, 1148, 1197, 1218, 1243, 1282, 1300, 1336, 1360, 1385, 1430, 1485, 1636, 2755, 2797, 2924, 2947, 3149, 3306, 3448

Ime: *1-(4-bromobenzil)piperidin-3-karboksamid (2)*

Molekulska formula: C₁₃H₁₇BrN₂O

Molska masa: 297,20 g/mol

Izgled: trd bel produkt

TLC: R_f = 0,60 (Mf: EtOAc : MeOH = 1 : 1)

Orositveni reagent: ninhidrin

Izkoristek: η = 83,4 %

Tališče: 110,0 – 111,8 °C

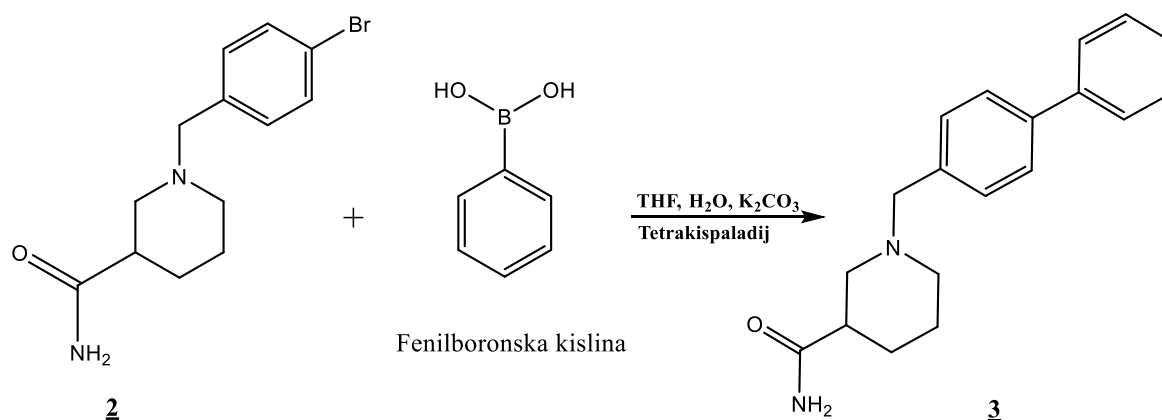
¹H (400 MHz, DMSO), δ (ppm): 1.28 – 1.48 (m, 2H, CH₂), 1.56 – 1.74 (m, 2H, CH₂), 1.87 – 2.00 (m, 2H, NCH₂), 2.27 – 2.33 (m, 1H, CH), 2.67 – 2.76 (m, 2H, NCH₂), 3.38 – 3.46 (m, 2H, CH₂), 6.76 (s, 1H, NH₂), 7.24 (s, 1H, NH₂), 7.26 – 7.31 (m, 2H, Ar-H), 7.50 – 7.52 (m, 2H, Ar-H)

^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3), δ (ppm): 24.34, 27.09, 42.30, 53.06, 55.72, 61.56, 119.83, 130.92, 130.99, 137.88, 175.43

MS (ESI+): $m/z = 318,83$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, izračunan $m/z = 296,05$

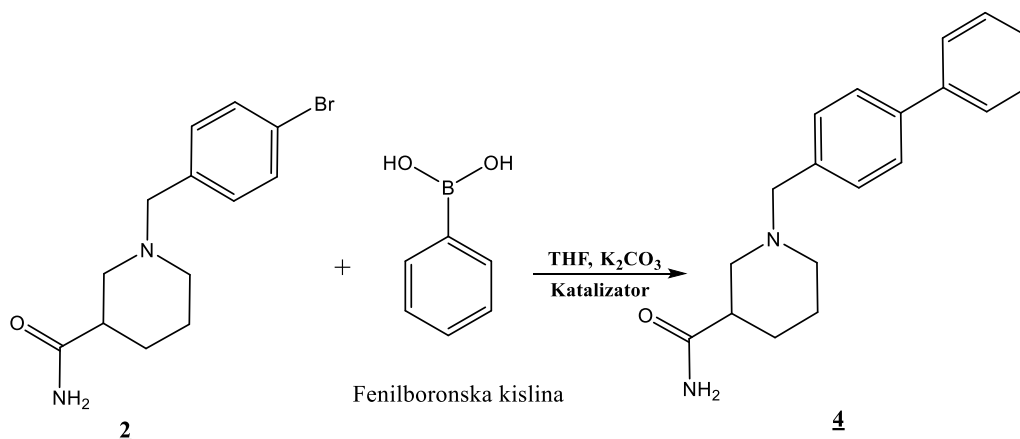
IR (ATR): ν [cm^{-1}] = 529, 551, 562, 576, 635, 657, 719, 802, 827, 830, 864, 880, 966, 996, 1012, 1044, 1070, 1088, 1103, 1133, 1159, 1202, 1219, 1233, 1243, 1281, 1295, 1316, 1346, 1369, 1404, 1423, 1452, 1464, 1487, 1620, 1647, 2805, 2934, 3186, 3386

4.2 Sinteza 1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-3-karboksamida (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9)



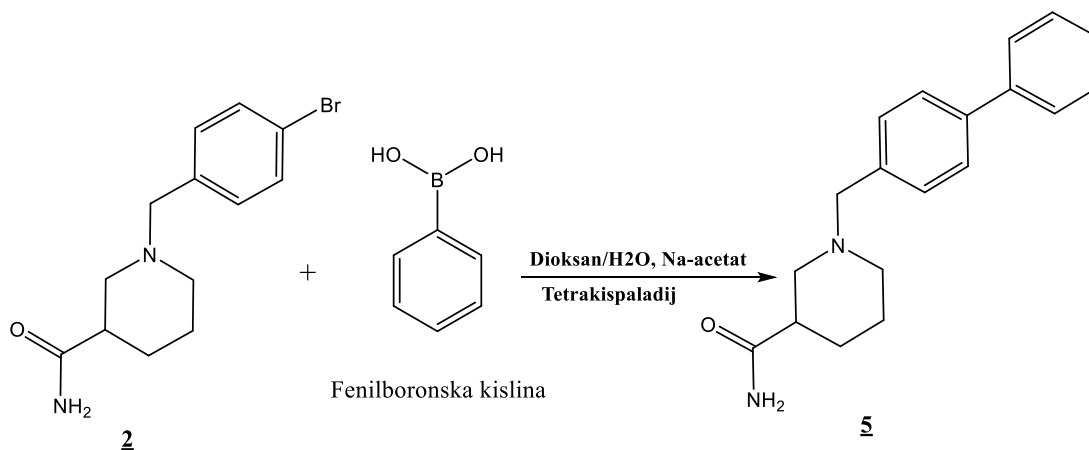
Slika 23: Reakcijska shema sinteze 1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-3-karboksamida (3)

V 10-mililitrsko bučko za sintezo spojine **3** smo zatehtali 0,100 g spojine **2** (0,3370 mmol), 0,0570 g fenilboronske kisline (0,4380 mmol), 0,098 g K₂CO₃ (0,6730 mmol), 7 mL THF, 400 μL H₂O in na koncu še konico spatule katalizatorja tetrakis(paladija). Reakcijsko zmes smo preko noči segrevali pri 75 °C in prepihovali z argonom. Naslednji dan smo uparili THF pri znižanem tlaku ter ostanku v bučki dodali EtOAc. Ekstrahirali smo z NaHCO₃ (3 \times 20 mL). Združene vodne faze smo še enkrat ekstrahirali s 25 mL EtOAc. Zbrane organske faze smo sprali z NaCl, dodali sušilno sredstvo Na₂SO₄, čez pol ure filtrirali in uparili EtOAc pri znižanem tlaku. Suh produkt smo raztopili v DKM, pripravili preparativni TLC (Mf: DKM : MeOH = 9 : 1) in ves produkt nanесли na začetno linijo. Čez pol ure, ko je topilo priptovalo do vrha, smo označili najbolj izrazite lise in od tam silikagel spraskali s plošče. Prenesli smo ga v bučko, dodali DKM, ter s stekleno palčko homogenizirali. Suspenzijo smo filtrirali s presesavanjem. Pri znižanem tlaku smo odparili DKM. Z ^1H NMR analizo smo dokazali, da nikjer ni bilo našega produkta.



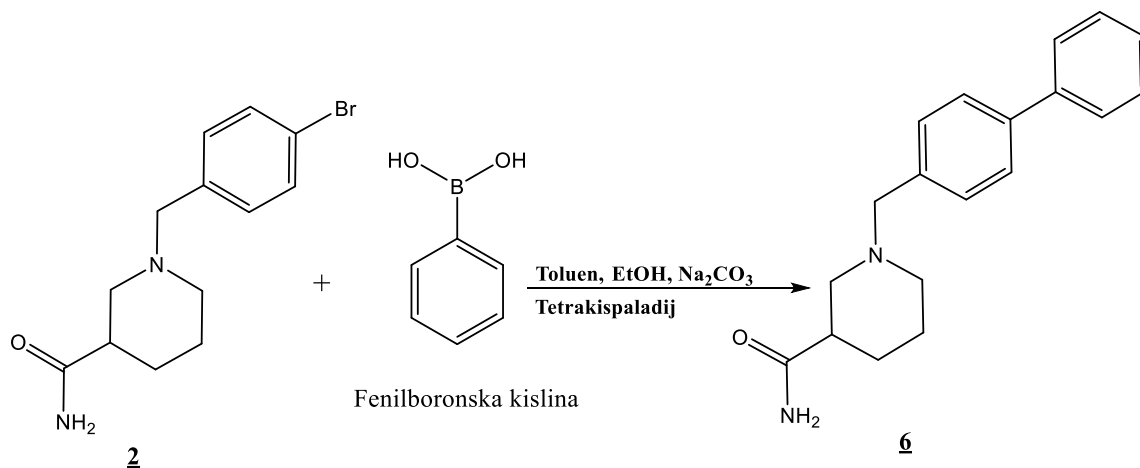
Slika 24: Reakcijska shema sinteze 1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-3-karboksamida (**4**)

V 10-mililitrsko bučko za sintezo spojine **4** smo zatehtali 0,100 g spojine **2** (0,3370 mmol), 0,0534 g fenilboronske kisline (0,4380 mmol), 0,0929 g K_2CO_3 (0,6730 mmol), 7 mL THF in konico spatule katalizatorja ferocena. Reakcijsko zmes smo preko noči segrevali pri 75 °C in preprihovali z argonom. Naslednji dan smo uparili THF pri znižanem tlaku ter ostanku v bučki dodali EtOAc. Ekstrahirali smo z $NaHCO_3$ (3×15 mL). Zbrane organske faze smo spirali z nasičeno raztopino NaCl, dodali sušilno sredstvo Na_2SO_4 , čez pol ure filtrirali in uparili EtOAc pri znižanem tlaku. Dobili smo 21 mg produkta, ki je bil temno rjave barve in precej viskozen. Približno 5 mg smo ga raztopili v DKM in ga nanegli na preparativni TLC (Mf: EtOAc : heksan = 1 : 1 + Et_3N). Pod UV smo pogledali, katere lise so bile najbolj izrazite, jih postrgali ter homogenizirali v penicilinki in dodali topilo DKM : MeOH = 3 : 1. S filtriranjem pod tlakom smo odstranili silikagel ter spodnji bistri raztopini pri znižanem tlaku uparili topili. Suhega produkta ni bilo na koncu skoraj nič. Po 1H NMR analizi smo videli, da to ni bil naš pričakovan produkt.



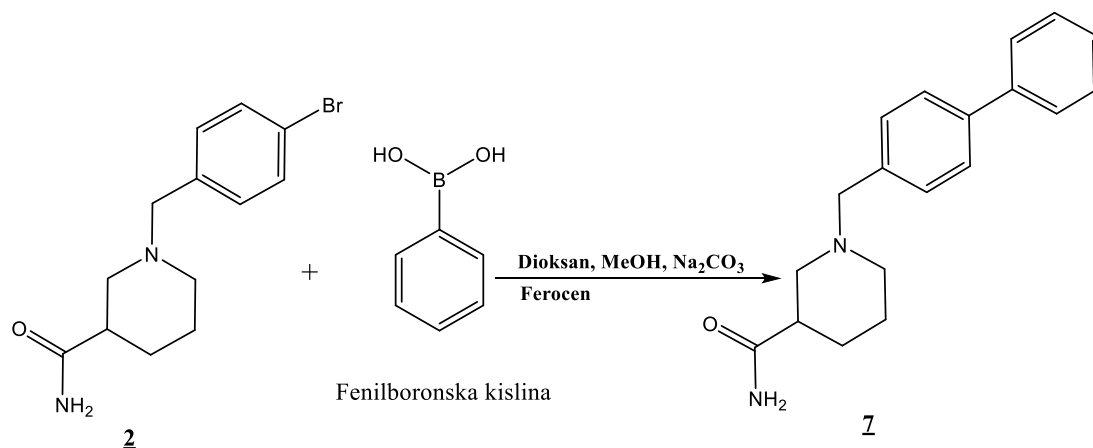
Slika 25: Reakcijska shema sinteze 1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-3-karboksamida (**5**)

V 25-mililitrsko bučko za sintezo spojine **5** smo zatehtali 0,200 g spojine **2** (0,6734 mmol) in 0,0821 g fenilboronske kisline (0,6734 mmol). Tokrat smo spremenili topilo in namesto THF dodali mešanico dioksana in vode. Kot katalizator smo spet uporabili tetrakispaladij. Namesto K_2CO_3 smo dodali 0,1105 g Na-acetata (1,347 mmol). Reakcijsko zmes smo segrevali preko noči pri 70 °C. Topilo smo uparili pri znižanem tlaku in surovi produkt čistili s kolonsko kromatografijo. Mobilna faza je bila sestavljena iz (Mf: DKM : MeOH = 9 : 1). Nobena od frakcij ni vsebovala našega produkta.



Slika 26: Reakcijska shema sinteze 1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-3-karboksamida (**6**)

Reakcijo sinteze spojine **6** smo izvajali v visokotlačnem reaktorju volumna 5 mL z ojačanim steklom in zamaškom. Najprej smo zatehtali 0,100 g spojine **2** (0,3367 mmol), 1,5 mL toluena in 0,7 mL etanola. To smo nato 15 minut mešali pri sobni temperaturi. S kapalko smo dodali 0,8 mL 2-molarnega Na_2CO_3 in mešali naprej 5 minut. Nato smo dodali konico spatule katalizatorja tetrakispaladija in mešali še 5 minut. Na koncu smo dodali 0,041 g fenilboronske kisline (0,3363 mmol) ter zamašili visokotlačni reaktor. Segrevali smo preko noči pri 90 °C. Zmes smo prelili v bučko in pri znižanem tlaku uparili topilo. Dobljen produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (Mf: DKM : MeOH = 9 : 1). Po analizi z 1H NMR smo ugotovili, da reakcija ni potekla.



Slika 27: Reakcijska shema sinteze 1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-3-karboksamida (**7**)

Reakcijo sinteze spojine **7** smo ponovili s katalizatorjem ferocenom pri višji temperaturi in v visokotlačnem reaktorju volumna 10 mL. Najprej smo zatehtali 0,100 g spojine **2** (0,3367 mmol), 2 mL dioksana in 2 mL metanola. To smo nato 15 minut mešali pri sobni temperaturi. S kapalko smo dodali 0,8 mL 2-molarne Na_2CO_3 . Nato smo dodali konico spatule katalizatorja ferocena. Na koncu smo dodali 0,041 g fenilboronske kisline (0,3363 mmol) ter zamašili visokotlačni reaktor. Segrevali smo preko noči pri 120 °C. Zmes smo prelili v bučko in pri znižanem tlaku uparili topilo. Dobljeni produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (Mf: DKM : MeOH = 19 : 1). Po analizi z ^1H NMR smo dobili v enem spektru zelo lepo ločene vrhove, zato smo to frakcijo shranili.

Ime: 1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-3-karboksamid (**7**)

Molekulska formula: $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}$

Molska masa: 294,40 g/mol

Izgled: trd bel produkt

TLC: $R_f = 0,1; 0,2; 0,34; 0,54; 0,8$ (Mf: DKM : MeOH = 9 : 1)

Orositveni reagent: Ninhidrin

Izkoristek: $\eta = 14,9 \%$

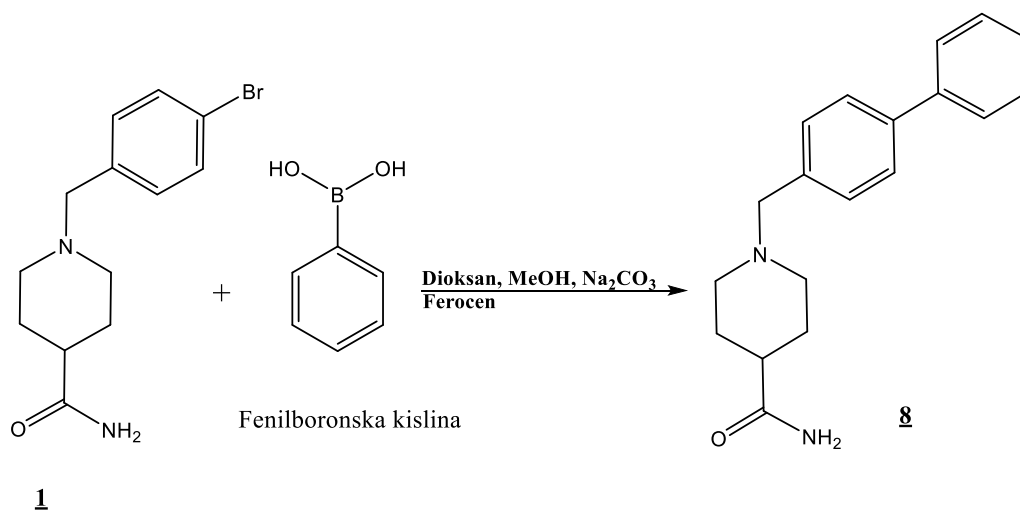
Tališče: 145,3 – 147,8 °C

^1H (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 1.30 – 1.37 (m, 1H, CH_2), 1.44 – 1.47 (m, 1H, CH_2), 1.61 – 1.65 (m, 1H, CH_2), 1.72 – 1.75 (m, 1H, CH_2), 1.90 – 2.03 (m, 2H, NCH_2), 2.29 – 2.35 (m, 1H, CH), 2.73 – 2.82 (m, 2H, NCH_2), 3.45 – 3.50 (m, 2H, NCH_2), 6.76 (s, 1H, NH_2), 7.21 – 7.34 (m, 1H, NH_2), 7.35 – 7.38 (m, 3H, Ar-H), 7.44 – 7.48 (m, 2H, Ar-H), 7.61 – 7.67 (m, 4H, Ar-H)

^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3), δ (ppm): 24.36, 27.16, 42.34, 53.17, 55.79, 62.11, 126.51, 127.28, 128.89, 129.43, 139.99, 175.52

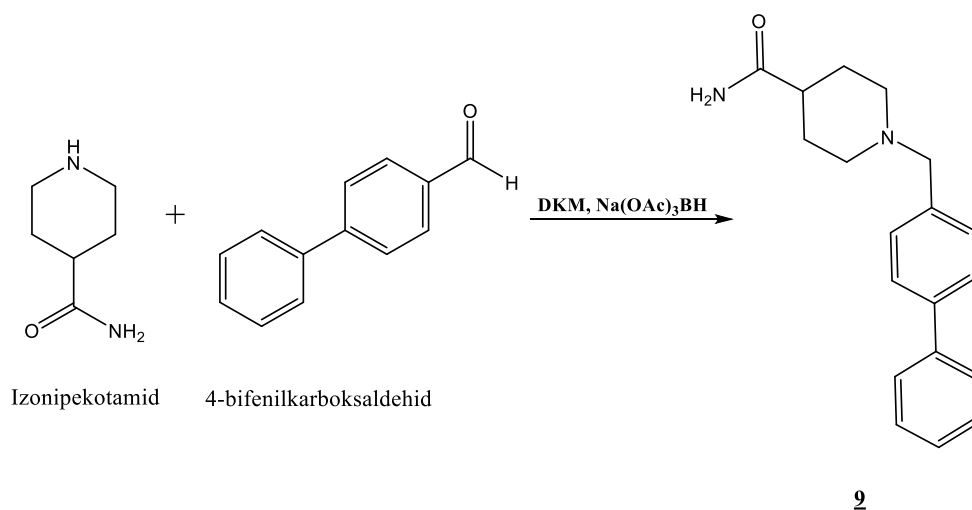
MS (ESI+): $m/z = 317,40$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, izračunan $m/z = 294,17$

IR (ATR): ν [cm^{-1}] = 504, 523, 542, 569, 608, 653, 691, 711, 733, 761, 795, 820, 847, 911, 964, 978, 1005, 1089, 1128, 1157, 1199, 1248, 1270, 1306, 1344, 1367, 1387, 1422, 1449, 1462, 1486, 1619, 1655, 2802, 2927, 3185, 3370



Slika 28: Reakcijska shema sinteze 1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-3-karboksamida (**8**)

V visokotlačni reaktor volumna 5 mL smo za sintezo spojine **8** zatehtali 0,100 g spojine **1** (0,3367 mmol), 1,5 mL dioksana in 1,5 mL metanola. To smo 15 minut mešali pri sobni temperaturi. S kapalko smo nato dodali 0,67 mL 2-molarnega Na_2CO_3 in konico spatule katalizatorja ferocena. Na koncu smo dodali 0,041 g fenilboronske kisline (0,3363 mmol) ter zamašili visokotlačni reaktor. Reakcijsko zmes smo segrevali preko noči pri 120 °C. Zmes smo prelili v bučko in pri znižanem tlaku uparili topilo ter suh ostanek raztopili v DKM. Dobljen produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (Mf: DKM : MeOH = 9 : 1). Po analizi z ^1H NMR smo ugotovili, da to ni bil naš pričakovan produkt.



Slika 29: Reakcijska shema sinteze 1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-3-karboksamida (**9**)

V 50-mililitrsko bučko za sintezo spojine **9** smo zatehtali 0,500 g izonipekotamida (3,875 mmol) in 15 mL DKM. Reakcijsko zmes smo 5 minut prepihovali z argonom. Dodali smo 0,710 g 4-bifenilkarboksaldehida (3,900 mmol), zmes postavili na ledeno kopel in mešali 15 minut. Potem smo dodali 1,654 g $\text{Na(OAc)}_3\text{BH}$ (7,802 mmol) in mešali na ledeni kopeli eno uro. Reakcijsko zmes smo segrevali preko noči pri 30 °C. Naslednji dan smo zmes prelili v lij ločnik ter dodali 20 mL DKM. Ekstrahirali smo z 1M NaOH (3 × 30 mL) in nato z 0,1-molarno HCl (3 × 20 mL). Kislo vodno fazo smo nevtralizirali s trdnim Na_2CO_3 in nato ekstrahirali z DKM. Zbrane organske faze smo spirali z nasičeno raztopino NaCl, sušili z natrijevim sulfatom in pri znižanem tlaku odparili DKM.

Ime: 1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-4-karboksamid (**9**)

Molekulska formula: $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}$

Molska masa: 294,40 g/mol

Izgled: trd bel produkt

TLC: $R_f = 0,38$ (Mf: DKM : MeOH = 9 : 1)

Orositveni reagent: Ninhidrin

Izkoristek: $\eta = 58,0 \%$

Tališče: 144,9 – 146,1 °C

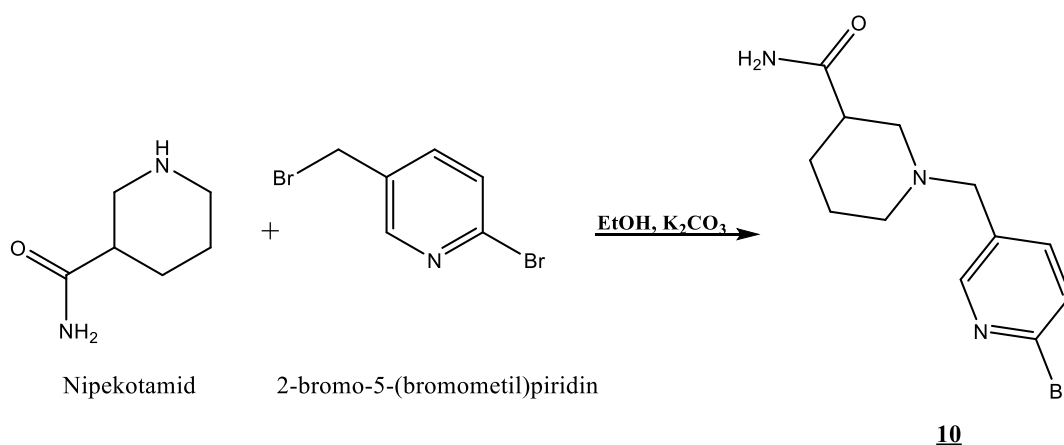
^1H (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 1.53 – 1.60 (m, 2H, CH_2), 1.65 – 1.68 (m, 2H, CH_2), 1.89 – 1.95 (t, 2H, NCH_2), 2.05 (m, 1H, CH), 2.82 – 2.85 (d, 2H, NCH_2), 3.47 (s, 2H, NCH_2), 6.73 (s, 1H, NH_2), 7.21 (s, 1H, NH_2), 7.35 – 7.39 (m, 3H, Ar-H), 7.44 – 7.48 (m, 2H, Ar-H), 7.60 – 7.62 (m, 2H, Ar-H), 7.65 – 7.67 (m, 2H, Ar-H)

^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3), δ (ppm): 28.52, 39.46, 41.71, 52.75, 61.98, 126.49, 127.26, 128.89, 129.31, 138.71, 139.99, 176.57

MS (ESI+): $m/z = 317,11$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, izračunan $m/z = 294,17$

IR (ATR): ν [cm^{-1}] = 515, 546, 578, 635, 672, 689, 756, 730, 788, 823, 843, 855, 926, 947, 974, 998, 1007, 1043, 1097, 1128, 1144, 1170, 1216, 1236, 1276, 1301, 1334, 1361, 1394, 1409, 1452, 1466, 1487, 1624, 1647, 2764, 2812, 2940, 3191, 3387

4.3 Sinteza 1-((6-bromopiridin-3-il)metil)piperidin-3-karboksamida (10)



Slika 30: Reakcijska shema sinteze 1-((6-bromopiridin-3-il)metil)piperidin-3-karboksamida (10)

V 25-mililitrsko bučko smo zatehtali 0,100 g nipekotamida (0,7802 mmol), 0,2545 g 2-bromo-5-(bromometil) piridina (1,0143 mmol), 0,2153g K_2CO_3 (1,5601 mmol) ter 10 mL brezvodnega etanola. Bučko smo postavili v oljno kopel, dodali hladilnik in pustili reakcijo teči čez noč v argonovi atmosferi pri 85 °C. Naslednji dan smo najprej pri znižanem tlaku uparili etanol. Ostanke v bučki smo dodali 10 mL DKM ter 10 mL H_2O . Zmes smo prenesli v lij ločnik ter vodno fazo ekstrahirali z DKM (3 × 10 mL). Združene organske faze smo spirali z nasičeno raztopino NaCl. Organsko fazo smo sušili z natrijevim sulfatom in pri znižanem tlaku odparili DKM. Ostanek smo prelili s heksanom in bučko za eno noč postavili v hladilnik. Naslednji dan smo produkt oborino odfiltrirali s presesavanjem.

Ime: 1-((6-bromopiridin-3-il)metil)piperidin-3-karboksamid (10)

Molekulska formula: $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{BrN}_3\text{O}$

Molska masa: 298,18 g/mol

Izgled: trd bel produkt

TLC: $R_f = 0,70$ (Mf: EtOAc : MeOH = 1 : 1)

Orositveni reagent: bromkrezolno zeleno

Izkoristek: $\eta = 85,5 \%$

Tališče: 146,6 – 148,5 °C

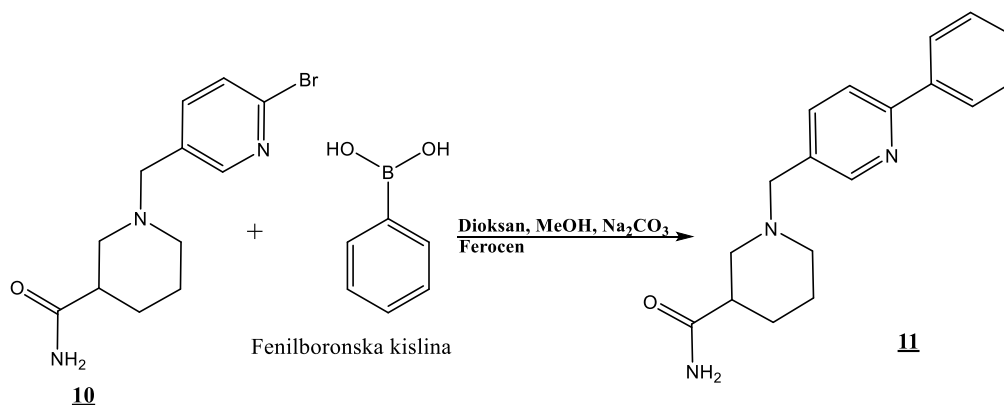
^1H (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 3.31 – 1.35 (m, 1H, CH_2), 1.38 – 1.49 (m, 1H, CH_2), 1.59 – 1.64 (m, 1H, CH_2), 1.70 – 1.74 (m, 1H, CH_2), 1.89 – 2.03 (m, 2H, NCH_2), 2.26 – 2.34 (m, 1H, CH), 2.67 – 2.76 (m, 2H, NCH_2), 3.43 – 3.55 (m, 2H, NCH_2), 6.77 (s, 1H, NH_2), 7.27 (s, 1H, NH_2), 7.60 – 7.62 (m, 1H, Ar-H), 7.65 – 7.68 (m, 1H, Ar-H), 8.29 – 8.30 (m, 1H, Ar-H)

^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3), δ (ppm): 24.29, 26.99, 42.23, 52.98, 55.57, 58.49, 127.64, 133.79, 139.77, 140.02, 150.59, 175.34

MS (ESI+): $m/z = 320,09$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, izračunan $m/z = 297,05$

IR (ATR): ν [cm^{-1}] = 507, 532, 577, 633, 669, 717, 735, 811, 840, 872, 957, 994, 1030, 1051, 1081, 1089, 1130, 1158, 1223, 1265, 1292, 1312, 1331, 1343, 1370, 1378, 1417, 1438, 1461, 1562, 1579, 1663, 2851, 2913, 2942, 3163, 3331

4.4 Sinteza 1-((6-fenilpiridin-3-il)metil)piperidin-3-karboksamida (**11**)

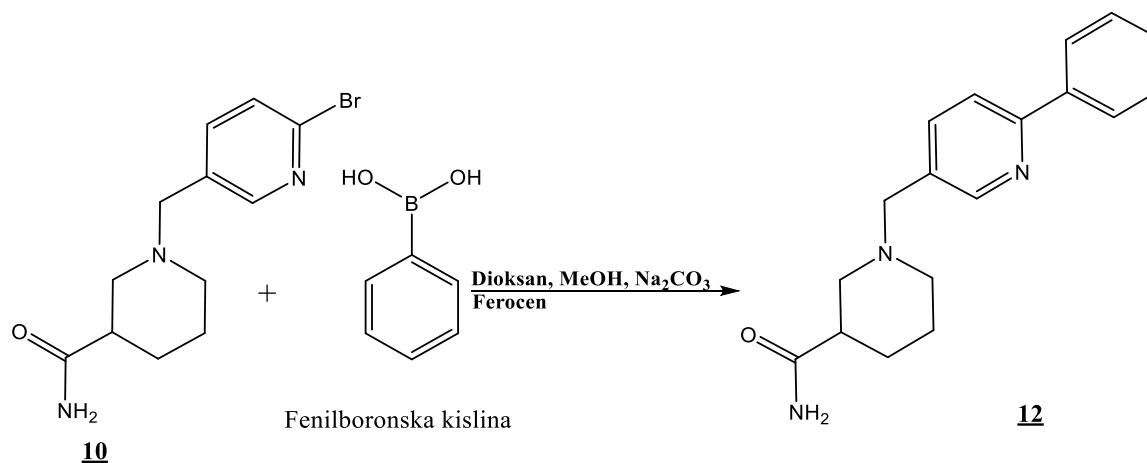


Slika 31: Reakcijska shema sinteze 1-((6-fenilpiridin-3-il)metil)piperidin-3-karboksamida (**11**)

V visokotlačni reaktor volumna 10 mL smo najprej dodali 0,100 g spojine **10** (0,3367 mmol), 1,5 mL dioksana in 1,5 mL metanola. To smo nato 15 minut mešali pri sobni temperaturi. S kapalko smo dodali 0,67 mL 2M Na_2CO_3 in mešali naprej 5 minut. Nato smo dodali konico spatule katalizatorja ferocena in mešali še 5 minut. Na koncu smo dodali 0,041 g fenilboronske kisline (0,3363 mmol) ter zamašili visokotlačni reaktor. Reakcijsko zmes smo segrevali preko noči pri 120 °C. Izdelali smo TLC kmalu po dodatku vseh reagentov in opazili veliko lis na TLC ploščici. Sklepali smo, da je naš produkt v lisah z nižjim retencijskim faktorjem. Zmes smo prelili v bučko in pri znižanem tlaku uparili topili ter suh

ostanek raztopili v DKM. Dobljen produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (Mf: DKM : MeOH = 9 : 1). Spet se spodnja frakcija ni izločala, zato smo spremenili mobilno fazo tako, da je bila bolj polarna (Mf: DKM : MeOH = 5 : 1). Tudi po spremembi, se spodnja frakcija ni izločila. Z ^1H NMR analizo smo dokazali, da nobena frakcija ne ustreza naši spojini.

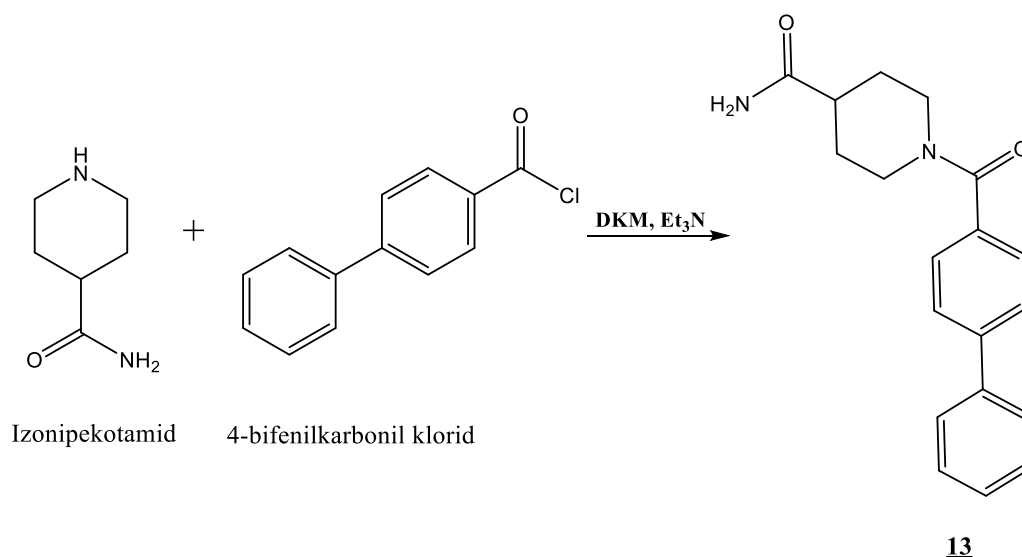
4.5 Sinteza 1-((6-fenilpiridin-3-il)metil)piperidin-3-karboksamida (12)



Slika 32: Reakcijska shema sinteze 1-((6-fenilpiridin-3-il)metil)piperidin-3-karboksamida (12)

Po neuspeli sintezi spojine 11 smo se pri sintezi spojine 12 odločili za drugačen pristop. Vzeli smo epruveto ter vanjo dali magnetno mešalo, 70 mg očiščene spojine 10 (0,2357 mmol), 1,5 mL dioksana ter 1,5 mL metanola. To smo mešali pri sobni temperaturi toliko časa, da se je arilbromid raztopil. Nato smo med mešanjem po kapljicah dodali 0,47 mL Na_2CO_3 , nekaj minut zatem pa še konico spatule katalizatorja ferocena. Pet minut po vseh dodatkih smo dodali še 70 mg fenilboronske kisline (0,5741 mmol). Takoj zatem smo izdelali TLC (Mf: DKM : MeOH = 9 : 1), kjer smo opazili veliko lis zbitih skupaj pri vrhu ter eno liso, ki je bila nižje in bi lahko ustrezala naši spojini. Na epruveto smo nato dali zamašek, ki ima zgoraj membrano, s katero se regulira tlak. To smo potem prenesli v aparat, ki s pomočjo mikrovalov segreje zmes do višjih temperatur. Segrevali smo 90 minut pri 140 °C. Naslednji dan smo pri znižanem tlaku uparili topili in produkt čistili s kolonsko kromatografijo (Mf: DKM : MeOH = 9 : 1). Po tem, ko so se izločile frakcije z višjim R_f, smo Mf spremenili (Mf: DKM : MeOH = 5 : 1) z namenom, da bi se izločile tudi frakcije z nižjim R_f. Z ^1H NMR analizo smo dokazali, da nobena frakcija ne ustreza naši spojini.

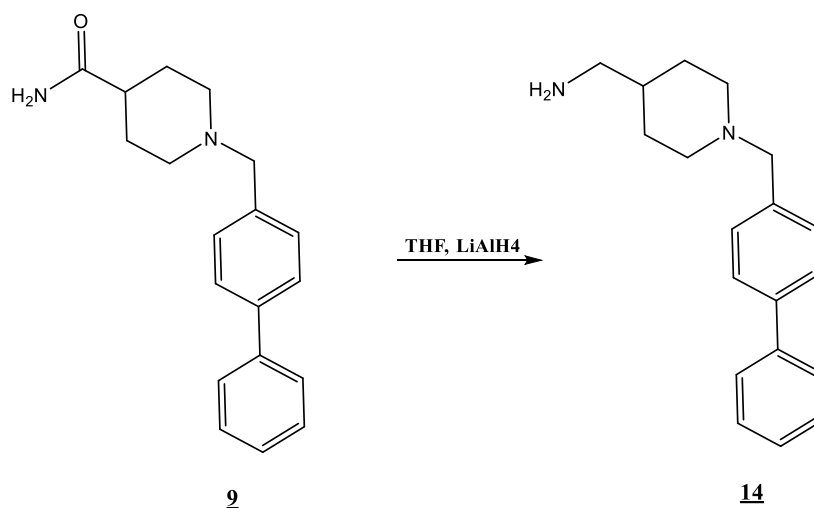
4.6 Sinteza 1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-4-karboksamida (13)



Slika 33: Reakcijska shema sinteze 1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-4-karboksamida (13)

V 50-mililitrsko bučko smo zatehtali 0,500 g izonipekotinata (3,8736 mmol), dodali magnetno mešalo, 20 mL DKM ter 1,63 mL Et₃N. To smo pol ure mešali v argonovi atmosferi. Nato smo bučko postavili na ledeno kopel in po 15 minutah dodali 0,8452 g 4-bifenilkarbonil klorida (3,901 mmol). Reakcijsko zmes smo segrevali preko noči pri 30 °C. V reakcijsko zmes smo dodali 1,2525 g TBTU (3,901 mmol) in 25 mL DKM. Naslednji dan smo vsebini bučke dodali 30 mL DKM in ekstrahirali najprej z 0,1-molarnim HCl (3 × 30 mL), nato pa z enomolarnim NaOH (3 × 20 mL). Zbranim organskim fazam smo pri znižanem tlaku uparili DKM in produkt očistili s kolonsko kromatografijo (Mf: DKM : MeOH = 9 : 1). Z ¹H NMR analizo smo dokazali, da nobena frakcija ne ustreza naši spojini.

4.7 Sinteza (1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-4-il)metanamina (14)



Slika 34: Reakcijska shema sinteze (1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-4-il)metanamina (14)

V 50-mililitrsko bučko smo zatehtali 0,200 g spojine **9** (0,6826 mmol) in 15 mL THF. Mešali smo 15 minut in prepihovali z argonom. Reakcijo smo izvajali v brezvodnih pogojih. Nato smo dodali 0,0518 g LiAlH₄ (1,365 mmol). Zmes smo mešali na oljni kopeli pri 80 °C dve uri, nato pa čez noč pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo bučko prestavili na ledeno kopel in po kapljicah dodali vodo v reakcijsko zmes. Reakcijski zmesi smo pri znižanem tlaku uparili THF. Nato smo ostanku v bučki dodali nekaj vode, da smo nadomestili volumen izparelega topila ter ekstrahirali z DKM (6 × 20 mL). Zbrane organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl, dodali sušilno sredstvo Na₂SO₄, čez pol ure filtrirali in uparili DKM pri znižanem tlaku.

Ime: (1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-4-il)metanamin (14)

Molekulska formula: C₁₉H₂₄N₂

Molska masa: 280,42 g/mol

Izgled: svetlo rjav oljnat produkt

TLC: R_f = 0,27 (Mf: DKM : MeOH = 5 : 1)

Orositveni reagent: ninhidrin

Izkoristek: η = 48 %

Tališče: /

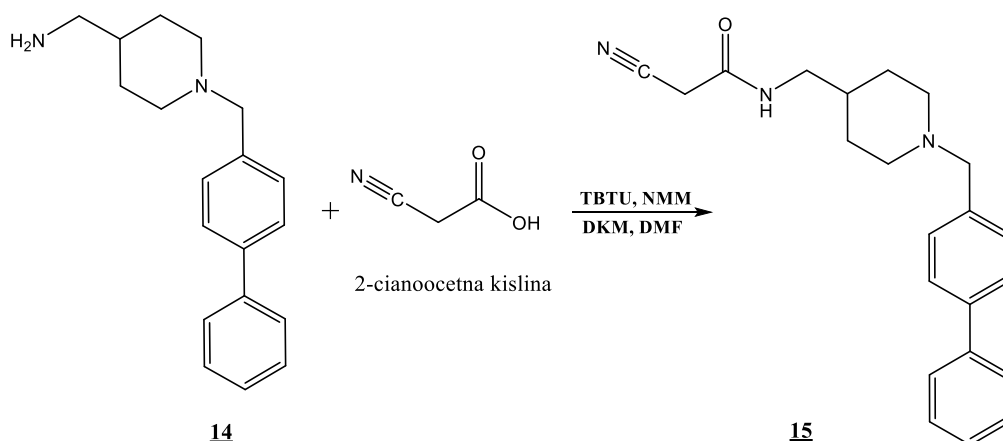
^1H (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 1.08 – 1.17 (m, 2H, CH_2), 1.64 – 1.68 (m, 2H, CH_2), 1.87 – 1.93 (m, 2H, NCH_2), 2.39 – 2.41 (d, 2H, NCH_2), 2.81 – 2.84 (d, 2H, NCH_2), 3.33 – 3.34 (m, 3H, CH_2CH), 3.47 (s, 2H, NH_2), 7.34 – 7.39 (m, 3H, Ar-H), 7.44 – 7.49 (m, 2H, Ar-H), 7.60 – 7.63 (m, 2H, Ar-H), 7.64 – 7.67 (m, 2H, Ar-H)

^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3), δ (ppm): 29.77, 39.47, 47.79, 53.31, 62.15, 126.47, 127.24, 128.88, 129.27, 138.37, 140.02

MS (ESI+): $m/z = 294,29$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, izračunan $m/z = 280,19$

IR (ATR): ν [cm^{-1}] = 534, 613, 638, 691, 731, 755, 782, 823, 852, 927, 947, 1007, 1043, 1102, 1119, 1343, 1366, 1449, 1488, 1624, 1647, 2763, 2811, 2934, 3029, 3394

4.8 Sinteza N-((1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-4-il)metil)-2-cianoacetamida (**15**)



Slika 35: Reakcijska shema sinteze N-((1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-4-il)metil)-2-cianoacetamida (**15**)

Najprej smo v 10 mL bučki raztopili 0,125 g spojine **14** (0,4480 mmol) v 2 mL DKM in 1 mL DMF. V drugo 25 mL bučko smo zatehtali 0,0378 g 2-cianoocetne kisline (0,444 mmol), 0,2138 g TBTU (0,666 mmol), 0,146 mL N-metilmorfolina, 2 mL DMF in 1 mL DKM. Zmes v 25 mL bučki smo mešali pol ure. S kapalko smo nato dodali raztopljeno spojino **14**. Reakcijsko zmes smo čez noč prepihovali z argonom. Zjutraj smo pri znižanem tlaku uparili DKM ter v bučko dodali 10 mL EtOAc. To smo nato ekstrahirali z H_2O (3×10 mL). Zbrane organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl, dodali sušilno sredstvo Na_2SO_4 , čez pol ure filtrirali in uparili EtOAc pri znižanem tlaku. Suh ostanek smo raztopili v DKM in ga

očistili s kolonsko kromatografijo (Mf: DKM : MeOH = 5 : 1 + Et₃N). Po ¹H NMR analizi smo videli, da smo sintetizirali pravo spojino.

Ime: N-((1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-4-il)metil)-2-cianoacetamid (15)

Molekulska formula: C₂₂H₂₅N₃O

Molska masa: 347,46 g/mol

Izgled: trd rjav produkt

TLC: R_f = 0,55 (Mf: DKM : MeOH = 5 : 1 + Et₃N)

Orositveni reagent: bromkrezolno zeleno

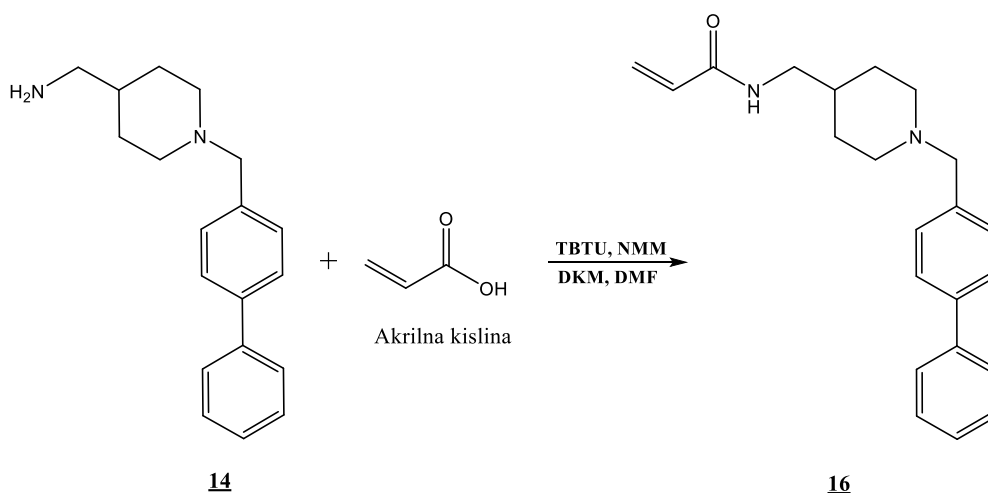
Izkoristek: η = 20 %

Tališče: 88,3 – 91,8 °C

MS (ESI+): m/z = 370,67 [M+Na]⁺, izračunan m/z = 347,20

IR (ATR): ν [cm⁻¹] = 517, 527, 544, 566, 579, 599, 654, 691, 731, 754, 792, 821, 1007, 1144, 1448, 1546, 1667, 2044, 2213, 2930, 3332, 3488

4.9 Sinteza N-((1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-4-il)metil)akrilamida (16)



Slika 36: Reakcijska shema sinteze N-((1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-4-il)metil)akrilamida (16)

V 100-mililitrsko bučko smo dodali 0,068 mL akrilne kisline, 0,437 g EDC (2,2794 mmol), 0,1513 g HOBT (0,9877 mmol), 5 mL DKM in 5 kapljic N-metilmorfolina ter jo postavili na ledeno kopel za 15 minut. V drugi bučki smo raztopili 0,212 g spojine **14** (0,7599 mmol) v majhni količini DKM. Raztopino smo nato s kapalko prenesli v prvo bučko in odstavili ledeno kopel. Pri sobni temperaturi je reakcija potekala čez noč. Zjutraj smo ekstrahirali z NaHCO₃ (3 × 20 mL). Zbrane organske faze smo sprali z NaCl, dodali sušilno sredstvo Na₂SO₄, čez pol ure filtrirali in uparili DKM pri znižanem tlaku. Suh preostanek smo očistili s kolonsko

kromatografijo (Mf: DKM : MeOH = 9 : 1). Po ^1H NMR analizi smo videli, da je spekter ene frakcije ustrezal naši spojini.

Ime: N-((1-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)piperidin-4-il)metil)akrilamid (16)

Molekulska formula: $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}$

Molska masa: 334,46 g/mol

Izgled: rahlo rumen trd produkt

TLC: $R_f = 0,60$ (Mf: DKM : MeOH = 9 : 1 +Et₃N)

Orositveni reagent: /

Izkoristek: $\eta = 65,0\%$

Tališče: 106,5 – 108,3 °C

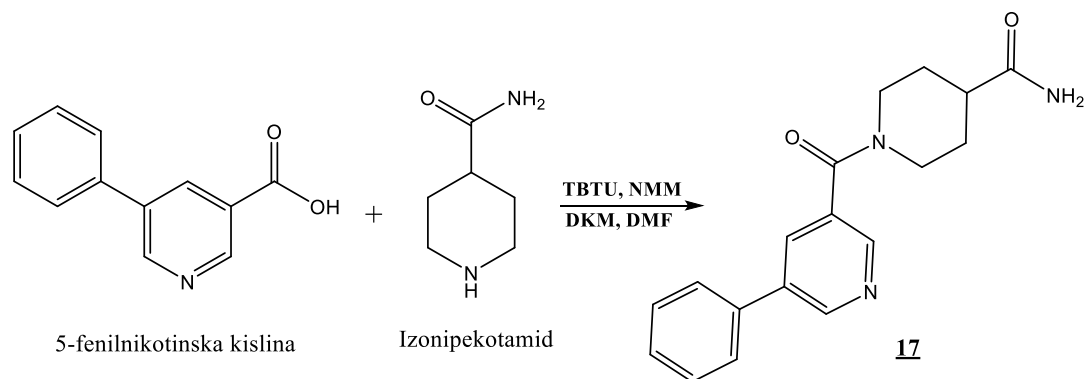
^1H (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 1.32 – 1.39 (m, 2H, CH_2), 1.55 – 1.58 (m, 1H, CH), 1.67 – 1.70 (m, 2H, CH_2), 1.96 – 2.02 (m, 2H, NCH_2), 2.92 – 2.95 (d, 2H, NCH_2), 3.22 – 3.25 (t, 2H, NCH_2), 3.54 (s, 2H, CHCH_2), 5.61 – 5.64 (m, 1H, COCH), 5.84 (s, 1H, NH), 6.06 – 6.12 (m, 1H, CH_2), 6.25 – 6.29 (m, 1H, CH_2), 7.26 – 7.45 (m, 5H, Ar-H), 7.53 – 7.59 (m, 4H, Ar-H)

^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3), δ (ppm): 29.86, 35.93, 45.07, 53.33, 62.76, 126.71, 127.13, 128.77, 129.64, 130.85, 137.19, 140.48, 165.67

MS (ESI+): $m/z = 335,4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, izračunan $m/z = 334,20$

IR (ATR): ν [cm^{-1}] = 549, 609, 697, 759, 851, 975, 1008, 1043, 1102, 1145, 1188, 1244, 1313, 1340, 1368, 1448, 1488, 1550, 1662, 1734, 2807, 2927, 3029, 3292

4.10 Sinteza 1-(5-fenilnikotinol)piperidine-4-karboksamida (17)



Slika 37: Reakcijska shema sinteze 1-(5-fenilnikotinol)piperidine-4-karboksamida (17)

V 25-mililitrsko bučko smo zatehtali 0,250 g 5-fenilnikotinske kisline (1,2550 mmol), 0,6044 g TBTU (1,883 mmol), 0,414 mL NMM, 3 mL DMF in 2 mL DKM ter mešali na sobni temperaturi 20 minut. V drugi bučki smo raztopili 0,1769 g izonipekotamida (1,3805 mmol) v 3 mL DKM in 2 mL DMF. S kapalko smo nato dodali raztopino v 25 mL bučko. Pri sobni temperaturi je reakcija potekala čez noč. Zjutraj smo pri znižanem tlaku uparili DKM. Suhemu ostanku smo dodali 15 mL EtOAc in ekstrahirali s H₂O (3 × 20 mL). Zbrane organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl, dodali sušilno sredstvo Na₂SO₄, čez pol ure filtrirali in uparili EtOAc pri znižanem tlaku. Produkt smo očistili s pomočjo kolonske kromatografije (Mf: DKM : MeOH = 9 : 1). Po ¹H NMR analizi smo videli, da spekter ustreza naši spojini.

Ime: 1-(5-fenilnikotinol)piperidine-4-karboksamid (17)

Molekulska formula: C₁₈H₁₉N₃O₂

Molska masa: 309,37 g/mol

Izgled: oljnat produkt rumene barve

TLC: R_f = 0,30 (Mf: DKM : MeOH = 9 : 1)

Orositveni reagent: ninhidrin

Izkoristek: η = 95,0 %

Tališče: /

¹H (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 1.56 – 1.68 (m, 2H, CH₂), 1.71 – 1.85 (m, 2H, CH₂), 2.37 – 2.42 (m, 1H, CH), 2.88 (m, 1H, CH₂), 3.60 – 3.63 (m, 1H, CH₂), 4.12 – 4.13 (m, 1H, CH₂), 4.47 – 4.49 (m, 1H, CH₂), 6.85 (s, 1H, NH₂), 7.32 (s, 1H, NH₂), 7.46 – 7.55 (m, 3H, Ar-H),

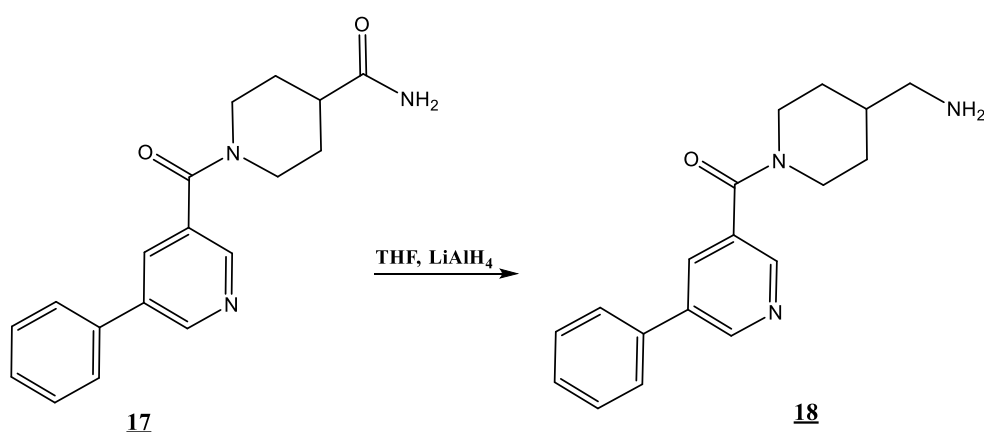
7.78 – 7.81 (m, 2H, Ar-H), 8.08 – 8.09 (m, 1H, Ar-H), 8.58 – 8.59 (m, 1H, Ar-H), 8.97 – 8.98 (m, 1H, Ar-H)

^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3), δ (ppm): 27.99, 28.70, 41.234, 46.82, 48.57, 127.06, 128.47, 129.17, 132.22, 135.17, 136.25, 146.11, 148.23, 166.49, 175.78

MS (ESI+): $m/z = 332,3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $m/z = 310,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, $m/z = 373,3$ $[\text{M}+\text{CH}_3\text{CH}+\text{Na}]^+$, izračunan $m/z = 309,15$

IR (ATR): ν [cm^{-1}] = 514, 551, 579, 659, 699, 751, 771, 801, 833, 894, 922, 945, 1012, 1027, 1096, 1120, 1144, 1184, 1228, 1265, 1279, 1326, 1352, 1369, 1406, 1443, 1460, 1619, 1667, 2864, 2935, 3020, 3208, 3316, 3410

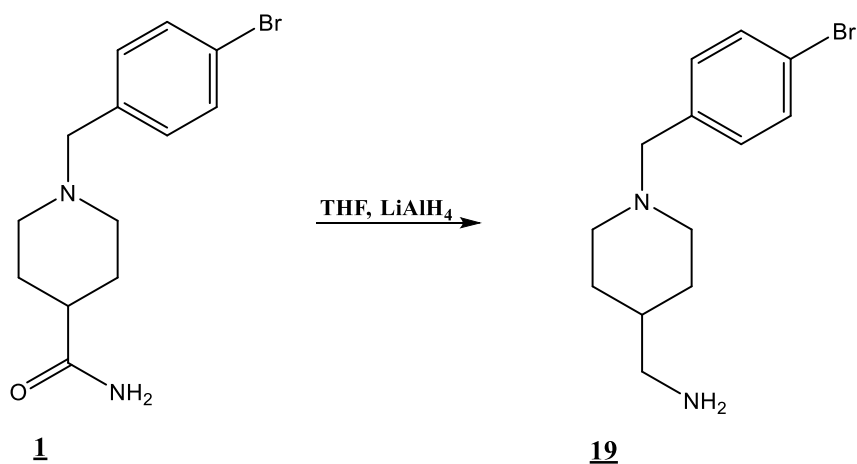
4.11 Sinteza (4-(aminometil)piperidin-1-il)(5-fenilpiridin-3-il)metanona (18)



Slika 38: Reakcijska shema sinteze (4-(aminometil)piperidin-1-il)(5-fenilpiridin-3-il)metanona (18)

V 100-mililitrsko bučko smo dodali 0,500 g spojine **17** (1,6162 mmol) in 40 mL THF. Reakcijsko zmes smo mešali in prepihovali z argonom pri sobni temperaturi 15 minut. Nato smo dodali 0,1232 g LiAlH_4 (3,247 mmol). Zmes smo mešali na oljni kopeli pri 80 °C dve uri, nato pa čez noč pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo bučko prestavili na ledeno kopel in po kapljicah dodali vodo v reakcijsko zmes. Reakcijski zmesi smo pri znižanem tlaku uparili THF. Nato smo ostanku v bučki dodali nekaj vode, da smo nadomestili volumen izparelega topila ter ekstrahirali z DKM (6×20 mL). Zbrane organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl, dodali sušilno sredstvo Na_2SO_4 , čez pol ure filtrirali in uparili DKM pri znižanem tlaku. Po ^1H NMR analizi smo videli, da to ni prava spojina.

4.12 Sinteza (1-(4-bromobenzil)piperidin-4-il)metanamina (**19**)



Slika 39: Reakcijska shema sinteze (1-(4-bromobenzil)piperidin-4-il)metanamina (**19**)

V 25-mililitrsko bučko smo zatehtali 0,170 g spojine **1** (0,6800 mmol) in 15 mL brezvodnega THF. Reakcijsko zmes smo mešali in preprihovali z argonom pri sobni temperaturi 15 minut. Nato smo dodali 0,060 g LiAlH₄ (1,3600 mmol). Zmes smo mešali na oljni kopeli pri 80 °C dve uri, nato pa čez noč pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo bučko prestavili na ledeno kopel in po kapljicah dodali vodo v reakcijsko zmes. Reakcijski zmesi smo pri znižanem tlaku uparili THF. Nato smo ostanku v bučki dodali nekaj vode, da smo nadomestili volumen izparelega topila ter ekstrahirali z DKM (5 × 20 mL). Zbrane organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl, dodali sušilno sredstvo Na₂SO₄, čez pol ure filtrirali in uparili DKM pri znižanem tlaku.

Ime: (1-(4-bromobenzil)piperidin-4-il)metanamin (**19**)

Molekulska masa: C₁₃H₁₉BrN₂

Molska masa: 283,21 g/mol

Izgled: svetlo rjav oljnat produkt

TLC: R_f = 0,20 (Mf: DKM : MeOH = 5 : 1)

Orositveni reagent: ninhidrin

Izkoristek: η = 46,0 %

Tališče: /

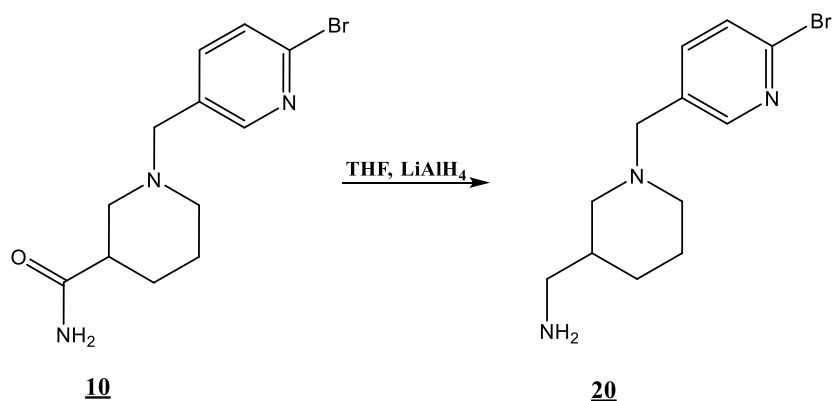
¹H (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 1.22 – 1.32 (m, 5H, NH₂CH₂CH₂), 1.67 – 1.70 (m, 2H, NCH₂), 1.92 – 1.98 (m, 2H, NCH₂), 2.56 – 2.58 (m, 2H, CH₂), 2.89 – 2.92 (m, 2H, CH₂)

^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3), δ (ppm): 29.95, 39.37, 48.19, 53.66, 63.49, 126.90, 128.14, 129.22, 138.52

MS (ESI+): $m/z = 283,1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, izračunan $m/z = 282,07$

IR (ATR): ν [cm^{-1}] = 699, 738, 809, 971, 1072, 1119, 1263, 1340, 1365, 1449, 1491, 1593, 2756, 2798, 2849, 2913

4.13 Sinteza (1-((6-bromopiridin-3-il)metil)piperidin-3-il)metanamina (20)



Slika 40: Reakcijska shema sinteze (1-((6-bromopiridin-3-il)metil)piperidin-3-il)metanamina (20)

V 25-mililitrsko bučko smo zatehtali 0,146 g spojine **10** (0,4916 mmol) in 15 mL brezvodnega THF. Reakcijsko zmes smo mešali in prepihovali z argonom pri sobni temperaturi 15 minut. Nato smo dodali 0,040 g LiAlH_4 (0,9830 mmol). Zmes smo mešali na oljni kopeli pri 80 °C dve uri, nato pa čez noč pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo bučko prestavili na ledeno kopel in po kapljicah dodali vodo v reakcijsko zmes. Reakcijski zmesi smo pri znižanem tlaku uparili THF. Nato smo ostanku v bučki dodali nekaj vode, da smo nadomestili volumen izparelega topila ter ekstrahirali z DKM (5 × 20 mL). Zbrane organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl, dodali sušilno sredstvo Na_2SO_4 , čez pol ure filtrirali in uparili DKM pri znižanem tlaku. Suh produkt smo očistili s pomočjo kolonske kromatografije (Mf: DKM : MeOH = 5 : 1 + Et_3N).

Ime: (1-((6-bromopiridin-3-il)metil)piperidin-3-il)metanamin (20)

Molekulska formula: $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{BrN}_3$

Molska masa: 284,20 g/mol

Izgled: temno rumen oljnat produkt

TLC: $R_f = 0,30$ (Mf: DKM : MeOH = 9 : 1)

Orositveni reagent: ninhidrin

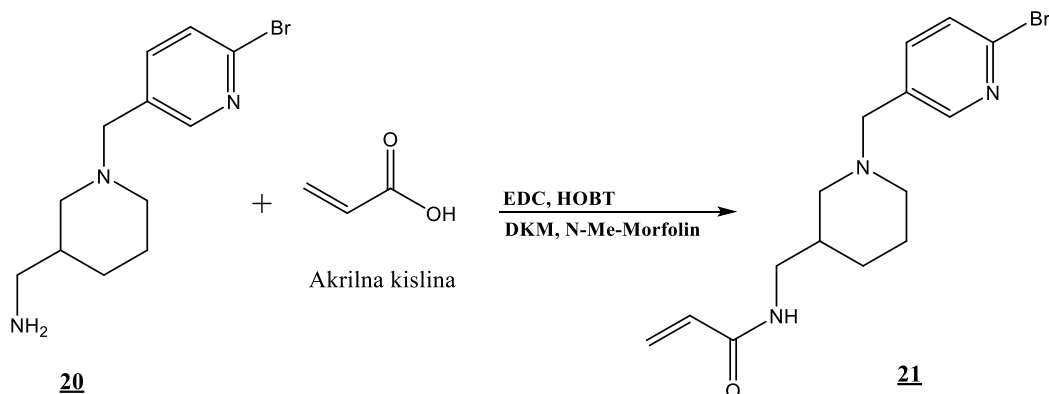
Izkoristek: $\eta = 71,0\%$

Tališče: /

MS (ESI+): $m/z = 284,1 [M+H]^+$, izračunan $m/z = 283,07$

IR (ATR): $\nu [cm^{-1}] = 544, 567, 625, 714, 761, 812, 1023, 1085, 1160, 1262, 1341, 1375, 1452, 1562, 1579, 1661, 2805, 2931$

4.14 Sinteza N-((1-((6-bromopiridin-3-il)metil)piperidin-3-il)metil)akrilamida (21)



Slika 41: Reakcijska shema sinteze N-((1-((6-bromopiridin-3-il)metil)piperidin-3-il)metil)akrilamida (21)

V 50-mililitrsko bučko, ki smo jo postavili na ledeno kopel, smo dodali 0,013 mL akrilne kisline, 0,0813 g EDC (0,4239 mmol), 0,0281 g HOBT (0,1837 mmol), 3 mL DKM, 3 kapljice N-metilmorfolina ter mešali na ledeni kopeli 15 minut. V drugi bučki smo raztopili 0,04 g spojine **20** (0,1413 mmol) v majhni količini DKM. Raztopino smo s kapalko prenesli v 50 mL bučko, odstavili ledeno kopel in čez noč mešali pri sobni temperaturi. Zjutraj smo ekstrahirali z NaHCO_3 (3×20 mL). Zbrane organske faze smo sprali z NaCl, dodali sušilno sredstvo Na_2SO_4 , čez pol ure filtrirali in uparili DKM pri znižanem tlaku. Suh preostanek smo očistili s pomočjo kolonske kromatografije (Mf: DKM : MeOH = 9 : 1). Po ^1H NMR analizi smo videli, da spekter ene frakcije vsebuje našo spojino.

Ime: N-((1-((6-bromopiridin-3-il)metil)piperidin-3-il)metil)akrilamid (**21**)

Molekulska formula: $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{BrN}_3\text{O}$

Molska masa: 338,25 g/mol

Izgled: rahlo rumen trd produkt

TLC: R_f = 0,36; 0,15 (Mf: DKM : MeOH = 9 : 1)

Orositveni reagent: /

Izkoristek: η = 50,0%

Tališče: 107,2 – 109,8°C

¹H (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 1.03 – 1.11 (m, 1H, CH₂), 1.51 – 1.55 (m, 1H, CH₂), 1.66 – 1.75 (m, 2H, NCH₂), 1.80 – 1.90 (m, 2H, NCH₂), 2.01 – 2.07 (m, 1H, CHCH₂), 2.64 – 2.73 (m, 2H, CHCH₂), 3.23 – 3.28 (m, 2H, Ar-CH₂), 5.63 – 5.70 (m, 2H, CONHCH₂), 6.24 – 6.28 (m, 1H, Ar-H), 7.42 – 7.44 (m, 1H, Ar-H), 7.53 – 7.55 (m, 1H, Ar-H), 8.26 – 8.27 (m, 1H, CONH)

¹³C NMR (400MHz, CDCl₃), δ (ppm): 24.48, 28.24, 36.47, 43.07, 53.95, 57.70, 59.73, 126.57, 127.83, 130.75, 139.36, 140.72, 150.53

MS (ESI+): m/z = 338,2 [M+H]⁺, izračunan m/z = 337,08

IR (ATR): ν [cm⁻¹] = 522, 631, 745, 994, 1044, 10901199, 1312, 1376, 1418, 1460, 1503, 1601, 1659, 1720, 2950, 3389

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

Ponekod so v sinteznih postopkih navedeni molski ekvivalenti (ekv) kot enota, z vidika preprostejšega opisa in razlaganja mehanizmov reakcij. S tem smo želeli bralcu olajšati razumevanje reakcij in bolj nazorno prikazati razmerja dodanih reagentov.

5.1 Alkiliranje

Vse sintezne poti smo začeli z izonipekotamidom in nipekotamidom. V prvi stopnji smo želeli vezati dodatno večjo lipofilno skupino, pri čemer so bili idealni derivati bifenila. Za to smo pri sintezi spojin **1** in **2** uporabili 4-bromobenzilbromid. Reakcija je potekala po Friedel-Craftsovem mehanizmu alkiliranja in je zahtevala brezvodne pogoje, zato smo v reakcijsko zmes dodali brezvodni etanol in K_2CO_3 . Prisotnost vode bi lahko pomenila, da reakcija ne bo potekla ali pa bo izkoristek manjši. K_2CO_3 smo dodali za nevtralizacijo bromovodikove kisline, ki se je sproščala med reakcijo, in zato, ker je higroskopen, reakcije pa so potekale v brezvodnih pogojih. 4-bromobenzilbromid smo dodali v presežku, da smo s tem pomaknili ravnotežje reakcije v smer nastanka produkta. Reakcijo smo izvajali pri temperaturi vrelišča etanola. Potek reakcije smo spremljali s TLC. Na ploščico smo nanесли izhodno spojino in reakcijsko zmes. Pod UV-lučko smo videli le produkte reakcije, saj samo ti vsebujejo aromatske obroče. Spojine smo opazovali pri valovni dolžini 254 nm. Po oroševanju ploščic z ninhidrinom in segrevanju le teh, smo lahko opazili tudi lise izhodnih spojin, saj so vsebovale amsko skupino. Lisa produkta je imela nižjo vrednost R_f kot lisa 4-bromobenzilbromida. Reakciji sta potekali čez noč in tudi po 18 urah nista popolnoma potekli, zato smo morali vmes ponovno dodati 4-bromobenzilbromid. Produkt smo izolirali z ekstrakcijo z DKM iz vode. Produkt je namreč topen v DKM in netopen v vodi. Ker je bila organska faza še precej motna, kar je nakazovalo na prisotnost vode, smo jo še dvakrat spirali z nasičeno NaCl, ki je zelo higroskopen in je vezala preostalo vodo iz organskih faz. Dokončno smo se vode znebili z dodatkom sušilnega sredstva, natrijevega sulfata. Ostanke 4-bromobenzil bromida smo se znebili tako, da smo produkt prelili s heksanom. 4-bromobenzil bromid se je v heksanu raztopil, produkt pa ne. Reakciji sta potekli z visokim izkoristkom.

Razlika med prej opisanima reakcijama in sintezo spojine **10** je ta, da smo pri slednji uporabili 2-bromo-5-(bromometil)piridin namesto 4-bromobenzilbromida. Pogoje smo ohranili enake. V tem primeru smo TLC orosili z bromkrezolnim zelenim, ki spojine s kislimi funkcionalnimi skupinami s pH pod 5,0 obarva rumeno. Do rumenega obarvanja pride zato, ker je barvilo v

vodnih raztopinah do pH 4.8 v protonirani obliki in rumene barve, pri višjem pH pa v deprotonirani obliki in značilno temno modre barve.

5.2 Suzukijeva reakcija

Omenjeni reakciji in njeni optimizaciji smo med raziskovalnim delom posvetili največ časa. V teoriji je to ne preveč zahtevna reakcija tvorbe biaromatskih sistemov, kjer sta reagenta boronska kislina in organski halogenid. Nujno potreben je tudi katalizatorski kompleks s paladijem ali sorodnimi prehodnimi elementi. V literaturi je omenjeno, da zahteva reakcija blage reakcijske pogoje in da poteka z visokimi izkoristki (27). V praksi smo naleteli na več težav pri izvedbi Suzukijeve reakcije. Mehanizem reakcije je sledeč: najprej poteče oksidativna adicija paladijevega kompleksa na halogenid, pri čemer nastane stabilen kompleks. Ta nato reagira z bazo in tvori intermediat s spremenjeno konfiguracijo. Oksidativna adicija je pogosto korak, ki določa hitrost katalitičnega cikla. Najbolj reaktiven je jod, nato brom in najmanj klor. Sledi reduktivna eliminacija želenega produkta, ki hkrati obnovi katalizator in zaključi katalitični cikel. Pomembno je, da smo pri reakciji uporabili razmeroma močno bazo, kot je K_2CO_3 , saj smo s tem dosegli selektivnost reakcije. Če bi uporabili šibko bazo, bi prišlo do navzkrižnega pripenjanja. Ali bomo dobili zmes produktov ali pa le zelen produkt je odvisno od tega, kakšno kombinacijo baze in katalizatorja izberemo (28).

Pri sintezi spojine **3** smo produktu sinteze spojine **2** dodali fenilboronsko kislino v prisotnosti vode in THF kot topilo, bazo K_2CO_3 in katalizator tetrakispaladij. S TLC smo spremljali potek reakcije in ugotovili, da ni potekla, zato smo dodali vodo, bazo in katalizator. Pri tej spojini smo se odločili narediti preparativni TLC (Mf: DKM : MeOH = 9 : 1). Postrgali smo tiste dele silikagela, kjer so bile lise najbolj izrazite, jih ločeno homogenizirali s palčko ter raztopili v DKM. Spektri vseh frakcij so bili zelo nečisti in v nobenem ni bilo načrtovanega produkta.

Pri sintezi spojine **4** smo se odločili, da ne bomo dodali vode in da bomo zamenjali katalizator. Namesto tetrakispaladija smo uporabili železov »sendvič kompleks«, imenovan ferocen (29). Ostale pogoje smo ohranili enake kot pri sintezi spojine **3**. Reakcijo smo spremljali s TLC, kot oroševalni reagent smo uporabili fosfomolibdensko kislino. Izolacija je potekala na enak način kot pri sintezi spojine **3**, s tem da je bil preostanek v bučki viskozen in rjave barve. Tudi tokrat smo produkt nanесли na preparativni TLC, le da smo uporabili

drugačno mobilno fazo (Mf: DKM : MeOH = 3 : 1). Na osnovi ^1H NMR spektrov smo ugotovili, da spojina ni prava.

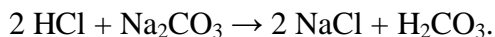
Pri sintezi spojine **5** smo se odločili, da bomo uporabili katalizator tetrakispaladij, kot pri sintezi spojine **3**, zamenjali pa bomo topilo. Namesto kombinacije THF in vode smo uporabili mešanico dioksana in vode. Zamenjali smo še bazo in namesto K_2CO_3 dodali natrijev acetat. Reakcijo smo nastavili brez uporabe hladilnika, ohranili pa smo argonovo atmosfero in temperaturo znižali na $70\text{ }^\circ\text{C}$. Tudi v tem primeru nam po izolaciji in čiščenju ni uspelo potrditi zelenega produkta.

Preden smo se znova lotili Suzukijeve reakcije, smo še dodatno očistili izhodno spojino s kolonsko kromatografijo. Namesto v bučkah smo reakciji sinteze spojin **6** in **7** izvajali v visokotlačnih reaktorjih volumnov 5 in 10 mL, ki je zgrajen tako, da uravnava tlak, ki nastane med potekom reakcije. S tem smo se izognili uporabi hladilnika in argonove atmosfere. Pazili smo na vrstni red dodajanja reagentov. Najprej smo v 5-mililitrski visokotlačni reaktor dodali spojino **2** in topili toluen in etanol. Ko se je spojina raztopila, smo s kapalko dodali bazo Na_2CO_3 in nato še katalizator. Čisto na koncu smo dodali boronat. V drugem primeru smo kot topili uporabili dioksan in metanol, bazo Na_2CO_3 , katalizator pa ferocen. Način priprave reakcije in zaporedje dodajanja reagentov sta bila enaka kot v primeru sinteze spojine **6**. Kromatograma sta bila zelo podobna tistemu pri sintezi spojine **5**, zato smo temperaturo povišali na $120\text{ }^\circ\text{C}$ in izolirali zeleni produkt. Po čiščenju spojine s kolonsko kromatografijo smo v eni frakciji dobili 38 mg vzorca. Po opravljeni ^1H NMR analizi smo videli, da bi vzorec lahko ustrezal naši spojini, a je bilo produkta zelo malo.

Iz podatkov, ki smo jih dobili pri neuspešnih eksperimentih, smo sklepali, da smo reakcije izvajali pri prenizkih temperaturah. Odločili smo se, da pri sintezi spojine **8** ponovimo reakcijo v visokotlačnem reaktorju z enakimi pogoji in reaktanti kot pri sintezi spojin **6** in **7**, le da temperaturo že na začetku nastavimo na $120\text{ }^\circ\text{C}$. Reakcije smo spremljali s TLC. Presenetilo nas je, da smo po tako kratkem času po dodatku vseh reagentov (5 minut) videli veliko lis v nanosu reakcijske zmesi. Nastale produkte sinteze spojine **8** smo poskušali očistiti s pomočjo kolonske kromatografije. Po posnetih ^1H NMR spektrih smo videli, da bi v dveh šibkih frakcijah lahko bila naša spojina, a je bilo količinsko tega produkta zelo malo.

Pri sintezi spojine **9** smo uporabili že obstoječ biaromatski sistem 4-bifenilkarboksaldehid. Po dodatku reducenta $\text{Na}(\text{OAc})_3\text{BH}$ smo bučko postavili na ledeno kopel, saj bi sicer lahko prišlo do burne reakcije. Pri izolaciji smo se z ekstrakcijo z enoolarnim NaOH znebili reducenta, ki je ostal raztopljen v vodni fazi. Pri naslednji ekstrakciji z 0,1-molarno HCl se je produkt v organski fazi ioniziral in prešel v vodno fazo. Kislo vodno fazo smo nevtralizirali s trdnim

Na₂CO₃. Za ekstrahiranje smo porabili 150 mL 0,1-molarne HCl, kar je 0,015 mol. Iz teh podatkov smo nato izračunali količino Na₂CO₃, potrebnega za nevtralizacijo vodne faze, kar je znašalo 0,7949 g. Za izračun potrebne količine trdnega Na₂CO₃ smo uporabili spodnjo enačbo:



Po ekstrahiranju z DKM je produkt prešel v organsko fazo. Po ¹H NMR analizi smo videli, da smo dobili pravo spojino.

Za neuspele Suzukijeve reakcije obstaja več razlogov. Prvi je ta, da smo reakcije izvajali pri prenizkih temperaturah, katalizatorja, ki smo ju uporabili, nista bila nova in zato nista bila tako učinkovita. Morda je bila napačna izbira kombinacije baze in topila. Zaključili smo, da bomo namesto Suzukijeve reakcije uporabili fragment, ki že ima biaromatski sistem na eni strani in aldehidno funkcionalno skupino na drugi, ter preko reduktivne aminacije aldehida vezali spojino na nipekotinski skelet.

5.3 Reduktivno aminiranje aldehida

Namesto fenilboronske kisline smo uporabili 4-bifenilkarboksaldehid in ga pripeli na izonipekotamid. Vlogo reducenta je imel Na(OAc)₃BH. S TLC smo spremljali potek reakcije. Reakcijsko zmes smo prelili v lij ločnik in ekstrahirali z enomolarnim NaOH. Produkt je bil kot baza v organski fazi, v vodni fazi pa je ostal raztopljen Na(OAc)₃BH. Organsko fazo smo nato ekstrahirali z 0,1-molarno HCl. Pri tem se je produkt protoniral in prešel v vodno fazo. Le to smo nato nevtralizirali s trdnim Na₂CO₃. Količino potrebnega Na₂CO₃ smo izračunali s porabo 0,1-molarne HCl pri ekstrahiranju. Posneli smo ¹H NMR in v spektru videli, da smo dobili pravo spojino. Strukturo smo potrdili še z IR, ¹³C NMR in MS.

5.4 Schotten-Baumannova reakcija

Pri omenjeni reakciji smo želeli sintetizirati molekulo, ki bi vsebovala na vezi med dušikom v nipekotinskem sistemu in bifenilnim fragmentom še karbonilni C-atom. Postopek sinteze je enak kot pri reduktivnem aminiranju aldehida, le da smo namesto 4-bifenilkarboksaldehida uporabili 4-bifenilkarbonil klorid. Pri tej reakciji dodamo še bazo, da nevtralizira kisle

protone, ki nastajajo med reakcijo kislinskega klorida z aminom. Vloga baze je tudi, da poskrbi, da se amin ne protonira, saj v protonirani obliki ne more reagirati kot nukleofil. V našem primeru smo dodali 3 ekv trietilamina. Na TLC ploščicah se v treh različnih R_f , ki smo jih izbrali, lise niso lepo ločile, ampak smo videli eno večjo razvlečeno liso. Razlog je bil ta, da je bil reagent, s katerim smo izvajali reakcijo, že star in je kislinski klorid najbrž hidroliziral do karboksilne kisline. V reakcijsko zmes smo zato dodali 1 molski ekvivalent reagenta za pripenjanje TBTU in nekaj mL DKM. Pri sobni temperaturi in pod argonovo atmosfero smo reakcijo pustili teči dva dni. Uspešnost reakcije smo preverili s TLC. Po dodatku sklopitvenega reagenta TBTU smo dobili nad nanosom reakcijske zmesi liso, ki je pred tem ni bilo. Preverili smo, če morda ta lisa pripada TBTU, a je imela lisa od TBTU nižji R_f kot lisa, ki se je pojavila na novo. Zato smo sklepali, da je lisa z višjim R_f najverjetneje lisa našega produkta. Produkt smo izolirali tako, da smo ga najprej ekstrahirali z 0,1-molarno HCl, nato pa še z enomolarnim NaOH. S tem smo se znebili ostankov izhodnih reagentov, naš produkt pa je ostal v organski fazi. Odparili smo topilo DKM in suh preostanek očistili s pomočjo kolonske kromatografije. Po opravljeni ^1H NMR analizi smo videli, da spojina ni ustrezala želenemu produktu.

5.5 Redukcija amida

Vse redukcije amidne skupine do aminske smo izvajali po enakem postopku. Reakcije so potekale v brezvodnih pogojih. Kot reducent smo uporabili LiAlH_4 . Potek reakcije smo spremljali s TLC. Ploščice smo orosili z ninhidrinom in jih segreli. Lisa pri nanosu reakcijske zmesi se je obarvala rjavo, kar je bilo pričakovano, saj naš produkt vsebuje aminsko funkcionalno skupino. Pri sintezi spojine **18** smo na TLC ploščicah videli, da je bil amin prisoten v obeh frakcijah. To ni bil pričakovan izid ekstrakcije. Možno je, da sta se pri reakciji reducirala oba dušika v spojini **17** ter da imamo v obeh fazah različni spojini.

5.6 Reakcije pripenjanja

Z reakcijami pripenjanja smo sintetizirali končne spojine. Postopek je bil pri vseh naštetih reakcijah enak. Ločeno smo v eni bučki raztopili produkt prej omenjene redukcije amida v zmesi topil DKM in DMF, v drugi pa kislino, ki smo jo želeli pripeti na spojino. V bučko s

kislino smo dodali 1,5 ekv TBTU, 3 ekv NMM, DMF in DKM. TBTU je reagent, ki sodeluje pri reakciji med primarnim aminom in karboksilno kislino, pri čemer nastane amidna vez, NMM pa ustvari bazične pogoje, ki so potrebni za izvedbo reakcije. Raztopino amina iz prve bučke smo po 20 minutah s kapalko dodali v drugo bučko. Ta čas je v drugi bučki potekala aktivacija karboksilne kisline, saj karboksilna funkcionalna skupina sama po sebi ni dovolj reaktivna, da bi omogočila potek reakcije. Ploščice smo orosili z oroševalnim reagentom bromkrezolnim zelenim.

Pri sintezi spojine **16** smo namesto 2-cianoocetne kisline uporabili akrilno kislino. Količina ostalih reagentov je ostala enaka. Po izolaciji produkta, ki je tudi potekala na enak način kot reakcija **15**, s katero smo pripravili prvo končno spojino, smo iz TLC videli, da imajo lise pri nanosu samo izhodne spojine **14** in nanosu produkta **16** zelo podobne Rf. Sodeč po tem smo sklepali, da je možno, da reakcija ni potekla do konca. Produktu smo vseeno posneli ^1H NMR spekter in videli, da je zelo nečist ter da je frakcije, kjer je prisotna vezana kislina zelo malo. Na podlagi teh rezultatov smo sklepali, da reakcija ni uspela.

Pri sintezi spojine **17** smo želeli izvesti reakcijo med izonipekotamidom in 5-fenilnikotinsko kislino. Tudi tokrat smo uporabili enak ekvivalent TBTU in NMM kot pri prejšnjih reakcijah. Zaporedje dodajanja reagentov je bilo enako kot pri prejšnjih reakcijah. Produktu smo posneli ^1H NMR spekter, iz katerega smo razbrali, da spojina ni bila prava, saj nismo nikjer videli vrhov, ki bi ustrezali naši spojini.

Reakcija sinteze spojine **21**, ki je končna spojina, je bila podobna reakciji sinteze spojine **16**. Ker smo pri reakciji **16** dobili zelo malo produkta, smo pri tokratni reakciji spremenili reagente. Namesto TBTU smo dodali 1,3 ekv HOBT, namesto NMM pa 3 ekv EDC. Ohranili smo topilo DKM in dodali par kapljic N-Me-morfolina, ki je poskrbel za bazične pogoje. Zaporedje dodajanja reagentov je bilo enako kot pri prejšnjih reakcijah. Izolacija je potekala z ekstrakcijo z NaHCO_3 . Večina produkta je ostala v organski fazi, v vodi pa so se raztopili ostanki nezreagiranih snovi. S TLC, ki smo ga izdelali v (Mf: DKM : MeOH = 9 : 1) so bile lise lepo ločene in s primernimi Rf, zato smo to Mf uporabili pri izdelavi kolonske kromatografije, s pomočjo katere so se lise lepo ločile. Zbrali smo posamezne frakcije in posneli ^1H NMR spektre. Opazili smo, da ena lisa ustreza naši spojini.

6. SKLEP

Namen magistrske naloge je bil optimizirati sintezno pot za pripravo spojin z nipekotinskim ali izonipekotinskim osnovnim skeletom, ki bi se kovalentno vezale v aktivno mesto imunoproteasoma. Že na začetku smo naleteli na težave pri izvedbi Suzukijeve reakcije, zato smo veliko časa porabili za njeno optimizacijo. Uspešno smo pripravili manjšo količino produktov, ki pa ni zadoščala za nadaljnje reakcije. Pri tem smo spreminjali reagente, katalizatorje, topila, temperaturo in laboratorijsko opremo za izvedbo reakcij.

Za pripravo derivatov je bila bistveno boljše metoda reduktivnega aminiranja, ki pa ima omejitve zlasti v naboru primernih reagentov in njihovi ceni. Omejeni smo zgolj na bifenilne derivate.

Redukcija amidne skupine je potekala brez težav s klasičnim postopkom, prav tako smo uspešno tvorili cianoacetamide in akrilamide kot končne spojine (15, 16 in 21), ki jih bodo biokemijsko ovrednotili na Katedri za klinično biokemijo.

7. LITERATURA

- (1) Eatemadi A, Aiyelabegan H T, Negahdari B, Mazlomi M A, Daraee H, Daraee N, Eatemadi R, Sadroddiny E: Role of protease and protease inhibitors in cancer pathogenesis and treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017; 86: 221–231.
- (2) Jukič M, Grabrijan K, Kadić S, de Lera Garrido F J, Sosič I, Gobes S, Obreza A: Chlorocarbonylsulfonyl Chloride Cyclizations Towards Piperidin-3-yl-oxathiazol-2-ones as Potential Covalent Inhibitors of Threonine Proteases. *Acta Chimica Slovenica* 2017; 64: 1–11.
- (3) Raynes R, Pomatto L C D, Davies K J A: Degradation of oxidized proteins by the proteasome: Distinguishing between the 20S, 26S, and immunoproteasome proteolytic pathways. *Molecular Aspects of Medicine* 2016; 50: 41–55.
- (4) Kisselev A F, Goldberg A L: Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chemistry & Biology* 2001; 8: 739–758.
- (5) Vu C B, Bridges R J, Pena-Rasgado C, Lacerda A E, Bordwell C, Sewell A, Nichols A J, Chandran S, Lonkar P, Picarella D, Ting A, Wensley A, Yeager M, Liu F: Fatty Acid Cysteamine Conjugates as Novel and Potent Autophagy Activators That Enhance the Correction of Misfolded F508del-Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR). *Journal of Medicinal Chemistry* 2017; 60: 458–473.
- (6) Masucci M G, Ciechanover A J: Ubiquitin-proteasome Proteolytic System, The: From Classical Biochemistry To Human Diseases. *Recent Advances in Human Biology* 2002; 9: 14–16.
- (7) Amm I, Sommer T, Wolf D H: Protein quality control and elimination of protein waste: The role of the ubiquitin-proteasome system. *Biochimica et Biophysica Acta* 2014; 1843: 182–196.
- (8) Bogyo M, McMaster J S, Gaczynska M, Tortorella D, Goldberg A L, Ploegh H: Covalent modification of the active site threonine of proteasomal β subunits and the *Escherichia coli* homolog HslV by a new class of inhibitors. *Biochemistry* 1997; 94: 6629–6634.
- (9) Kniepert A, Groettrup M: The unique functions of tissue-specific proteasomes. *Trends in Biochemical Sciences* 2014; 39: 17–24.
- (10) Muchamuel T, Basler M, Aujay M A, Suzuki E, Kalim K W, Lauer C, Sylvain C, Ring E R, Shields J, Jiang J, Shwonek P, Parlati F, Demo S D, Bennett M K, Kirk C J, Groettrup M: A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nature Medicine* 2009; 8: 781–788.
- (11) Weimershaus M, Evnouchidou I, Saveanu L, van Endert P: Peptidases trimming MHC class I ligands. *Current Opinion in Immunology* 2013; 25: 90–96.
- (12) Garcia-Lora A, Algarra I, Garrido F: MHC Class I Antigens, Immune Surveillance and Tumor Immune Escape. *Journal of Cellular Physiology* 2003; 195: 346–355.
- (13) Basler M, Kirk C J, Groettrup M: The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions. *Current Opinion in Immunology* 2013; 25: 74–80.
- (14) Huber E M, Groll M: Inhibitors for the Immuno- and Constitutive Proteasome: Current and Future Trends in Drug Development. *Angewandte Chemie* 2012; 51: 8708–8720.

- (15) Kaplan G S, Torcun C C, Grune T, Ozer N K, Karademir B: Proteasome inhibitors in cancer therapy: Treatment regimen and peripheral neuropathy as a side effect. *Free Radical Biology and Medicine* 2017; 103: 1–13.
- (16) Maher P: Proteasome inhibitors prevent oxidative stress-induced nerve cell death by a novel mechanism. *Biochemical Pharmacology* 2008; 75: 1994–2006.
- (17) Bruin G, Huber E M, Xin B, Rooden E J, Al-Ayed K, Kim K, Kisselev A F, Driessen C, van der Stelt M, van der Marel G, Groll M, Overkleeft H S: Structure-Based Design of β 1i or β 5i Specific Inhibitors of Human Immunoproteasomes. *Journal of Medicinal Chemistry* 2014; 57: 6197–6209.
- (18) Huber E M, Basler M, Schwab R, Heinmeyer W, Kirk C J, Groettrup M, Groll M: Immuno- and Constitutive Proteasome Crystal Structures Reveal Differences in Substrate and Inhibitor Specificity. *Cell* 2012; 148: 727–738.
- (19) Momose I, Kawada M: The therapeutic potential of microbial proteasome inhibitors. *International Immunopharmacology* 2016; 37: 23–30.
- (20) Bakas N A, Schultz C R, Yco L P, Roberts C C, Chang C A, Bachmann A S, Pirrung M C: Immunoproteasome inhibition and bioactivity of thiasyrbactins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2018; 26: 401–412.
- (21) Kolodziejek I, Misa-Villamil J C, Kaschani F, Clerc J, Gu C, Krahn D, Niessen S, Verdoes M, Willems L I, Overkleeft H S, Kaiser M, van der Hoorn R A L: Proteasome Activity Imaging and Profiling Characterizes Bacterial Effector Syringolin A. *Plant Physiology* 2011; 155: 477–489.
- (22) Piperdi B, Ling Y, Liebes L, Muggia F, Perez-Soler R: Bortezomib: Understanding the Mechanism of Action. *American Association for Cancer Research* 2011: 2029.
- (23) Troiano V, Scarbaci K, Ettari R, Micale N, Cerchia C, Pinto A, Schirmeister T, Novellino E, Grasso S, Lavecchia A, Zappala M: Optimization of peptidomimetic boronates bearing a P3 bicyclic scaffold as proteasome inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2014; 83: 1–14.
- (24) Gavazzoni M, Vizzardi E, Gorga E, Bonadei I, Rossi L, Belotti A, Rossi G, Ribolla R, Metra M, Raddino R: Mechanism of cardiovascular toxicity by proteasome inhibitors: New paradigm derived from clinical and pre-clinical evidence. *European Journal of Pharmacology* 2018; 828: 80–88.
- (25) Potts B C, Albitar M X, Anderson K C, Baritaki S, Berkers C, Bonavida B, Chandra J, Chauhan D, Cusack Jr. J C, Fenical W, Ghobrial I M, Groll M, Jensen P R, Lam K S, Lloyd G K, McBride W, McConkey D J, Miller C P, Neuteboom S T C, Oki Y, Ova H, Pajonk F, Richardson P G, Roccaro A M, Sloss C M, Spear M A, Valashi E, Younes A, Palladino M A: Marizomib, a Proteasome Inhibitor for All Seasons: Preclinical Profile and a Framework for Clinical Trials. *Current Cancer Drug Targets* 2011; 11(3): 254–284.
- (26) Levin N, Spencer A, Harrison S J, Chauhan D, Burrows F J, Anderson K C, Reich S D, Richardson P G, Trikha M: Marizomib irreversibly inhibits proteasome to overcome compensatory hyperactivation in multiple myeloma and solid tumour patients. *British Journal of Haematology* 2016; 174: 711–720.
- (27) Becht J M, Catala C, Drian C L, Wagner A: Synthesis of Biaryls via Decarboxylative Pd-Catalyzed Cross-Coupling Reaction. *Organic Letters* 2007; 9: 1781–1783.
- (28) Miyaura N, Suzuki A: Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chemical Reviews* 1995; 95: 2457–2483.

- (29) Bulygina L A, Khrushcheva N S, Sokolov V I: Application of the ferrocene-containing chelated palladacycles as catalysts in the Suzuki reaction. *Russian Chemical Bulletin, International Edition* 2011; 60: 258–260.