

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SELMIR KADIĆ

MAGISTRSKO DELO

Enoviti magistrski študijski program farmacije

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SELMIR KADIĆ

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA SUBSTITUIRANIH PIPERIDIN-3-IL-
OKSATIAZOL-2-ONOV KOT ZAVIRALCEV IMUNOPROTEASOMA**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF SUBSTITUTED PIPERIDIN-3-YL-
OXATHIAZOL-2-ONES AS IMMUNOPROTEASOME INHIBITORS**

MAGISTRSKO DELO

Ljubljana, 2018

Vse raziskave, poskusi, statistična obdelava ter računalniška obdelava so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvom prof. dr. Aleša Obreze, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Marka Jukiča, mag. farm.. Analitika je bila izvedena na Fakulteti za farmacijo – NMR, IR, MS ter MS na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani. Končna biokemična testiranja so bila izvedena na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko biokemijo.

Zahvala

Najprej bi se zahvalil svojemu mentorju, prof. dr. Alešu Obrezi, mag. farm. in somentorju asist. dr. Marku Jukiču, mag. farm. za njuno pomoč pri delu in za vse dragocene izkušnje, ki sem jih pridobil z delom. Prav tako bi se od srca zahvalil vsem zaposlenim, ki so mi pomagali ter vsem ki so mi stali ob strani tekom študija. Posebna zahvala gre moji družini in ženi, ki so mi ves čas tekom študija stali ob strani in mi dajali neizmerno podporo.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelal pod vodstvom mentorja prof. dr. Aleš Obreza, mag. farm. ter somentorja asist. dr. Marko Jukič, mag. farm..

Selmir Kadić

1 VSEBINA

1	VSEBINA	I
2	POVZETEK.....	IV
3	ABSTRACT.....	V
4	KLJUČNE BESEDE.....	VI
5	SEZNAM OKRAJŠAV.....	VI
6	UVOD	1
6.1	PROTEASOM	1
6.2	UBIKVITIN – PROTEASOMSKI SISTEM	2
6.3	PROTEASOM KOT TARČA ZDRAVIL	3
6.3.1	<i>Mehanizem proteolize proteasoma.....</i>	3
6.3.2	<i>Posledice zaviranja proteasoma in imunoproteasoma.....</i>	4
6.4	PEPTIDNI ZAVIRALCI	5
6.4.1	<i>Klinično uporabljeni</i>	6
6.4.1.1	Boronati.....	6
6.4.1.2	α' , β' - epoksiketoni	7
6.4.2	<i>Ostali.....</i>	8
6.4.2.1	Aldehydi	8
6.4.2.2	Vinil sulfoni.....	9
6.4.2.3	Vinil amidi – sribaktin	9
6.4.2.4	α – ketoaldehydi	10
6.4.2.5	β -laktoni	10
6.4.2.6	Oksatiazol-2-on-ski derivati	10
6.5	NEPEPTIDNI ZAVIRALCI - PRIHODNOST	11
7	NAČRT DELA	13
8	MATERIALI IN METODE.....	14
8.1	MATERIALI	14
8.2	METODE	15
8.3	APARATURE	16
9	EKSPERIMENTALNO DELO.....	16
9.1	SINTEZA 1-BENZILPIPERIDIN-4-KARBOKSILNE KISLINE IN NJENIH DERIVATOV	16
9.1.1	<i>Sinteza 1-benzilpiperidin-4-karboksilne kisline (1).....</i>	17
9.1.2	<i>Sinteza etil piperidin-4-karboksilata (2).....</i>	17
9.1.3	<i>Sinteza etil 1-benzilpiperidin-4-karboksilata (3)</i>	18
9.1.4	<i>Sinteza 1-benzilpiperidin-4-karboksilne kisline (4).....</i>	18
9.1.5	<i>Sinteza etil 1-(4-nitrobenzil)piperidin-4-karboksilata (5)</i>	19
9.1.6	<i>Sinteza etil 1-(4-ciano-2-fluorobenzil)piperidin-4-karboksilata (6).....</i>	20
9.2	SINTEZA 1-BENZILPIPERIDIN-3-KARBOKSAMIDA IN NJEGOVIH DERIVATOV	21
9.2.1	<i>Sinteza 1-benzilpiperidin-3-karboksamida (7) z reduktivnim aminiranjem</i>	21
9.2.2	<i>Sinteza 1-benzilpiperidin-3-karboksamida (7) z alkiliranjem</i>	22
9.2.3	<i>Sinteza 1-(4-nitrobenzil)piperidin-3-karboksamida (8).....</i>	23

9.2.4	<i>Sinteza 1-(4-ciano-2-fluorobenzil)piperidin-3-karboksamida (9)</i>	24
9.2.5	<i>Sinteza 1-(3-klorobenzil)piperidin-3-karboksamida (10)</i>	25
9.2.6	<i>Sinteza metil 4-((3-karbamoilpiperidin-1-il)metil)benzoata (11)</i>	26
9.3	SINTEZA 1-(4-AMINOBENZIL)PIPERIDIN-3-KARBOKSAMIDA (12)	26
9.4	SINTEZA 1-(4-BENZAMIDOBENZIL)PIPERIDIN-3-KARBOKSAMIDA (13)	27
9.5	SINTEZA 5-(1-BENZILPIPERIDIN-3-IL)-1,3,4-OKSATIAZOL-2-ONA IN NJEGOVIH DERIVATOV	28
9.5.1	<i>Poskusi sinteze 5-(1-benzilpiperidin-3-il)-1,3,4-oksatiazol-2-ona (14)</i>	28
9.5.2	<i>Sinteza 5-fenil-1,3,4-oksatiazol-2-ona (16)</i>	30
9.5.3	<i>Sinteza 5-(1-(4-nitrobenzil)piperidin-3-il)-1,3,4-oksatiazol-2-ona (17)</i>	31
9.5.4	<i>Sinteza metil 4-((3-(2-okso-1,3,4-oksatiazol-5-il)piperidin-1-il)metil)benzoata (19)</i>	33
9.5.5	<i>Sinteza 3-fluoro-4-((3-(2-okso-1,3,4-oksatiazol-5-il)piperidin-1-il)metil)benzonitrila (20)</i>	34
9.5.6	<i>Sinteza 5-(1-(3-klorobenzil)piperidin-3-il)-1,3,4-oksatiazol-2-ona (21)</i>	35
9.5.7	<i>Sinteza N-(4-((3-(2-okso-1,3,4-oksatiazol-5-il)piperidin-1-il)metil)fenil)benzamida (22)</i>	36
9.5.8	<i>Sinteza 5-(1-benzilpiperidin-3-il)-1,3,4-oksatiazol-2-ona (23)</i>	37
10	REZULTATI IN RAZPRAVA	38
10.1	SINTEZA 1-BENZILPIPERIDIN-4-KARBOKSILNE KISLINE	38
10.2	SINTEZA 1-BENZILPIPERIDIN-3-KARBOKSAMIDA IN NJEGOVIH DERIVATOV	39
10.3	SINTEZA 1-(4-BENZAMIDOBENZIL)PIPERIDIN-3-KARBOKSAMIDA	40
10.4	SINTEZA 5-(1-BENZILPIPERIDIN-3-IL)-1,3,4-OKSATIAZOL-2-ONA IN NJEGOVIH DERIVATOV	40
10.5	BIOKEMIČNO TESTIRANJE	42
11	SKLEP	43
12	LITERATURA	44

SLIKOVNO KAZALO

Slika 1: Shematični prikaz 3D struktur kombinacij 20S dela z regulatornim delom (povzeto po (5))	1
Slika 2: Shematični 3D prikaz sestave posameznih proteasomov (povzeto po (5))	2
Slika 3: Shematični prikaz UPS-a (E1 – ubikvitin aktivirajoči encimi, E2 – ubikvitin konjugirajoči encimi, E3 – ubikvitin ligaze)	3
Slika 4: Kemijske strukture klinično uporabljenih zaviralcev imunoproteasoma	5
Slika 5: Mehanizem delovanja boronatov	6
Slika 6: Kemijske strukture boronatnih derivatov zaviralcev proteasoma	6
Slika 7: Mehanizem delovanja α' , β' - epoksiketonov	7
Slika 8: Kemijske strukture epoksimicina (1f) ter oprozomiba (1g)	7
Slika 9: Prvi selektivni zaviralci imunoproteasoma	8
Slika 10: Mehanizem delovanja aldehidov	9
Slika 11: Mehanizem delovanja vinil sulfonov	9
Slika 12: Mehanizem delovanja vinil amidov - sirbaktina	9
Slika 13: Mehanizem delovanja α – ketoaldehidov	10
Slika 14: Mehanizem β -laktonov	10
Slika 15: Mehanizem delovanja oksatiazol-2-on-ovih derivatov	11
<i>Slika 16: Struktura HT1054 in marizomiba</i>	11
Slika 17: SAR psoralenskih reverzibilnih zaviralcev proteasoma	12
Slika 18: Načrt dela magistrske naloge	13
Slika 19: Pilotni sintezni načrt	14
Slika 20: Predlagani mehanizem pretvorbe primarnih amidov do nitrilov	41
Slika 21: Možne stranske reakcije ciklizacije	41
Slika 22: IC50 vrednosti končnih spojin za prečiščen človeški iCP	42
Slika 23: Strukture končnih spojin s pripadajočimi IC50 vrednostmi v μM	43
Tabela I: derivati 5-(1-benzilpiperidin-3-il)-1,3,4-oksatiazol-2-ona	28

2 POVZETEK

Med najpomembnejše procese pri uravnavanju homeostaze v evkariontskih celicah sodi razgradnja beljakovin ali proteoliza. V vseh evkariontskih celicah obstajajo specializirane strukture, ki opravljajo to nalogu in mednje sodi tudi proteasom. Poleg konstitutivne oblike, ki je v vseh celicah, ter timoproteasoma v priželjcu, obstaja še posebna oblika – imunoproteasom, v celicah imunskega izvora. Ker je vpletен v imunski proces, je postal zanimiva tarča za zdravljenje številnih avtoimunskih ter rakavih bolezni. Raziskave potekajo zlasti v smeri iskanja selektivnega zaviralca z nepeptidnim skeletom. Ena takšnih raziskav so opravili tudi na Fakulteti za farmacijo, nadaljevanje le-te pa je bila vsebina naše magistrske naloge.

Z računalniško poenostavitvijo psoralenskih derivatov smo dobili spojine z nipekotinskim skeletom in oksatiazol-2-onskim elektrofilnim centrom. Identificirali smo dve kritični reakcijski stopnji. Prva je bila vezava aromatskih sintonov na osnovni skelet, druga pa ciklizacija amidne skupine s klorokarbonilsulfenilkloridom.

V prvi stopnji smo poskusili tvoriti terciarne amine z reduktivnim aminiranjem, ki je bilo nezanesljivo, saj so bili izkoristki zanemarljivi. Alkiliranje piperidinskega dušika z derivati benzilbromida, v dimetilformamidu, na 100 °C, ob dodatku natrijevega karbonata, pa je bilo zelo uspešno, tako da smo na ta način pripravili vse karboksamidne derivate.

Pri drugi stopnji smo imeli precej več težav. Nobena izmed reakcij ciklizacije, opisanih v literaturi, ni bila uspešna. Največkrat smo kot produkt dobili zmes številnih stranskih produktov. Rezultati poskusa v piridinu kot topilu so bili prelomni, saj smo odkrili pomemben stranski produkt, ki je vseboval nitrilno skupino. Ugotovili smo, da je potekla dehidracija karboksamida. Po sistematični optimizaciji pogojev smo ugotovili, da segrevanje karboksamidov s klorokarbonilsulfenilkloridom v dioksanu na 100 °C, ob dodatku natrijevega karbonata daje želen oksatiazol-2-onski elektrofilni center. Pripravili smo šest končnih spojin in jih biokemično testirali.

Rezultati testiranj so pokazali, da je bil najmočnejši derivat z večjim, lipofilnim fragmentom. Tudi položaj halogena na aromatskem delu vpliva na jakost, saj so se halogenski derivati med seboj razlikovali za faktor 3. Z našo nalogo smo odkrili pogoje za sintezo novih, potencialnih zaviralcev imunoproteasoma in rezultate objavili v znanstveni publikaciji.

3 ABSTRACT

Proteolysis is one of crucial processes in intracellular homeostasis. Among the structures, responsible for protein breakdown, is also proteasome. Three different forms are present, a constitutive form, located in all cells, thymoproteasome in the thymus and immunoproteasome in hematopoietic cells. The latter is involved in immune responses. As such it has become a potential target for treatment of autoimmune and cancer-related diseases. The main goal is to find a non-peptidic compound with great selectivity towards immunoproteasome. Such research was also conducted on Faculty of pharmacy and its follow-up is this master thesis.

It was discovered that psoralene derivatives exhibited better inhibition and were more selective than the only currently clinically used selective immunoproteasome inhibitor. Using rescaffolding approach, we simplified their structure and turned to piperidine derivatives, with an oxathiazol-2-one electrophilic center. Two crucial synthetic steps were identified. First one was the linking of aromatic synthones on the main nipecotic frame. The second one was the cyclisation of amide functional group with chlorocarbonylsulfenylchloride, towards oxathiazole-2-one moiety.

We started the synthesis of tertiary amines by reductive amination, which was unsuccessful, due to low yields. The alkylation of the piperidine nitrogen with benzyl bromide derivatives in dimethylformamide, at 100°C, with the addition of sodium carbonate as a base, proved to be very efficient. All carboxamide derivatives were produced in such manner.

More problems awaited us during the cyclisation. No reaction could be recreated according to the published procedures. In most cases, we got a mixture of compounds as our product. The experiment in pyridine changed everything, as we identified a major side product with a nitrile functional group. This led us to the conclusion that a dehydration of carboxamide was taking place. After optimizing the reaction conditions, we finally found that heating of carboxamides with chlorocarbonylsulfenylchloride in dioxane at 100°C, and with sodium carbonate as base, gave us our target compound. Six compounds were prepared and were biochemically tested.

The derivatives with larger, lipophilic fragment exhibited the strongest potency. The effect of the position of halogens on potency was also interesting, since halogen derivatives differed in potency up to threefold between themselves. We managed to

discover proper conditions for creating new immunoproteasome inhibitors and published the results in a scientific paper.

4 KLJUČNE BESEDE

Treoninska proteaza, kovalentni inhibitor, oksatiazol-2-on, ciklizacija, proteasom.

5 SEZNAM OKRAJŠAV

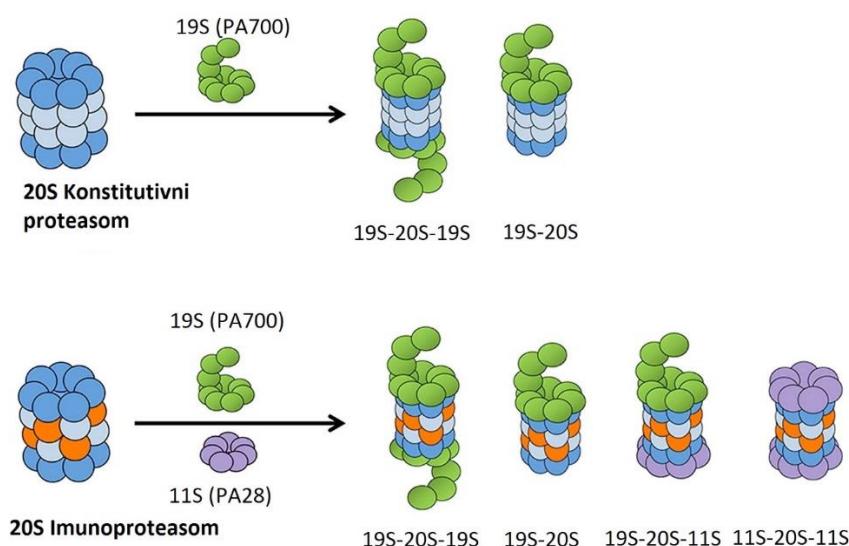
CP	proteasomski jedrni del (20S)
cCP	konstitutivni proteasom
iCP	imunoproteasom
tCP	timoproteasom
DCM	diklorometan
DMF	dimetilformamid
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
ekv	ekvivalent
HOBr	hidroksibenzotriazol
IFN γ	interferon gama
IL	interlevkin
IR	infrardeča spektroskopija
MCL	limfom plaščnih celic
MHC-I	poglavitni kompleks tkivne skladnosti
MS	masna spektrometrija
NF- κ B	jedrni dejavnik kapa B
NMR	jedrska magnetna resonanca
PEG	polietilenglikol
ST	sobna temperatura
Th	T celice pomagalke
THF	tetrahidrofuran
Thr	treoninski ostanek
TLC	tankoplastna kromatografija
TNF- α	dejavnik tumorske nekroze alfa
UPS	ubikvitin-proteasomski sistem

6 UVOD

6.1 Proteasom

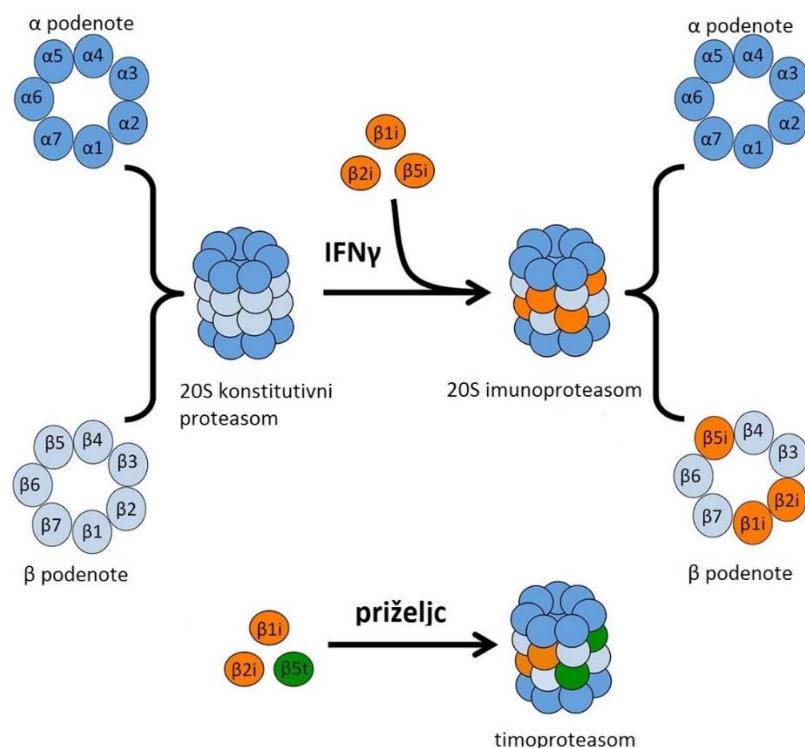
Med najpomembnejše procese pri uravnavanju homeostaze v evkariontskih celicah sodi proteoliza. Proteoliza je razgradnja beljakovin do krajših peptidnih fragmentov, ali pa do aminokislin. Ti so nato lahko gradniki za nove beljakovine, ki se sintetizirajo na ribosomih, ali pa se kot antigeni vežejo na MHC-I receptorje. V celicah so zato specializirane strukture, katerih glavna naloga je proteoliza. Ena takšnih struktur je tudi proteasom.

Proteasom je beljakovinski kompleks, velik 2000 kDA. V vseh sesalskih celicah je citosolni 26S proteasom, sestavljen iz 20S jedrnega dela (20S CP) ter dveh regulatornih delov, ki sta lahko 19S (PA700), 11S (PA28) ali pa hibrid obej (Slika 1) (1). 20S del vsakega proteasoma je sestavljen iz 4 obročev, vsak ima po 7 podenot. α -podenote so na zunanjih dveh obročih in služijo za interakcijo z regulatornimi kompleksi PA28 oz. PA700, tako da tvorijo zaporo za vstop naključnih substratov (2). β -podenote so na notranjih obročih ter izražajo nelizosomalno proteazno aktivnost (3). (Slika 1) Posledica takšne strukture je, da lahko teoretično obstaja 36 različic 20S dela, ki se razlikujejo tako v proteolitični kapaciteti in selektivnosti (2). Proteasom predstavlja jedro ubikvitin-proteasomskega sistema (UPS). Le-ta je pomemben dejavnik v vzdrževanju celične homeostaze ter številnih procesov, kot so predstavitev antigenov, prevajanje signalov, celična delitev in apoptoza (4).



Slika 1: Shematični prikaz 3D struktur kombinacij 20S dela z regulatornim delom (povzeto po (5))

Poleg konstitutivno izraženega cCP obstajata še dve obliki 20S jedrnega dela. Prva je tCP ali timoproteasom, druga je iCP ali imunoproteasom. tCP najdemo v epitelijskih celicah priželjca, iCP pa pretežno v celicah krvotvornega izvora (Slika 2) (1,3). Ob akutnih stresnih in imunskeih odgovorih, lahko pod vplivom TNF- α ter IFN γ , pride do izražanja iCP aktivnih β -podenot tudi v celicah nekrvotvornega izvora (4). Za imunoproteasom je zelo pomembna regulatorna podenota 11S. Sposobna je razgradnje krajših peptidov, ne pa celotnih beljakovin. Na ta način nastajajo peptidi, ki se vežejo na poglavitni kompleks tkivne skladnosti. Ekspresijo 11S podenote močno poveča IFN γ . Ob vezavi 11S na 20S pride do strukturnih sprememb, ki imajo za posledico odprtje centralnega prostora, kar omogoči vstop beljakovin v proteasom.

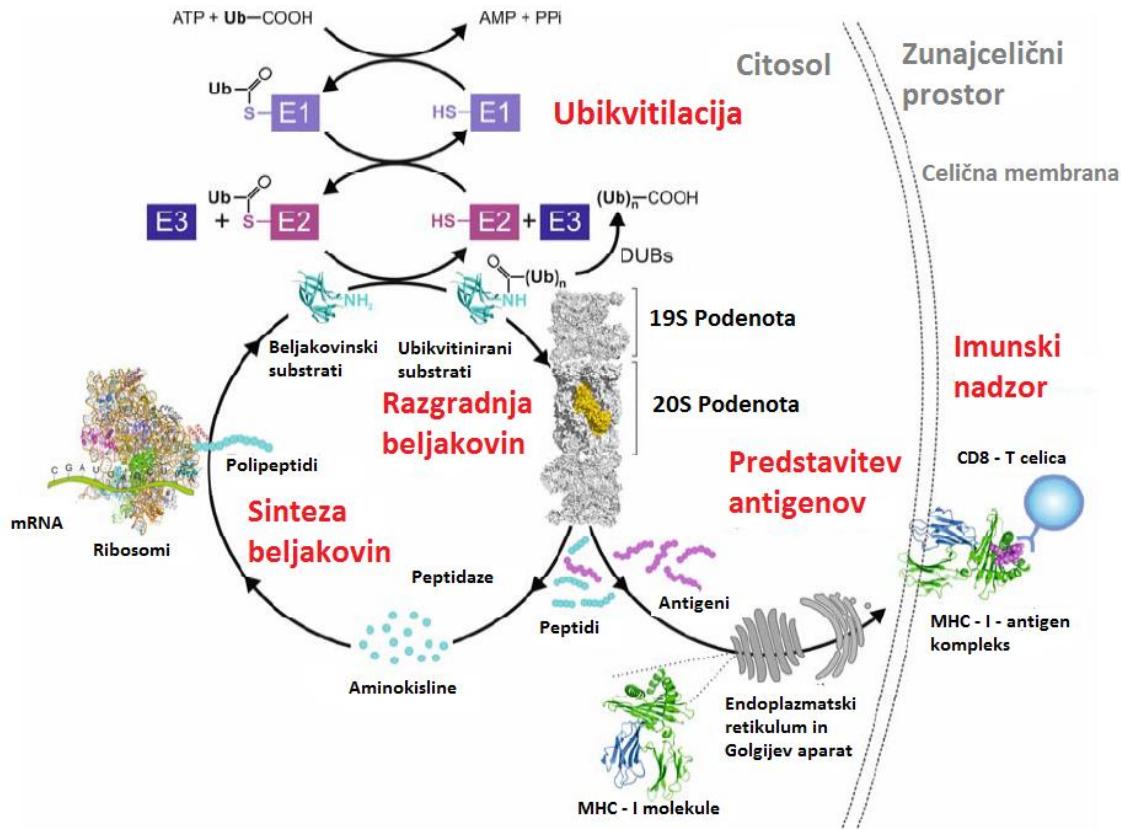


Slika 2: Shematični 3D prikaz sestave posameznih proteasomov (povzeto po (5))

6.2 Ubikvitin – proteasomski sistem

V celici poteka razgradnja beljakovin na dva načina. Eden od teh je lizosomski, ki predstavlja 10 % celotne razgradnje ter drugi, nelizosomski, katerega glavni predstavnik je UPS in predstavlja 90 % razgradnje (6). UPS deluje tako, da ubikvitin ligaza veže majhne molekule ubikvitina bodisi na nepravilno zvite beljakovine ali pa mediatorje, ki sodelujejo v celični proliferaciji ali prenosu signala ter imunskega odziva. Po ubikvitinaciji nastane

kompleks, ki pride v stik z regulatornim delom proteasoma. Te zunanje podenote proteasoma zaznajo substrat, sprožijo deubikvitinacijo, razvijejo beljakovine ter jih prenesejo v 20S podenoto. Ta ima proteazne lastnosti v svojih $\beta 1$, $\beta 2$ ter $\beta 5$ katalitičnih podenotah in tako beljakovine razgradi na oligopeptide (2,4) (Slika 3).



Slika 3: Shematični prikaz UPS-a (E1 – ubikvitin aktivirajoči encimi, E2 – ubikvitin konjugirajoči encimi, E3 – ubikvitin ligaze)

Tu ima ključno vlogo iCP, saj je v miših z oslabljeno ali odsotno aktivnostjo iCP dokazano, da je prizadeto oz. spremenjeno izražanje epitopov prek MCH-I. Prav tako je iCP tudi udeležen v diferenciaciji T celic, ter v sintezi provnetnih citokinov (3). Zaradi te pomembne vloge v regulaciji homeostaze celice je proteasom postal zanimiva tarča za nove učinkovine na področju avtoimunskeih bolezni.

6.3 Proteasom kot tarča zdravil

6.3.1 Mehanizem proteolize proteasoma

Glavni del vsake katalitično aktivne podenote 20S je treoninski ostanek Thr1, ki je sestavni del aktivnih mest, sposobnih tvorbe številnih vodikovih vezi s substratom. Ob vezavi substrata H-vezi stabilizirajo peptidno verigo beljakovine in na ta način se podaljša

zadrževanje beljakovine znotraj proteasoma. Nato se začne hidroliza peptidne vezi z nukleofilnim napadom hidroksilne skupine Thr1O^γ na karbonilni C atom peptidne vezi. Nastane acil-encimski intermediat. C-končni del se nato sprosti s pomočjo molekule vode, ki na ta način tudi obnovi aktivno mesto. Ker ima vsaka podenota svoj posebni način razgradnje beljakovin, jih poimenujemo po encimih s podobnimi mehanizmi hidrolize. Tako β1-podenoti pravimo tudi kaspazam podobna proteaza, ki cepi peptidne vezi kislinskih ostankov, β2 je tripsinu podobna proteaza, ki cepi peptidne vezi bazičnih ostankov ter β5 kimotripsinu podobna proteaza, ki cepi peptidne vezi s hidrofobnimi ostanki (6).

Pristop k raziskavam zaviralcev proteasoma je bil v glavnem usmerjen v smer iskanja peptidomimetikov, ki posnemajo strukturo in način vezave naravnih substratov. Prav tako morajo vsebovati reaktivni del molekule, odgovoren za tvorbo kovalentnih interakcij s treoninskim Thr1 ostankom v aktivnem mestu, ki je, kot vidimo, ključnega pomena za proteazno aktivnost proteasoma. Kemijsko gre za napad nukleofilnega Thr1O^γ na elektrofilni karbonilni del zaviralca. Prioriteta raziskav je postala iskanje idealnega elektrofilnega fragmenta molekule. Mnoge raziskave so razkrile, da so najboljši derivati aldehidov, vinil sulfonov, sirbaktina, boronatov, epoksiketonov, α-keto aldehidov, β-laktonov ter kot zadnji trend v razvoju novih zaviralcev, oksatiazol-2-onov (3). Slednji imajo praviloma večjo selektivnost za iCP in so zato precej bolj zanimivi, saj imajo manj neželenih učinkov in so bolj usmerjeni v zdravljenje avtoimunskih bolezni. Neželeni učinki neselektivnih zaviralcev so pogosti, saj je dokazano, da povzročajo periferne nevropatije, hipotenzijo, akutni respiratorni distresni sindrom, srčno popuščanje, utrujenost, slabost (7).

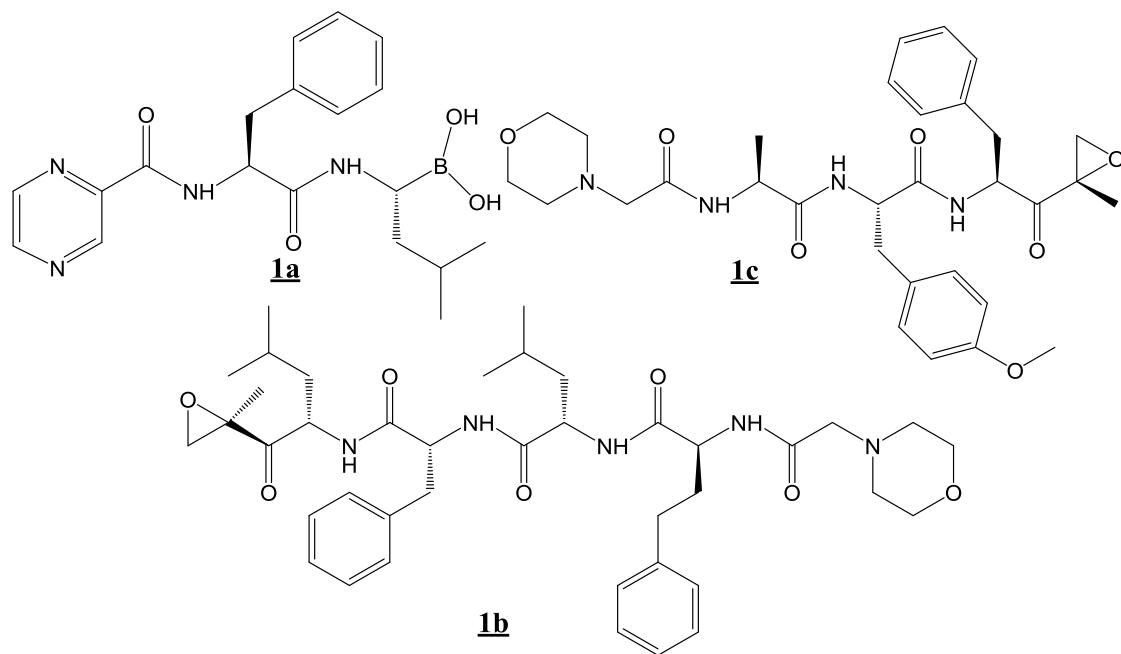
6.3.2 Posledice zaviranja proteasoma in imunoproteasoma

Zaviranje proteasoma vodi v kopičenje nepravilno zvitih beljakovin in kisikovih reaktivnih zvrsti, zaradi česar pride do celičnega stresa in posledično odgovora nanj. Prav tako prepreči razgradnjo antionkogenov, kot je npr. zaviralec od ciklina odvisne kinaze p27^{Kip1}. Posledica je tudi zmanjšana aktivnost provnetnih poti, npr. preko NF-κB (3). Na ta način pride do kopičenja proapoptočnih dejavnikov, kar vodi v apoptizo. Takšen način delovanja je podlaga za uporabo zaviralcev proteasoma v zdravljenju različnih vrst raka, saj so rakave celice bolj občutljive na zmanjšano aktivnost CP zaradi povečanega metabolizma. Poleg tega je zaradi pospešene sinteze beljakovin tudi veliko več napak v zvijanju in hitro pride do akumulacije večjih količin nepravilno zvitih beljakovin, za kar pa potrebujejo proteasom, saj sicer pride do že prej omenjenega celičnega stresa. Takšen stres

pa zdrave celice nekoliko lažje prenesejo kot pa rakave (3).

Prva neselektivna zaviralca na tržišču sta bila bortezomib (Slika 4-**1a**) in karfilzomib (Slika 4-**1b**) za zdravljenje multiplega mieloma in MCL, posebne oblike ne-Hodgkinovega limfoma (4). Številne zaviralce so sintetizirali na osnovi strukture substrata v aktivnem mestu, upoštevajoč kristalno strukturo 20S iz mikroorganizmov *Thermoplasma acidophilum*, *Saccharomyces cerevisiae* (3).

Glede aktivnih mest 20S dela se je pokazalo, da so najbolj ugodni selektivni zaviralci podenote β 5i. Razlog se skriva v tem, da sta si mesti β 2i in β 2c strukturno zelo podobni in je zelo težko doseči selektivnost. Za vezavno mesto β 1 so odkrili zaviralce, ki naj bi bili selektivni, vendar so poznejše raziskave odkrile, da zavirajo tudi β 5-podenoto (3). Primer β 5-selektivnega zaviralca je PR-957 (Slika 4-**1c**), vendar so ti trenutno zelo redki in razen omenjene spojine niso v klinični uporabi. Študije pa kažejo na to, da ima zaviranje podenote β 5i mnogo večji terapevtski učinek kot pa ostali dve aktivni mesti. Problem trenutnih selektivnih zaviralcev je tudi, da imajo pretežno peptidno ogrodje, zaradi česar imajo slabšo biološko uporabnost in zahtevajo intravensko aplikacijo (3).



Slika 4: Kemijske strukture klinično uporabljenih zaviralcev imunoproteasoma

6.4 Peptidni zaviralci

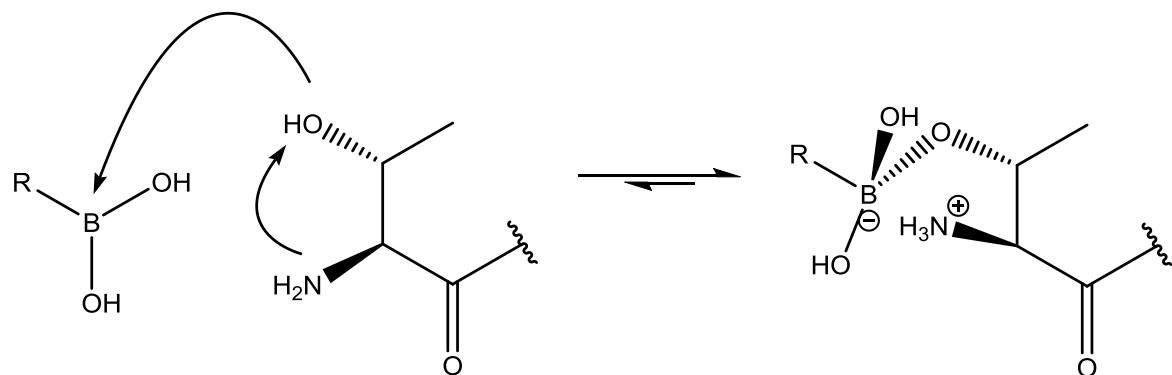
Med redkimi danes znanimi zaviralci proteasomov lahko ločimo tiste, ki so v klinični uporabi ter tiste, ki služijo zgolj raziskavam oz. imajo potencial za razvoj

morebitnih novih spojin. Glede na elektrofilni center, ki je najpomembnejši del molekule, jih bomo razdelili v več vrst.

6.4.1 Klinično uporabljeni

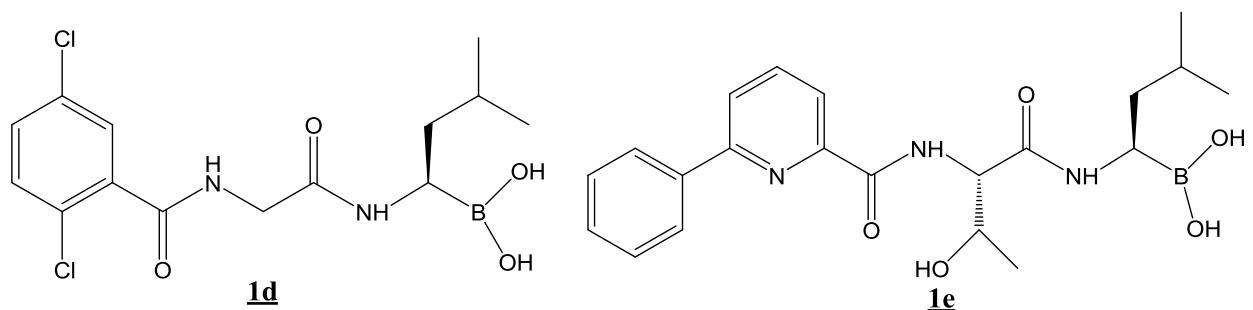
6.4.1.1 Boronati

Med boronati prednjači prvi uporabljeni zaviralec, dipeptid bortezomib (Slika 4-**1a**). Njegov mehanizem delovanja temelji na nastanku tetraedričnega prehodnega stanja, ki ga stabilizira nastanek vodikove vezi s Thr1N (Slika 5) (6).



Slika 5: Mehanizem delovanja boronatov

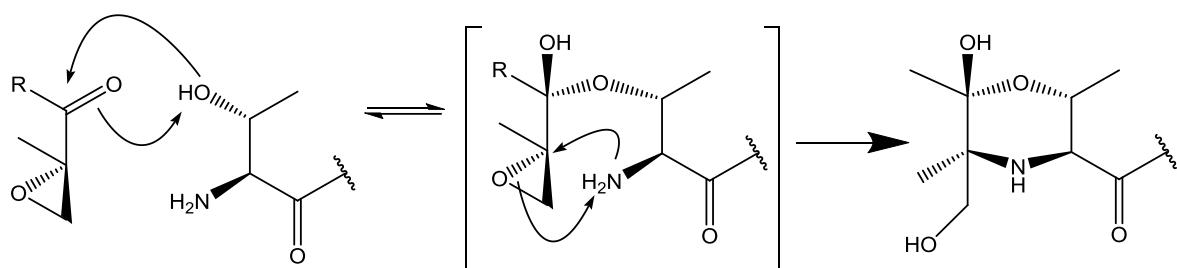
Zaradi peptidne strukture se aplicira intravensko. Z željo po izboljšanju načina aplikacije v manj invazivno metodo, so bili sintetizirani tudi iksazomib (Slika 6 -**1d**) za peroralno uporabo, ter derivat bortezomiba, delanzomib, ki se prav tako aplicira peroralno (Slika 6-**1e**). Problematika zdravljenja z bortezomibom so periferne nevropatije, ki se pojavljajo v kar 30 % primerov. Razlog zanje naj bi bile neželene interakcije s serinskimi proteazami v živčnih celicah zaradi njegove neselektivnosti (6).



Slika 6: Kemijske strukture boronatnih derivatov zaviralcev proteasoma

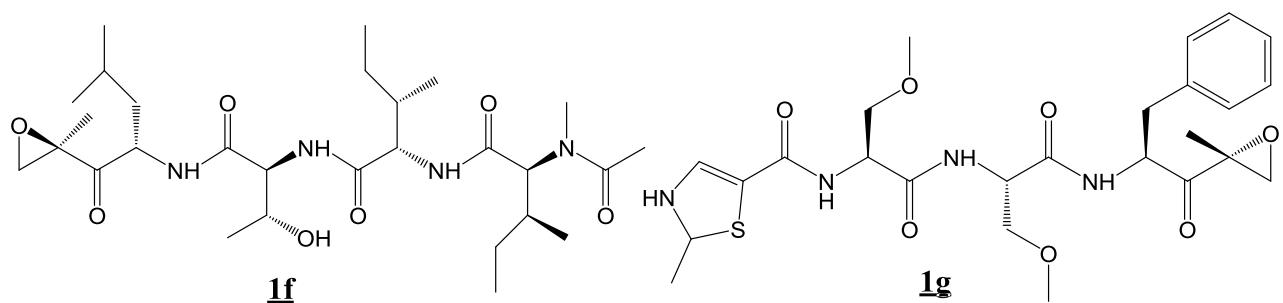
6.4.1.2 α' , β' - epoksiketoni

2012 leta je na trg prišel prvi α' , β' – epoksiketonski derivat karfilzomib (Slika 4-**1b**), kot zdravilo druge linije, pri ponovnem ali refraktornem multiplem mielomu. Gre za polsintežni produkt, derivatiziran iz epoksimicina, ki ga proizvajajo *Actinomycetes* (Slika 8 – **1f**). Reakcija poteka po drugačnem, dvostopenjskem mehanizmu, saj ima dva elektrofilna centra. Najprej poteče reakcija med Thr1O^γ in karbonilnim delom substrata, pri čemer nastane hemiketal. Naslednja stopnja je nato reakcija med Thr1N in epoksidnim delom substratne molekule. Irreverzibilno nastane morfolinski obroč (Slika 7).



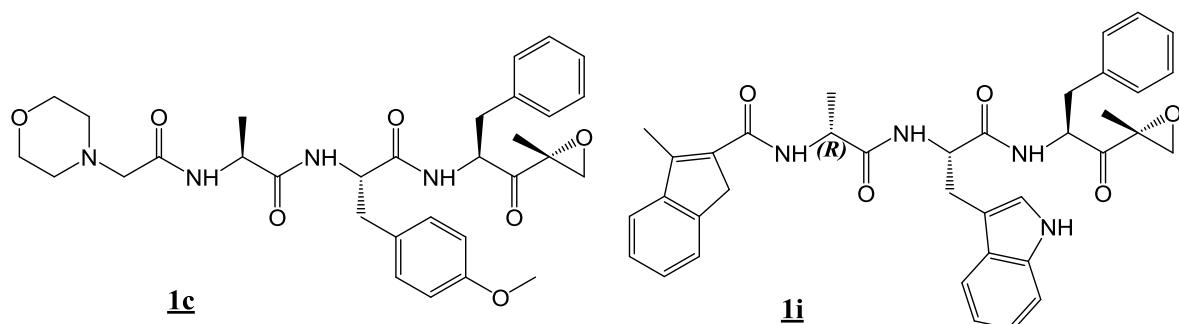
Slika 7: Mehanizem delovanja α' , β' - epoksiketonov

Posledično naj bi imel večjo selektivnost do proteasoma napram ostalim serinskim proteazam, kot je to primer pri bortezomibu. Tudi pri karfilzomibu, ki se aplicira intravensko, je šla raziskava v smer derivatov, ki bi jih lahko aplicirali peroralno. Tako je trenutno v 1. fazi kliničnih študij oprozomib (Slika 8 -**1g**). Ta naj bi bil bolj selektiven do β 5c/ β 5i, trenutno pa so naporji usmerjeni v izboljšanje farmakokinetičnega profila, kjer naj bi PEG polimerna veriga povečala topnost in izboljšala porazdeljevanje učinkovine. Zaradi izjemno kratkega razpolovnega časa 30 min je velika želja po razvoju predzdravila z aktiviranimi dioli kot prekurzorjem epoksiketonskega fragmenta (6).



Slika 8: Kemijske strukture epoksimicina (1f) ter oprozomiba (1g)

α' , β' - epoksiketonski reaktivni fragment je prisoten tudi pri zadnji skupini in najnovejši generaciji zaviralcev proteasoma, in sicer selektivnih zaviralcih imunoproteasoma. Prvi iCP selektivni zaviralec PR-957 (ONX 0914) (Slika 4/9 – **1c**) kaže 9-krat večjo selektivnost do β 5i kot do β 5c. Prednost selektivnega delovanja je ta, da se izražanje antigenov MHC-I zmanjša za kar 50 %, pri čemer pa ne vpliva na epitope, ki niso odvisni od β 5i. Posledično je torej zmanjšan citotoksični učinek celic T. Prav tako spojina zmanjša sintezo provnetnih dejavnikov, kot so citokini, interlevkini IL-6, IL-23 in TNF- α , le-ti pa so ključnega pomena pri razvoju celic T pomagalk, posebej Th1 in Th17. Potencialno bi se lahko zato zdravile bolezni, kot so kronična vnetna črevesna bolezen, revmatoidni artritis, psoriaza, sistemski lupus, Hashimotov tiroiditis, kolitis in avtoimunski encefalomelitis. Vse študije so sicer bile izvedene na miših (6). Za samo zdravljenje rakavih obolenj, pa selektivnost do iCP nima velikega vpliva, saj so odmerki potrebni za učinek že tolikšni, da zaviralec zavira tudi cCP in izgubi svojo selektivnost. Ta poskus je bil opravljen in dokazan s pomočjo derivata, ki je imel 132× večjo selektivnost za iCP kot za cCP, PR-924 (6) (Slika 9 – **1i**).



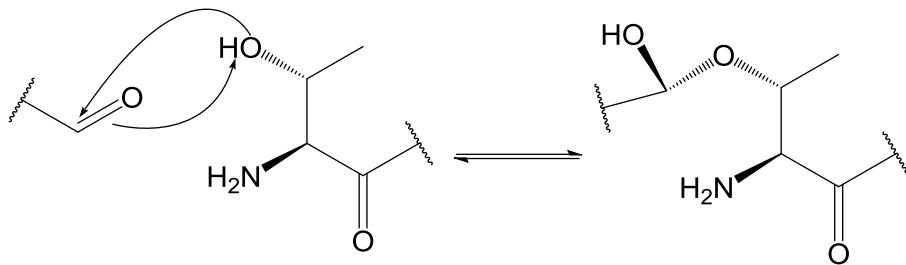
Slika 9:Prvi selektivni zavirali imunoproteasoma

6.4.2 Ostali

6.4.2.1 Aldehidi

Mehanizem delovanja aldehydov temelji na nastanku reverzibilnega hemiacetala. Ta nastane prek napada $\text{Thr}1\text{O}^{\gamma}$ na karbonilni C-atom aldehyda. Problematika teh zaviralcev je

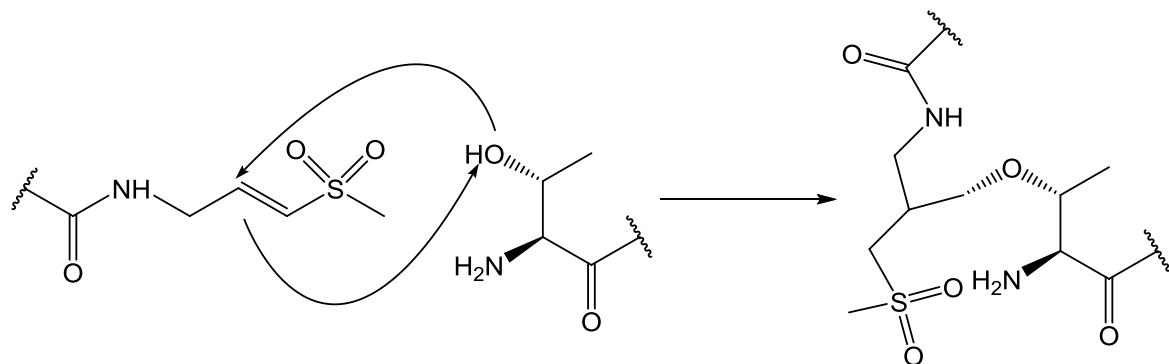
kratek razpolovni čas spojin, ki se hitro oksidirajo, ter neselektivnost do proteasoma, saj reagirajo tudi s serinskimi in cisteinskimi proteazami (3).



Slika 10: Mehanizem delovanja aldehidov

6.4.2.2 Vinil sulfoni

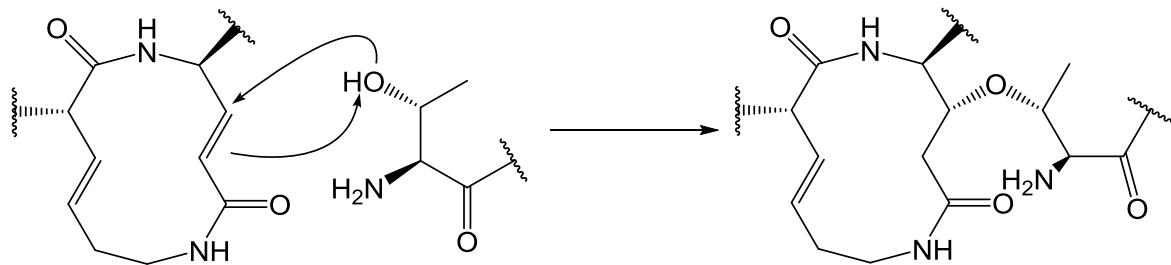
Zaviralci, katerih elektrofilni fragment predstavljajo vinil sulfoni, reagirajo po principu 1,4 - Michaelove adicije, pri čemer irreverzibilno nastane eter. Zopet je problematična selektivnost, saj se neselektivno vežejo tudi na nekatere cisteinske proteaze (Slika 11).



Slika 11: Mehanizem delovanja vinil sulfonov

6.4.2.3 Vinil amidi – sirbaktin

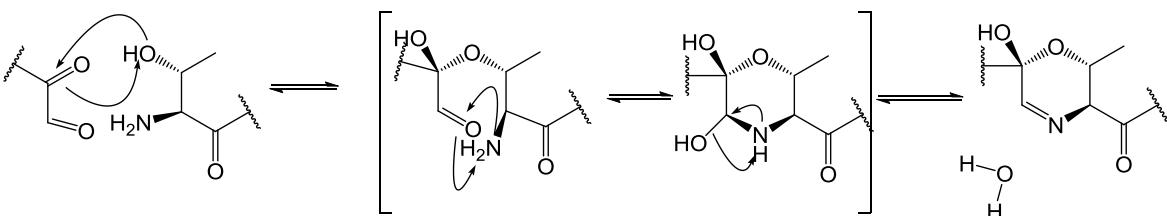
Mehanizem delovanja je identičen vinil sulfonom, torej poteče 1,4 – Michaelova adicija, pri čemer nastane makrolaktamski obroč.



Slika 12: Mehanizem delovanja vinil amidov - sirbaktina

6.4.2.4 α – ketoaldehydi

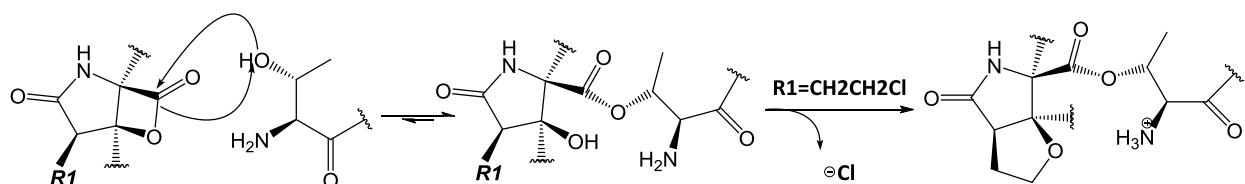
Reakcija poteka podobno kot pri α' , β' – epoksiketonih. Gre za dvostopenjsko reakcijo, kjer se najprej tvori hemiketal med treoninsko $\text{Thr}1\text{O}^\gamma$ in ketonsko funkcionalno skupino. Nato sledi napad $\text{Thr}1\text{N}$ na aldehidno funkcionalno skupino, pri čemer nastane oksazinski obroč, ki pa je reverzibilen.



Slika 13: Mehanizem delovanja α – ketoaldehidov

6.4.2.5 β -laktoni

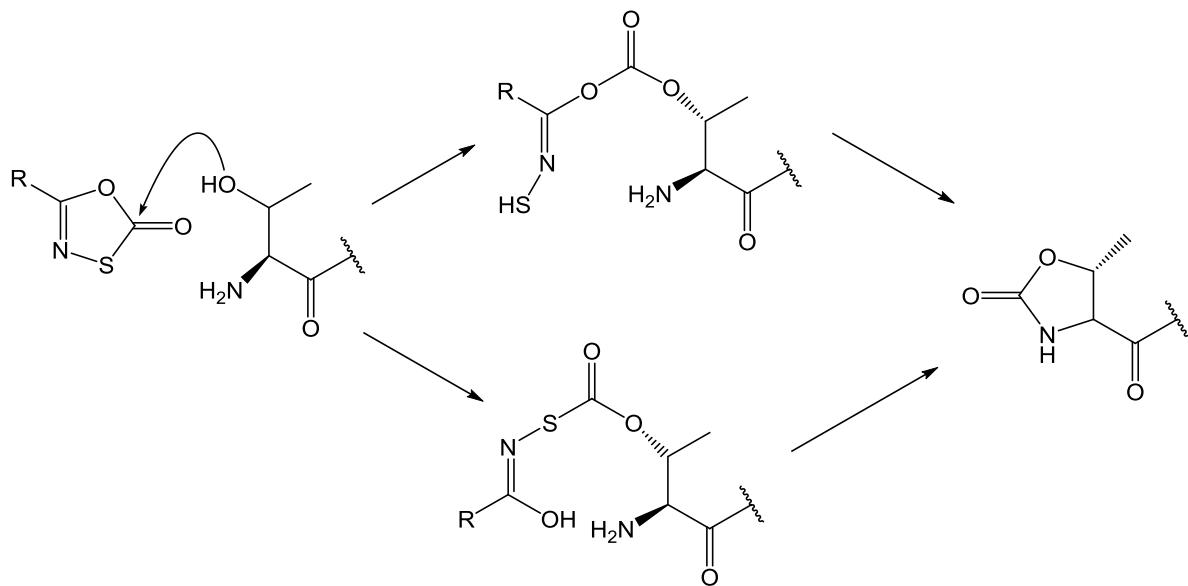
Pri β -laktonih pride najprej do odprtja β -laktonskega obroča. To se zgodi po napadu $\text{Thr}1\text{O}^\gamma$ na karbonilni C-atom cikličnega estra. Pri reakciji nastaneta nova hidroksilna skupina ter acil-encimski ester. Pri številnih β -laktonih se reakcija ustavi na tem mestu, ob vstopu vode v aktivno mesto pa pride do hidrolize estra in regeneracije $\text{Thr}1\text{O}^\gamma$. Pri nekaterih derivatih, kot je marizomib (Slika 16 – **1k**), lahko reakcija preide v drugo stopnjo. Novonastala hidroksilna skupina napade kloroethylno stransko verigo, pri čemer pride do ciklizacije in nastanka tetrahidrofuranskega obroča. Zaradi ireverzibilnosti reakcije in nastanka etske vezi, voda, ki bi prišla v aktivno mesto, ne more hidrolizirati kovalentne modifikacije $\text{Thr}1\text{O}^\gamma$.



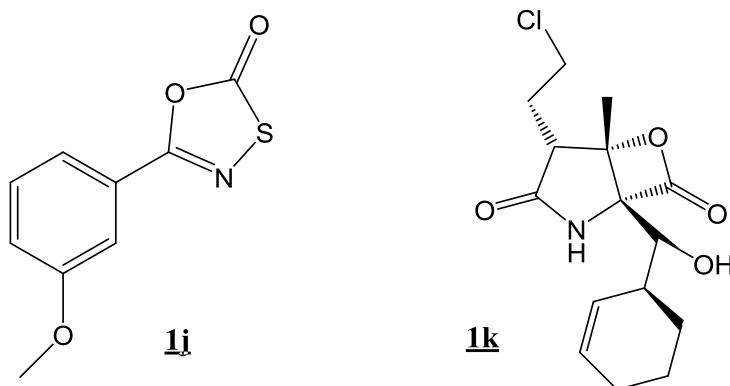
Slika 14: Mehanizem β -laktonov

6.4.2.6 Oksatiazol-2-on-ski derivati

Številne raziskave so pripeljale do odkritja novega zaviralca proteasoma z majhno molekulsko maso. Takšna molekula je HT1054 (Slika 16 – **1j**), katerega elektrofilni fragment je oksatiazol-2-onski obroč. Ima kar do $1000\times$ večjo selektivnost do mikrobakterijskega proteasoma. Razlog selektivnosti je okolica aktivnega mesta treonina, ki je bolj ugodna in dostopna za manjše molekule (7). Mehanizem delovanja oksatiazol-2-onskih derivatov temelji na ciklokarboksilaciji treoninskega ostanka Thr1 (Slika 15).



Slika 15: Mehanizem delovanja oksatiazol-2-on-ovih derivatov



Slika 16: Struktura HT1054 in marizomiba

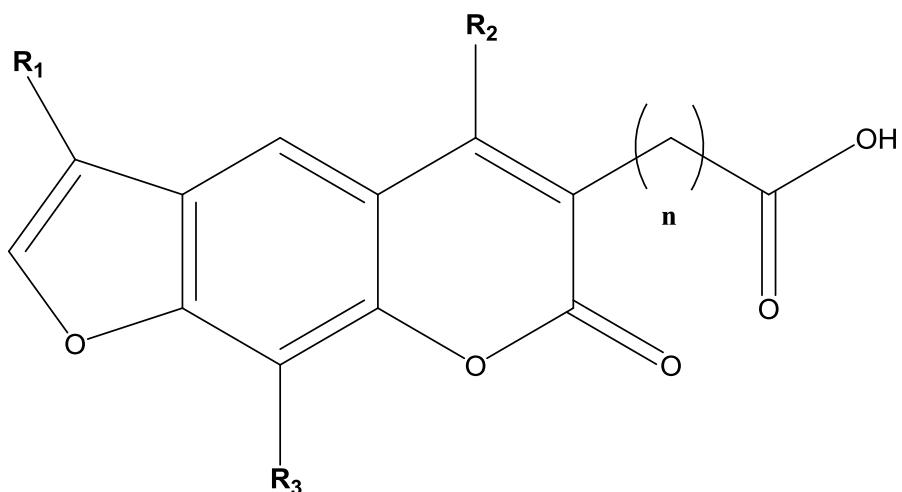
6.5 Nepeptidni zaviralci - prihodnost

Idealni zaviralec imunoproteasoma naj bi imel nepeptidni skelet in bi moral biti β 5i-selektiven. Takšna učinkovina bi imela daljši razpolovni čas, kar pomeni tudi redkejše odmerjanje in pacientu prijaznejšo peroralno aplikacijo, zaradi svoje selektivnosti do imunoproteasoma pa tudi manj neželenih učinkov. Trenutno sta samo dve spojini, ki se približata idealu takšnih lastnosti, HT1054 in marizomib.

Za nadaljnje raziskave na tem področju je bila zelo pomembna določitev kristalne strukture mišjega imunoproteasoma, ki omogoča virtualno rešetanje spojin, ki bi se vezale v aktivno mesto. Eno takšnih raziskav so opravili tudi na Fakulteti za farmacijo, nadaljevanje le-te pa je bila naloga naše magistrske naloge (4).

Cilj raziskave je bilo iskanje reverzibilnih in ireverzibilnih zaviralcev človeškega

β 5i-aktivnega mesta proteasoma. S pomočjo virtualnega rešetanja iz ZINC baze podatkov so ugotovili, da so najprimernejši psoralenski derivati, ki so bolj zavirali in bili bolj selektivni od PR-957, ki je trenutno edini klinično uporabljen selektivni zaviralec iCP. Rezultati *in vitro* vrednotenja psoralenskih derivatov so dali vpogled v SAR psoralenskih zaviralcev (slika 17).



n:

- metilenski ali etilenski povezovalec pomemben za zaviranje

R₁:

- fenil najbolj pomemben za zaviranje
- ostali (hetero)cikli zmanjšajo zaviranje
- metil in terc-butil vodita v izgubo zaviranja

R₂:

- metil, vendar ni nujen za zaviranje

R₃:

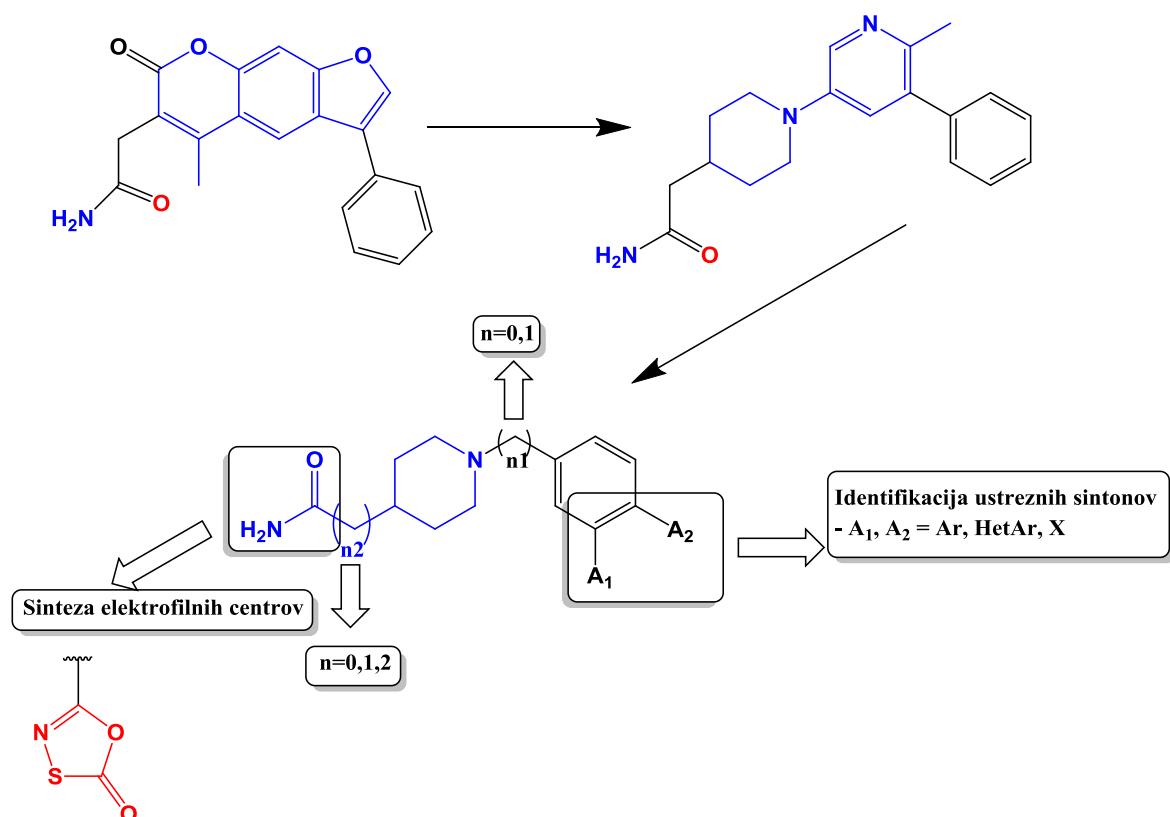
- dodatna metilna skupina vodi v izgubo zaviranja

Slika 17: SAR psoralenskih reverzibilnih zaviralcev proteasoma

Da bi dosegli ireverzibilno zaviranje je bilo treba prilagoditi še fragment odgovoren za interakcijo z Thr1. Računalniško sidranje molekul je pokazalo, da je karboksilna kislina najbližja funkcionalna skupina Thr1. Z njeno transformacijo v različne aktivne elektrofilne fragmente, so dobili najmočnejši, oksatiazol-2-onski derivat ($IC_{50}=0.013\pm0.004 \mu M$; $IC_{50}(PR-957)=0.015\pm0.002 \mu M$). Močnejši je bil le sukcinimidni derivat ($IC_{50}=0.009\pm0.002 \mu M$), vendar se ta uporablja v glavnem za označevanje beljakovin oz. kot reagent za premreženje. Selektivnost do iCP je pri oksatiazol-2-onskem derivatu ($\beta 5c/\beta 5i = 82.6$) bila kar $8\times$ boljša kot pa pri PR-957 ($\beta 5c/\beta 5i = 10.6$). Pozitivna stran teh derivatov je tudi ta, da je le rahlo zmanjšana permeabilnost v primerjavi z izhodnim nekovalentnim psoralenom, sestavine citosola pa ne vplivajo na zaviranje.

7 NAČRT DELA

Cilj magistrske naloge bo iskanje novih zaviralcev imunoproteasoma na osnovi dosedanjih rezultatov raziskovalne skupine na Fakulteti za farmacijo . Z računalniško poenostavljivo psoralenskega skeleta bomo poiskali novo strukturo ter nato načrtovali in izvedli sintezo različnih derivatov. Osredotočili se bomo na derivate z nipekotinskim osnovnim skeletom, z oksatiazol-2-onskim elektrofilnim centrom (Slika 18).

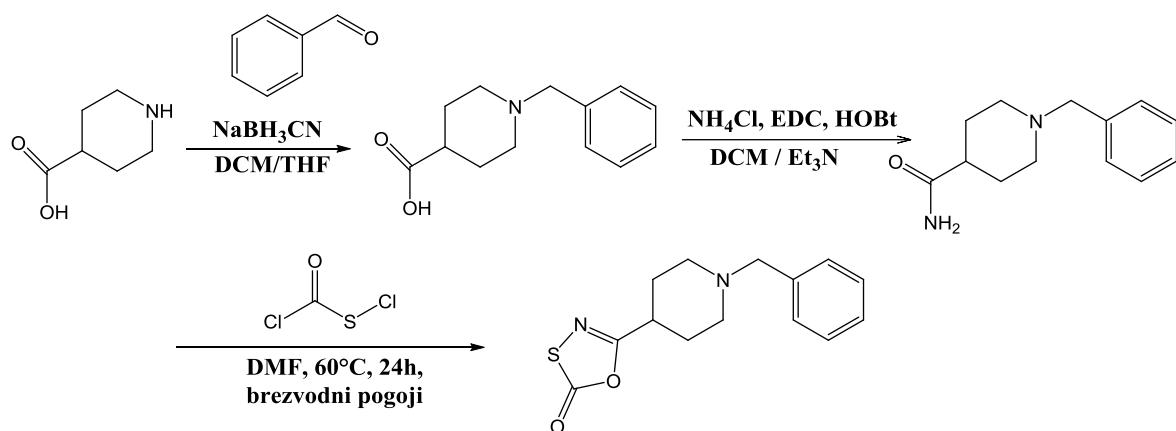


Slika 18: Načrt dela magistrske naloge

Najprej bomo identificirali ustrezne sintone (dele molekul, ki sicer sami po sebi ne obstajajo, zato jih s sintezo vpeljemo v strukturo) za aromatski del spojin. Cilj je dobiti čim več derivatov, da lahko preverimo vplive raznih funkcionalnih skupin, kot so npr. halogeni na različnih mestih, na interakcije v aktivnem mestu. Uporabili bomo tudi takšne sintone, ki so sterično večji (biciklični sistemi), ali pa nam bodo omogočili nadaljnjo vgradnjo v večji lipofilni fragment. Slednje je ugodno zaradi morebitne vezave naših spojin na mikrobakterijski proteasom.

Nipekotinski skelet ima z vidika načrtovanja novih spojin ugoden sekundarni amin, ki omogoča nabor različnih kemijskih reakcij za vezavo aromatskega dela, bodisi prek

reduktivnega aminiranja, ali pa alkiliranja. Po vezavi aromatskega dela na nipekotinsko kislino bo sledila pretvorba karboksilne skupine v amidno, ki omogoča ciklizacijo s klorokarbonilsulfenilkloridom v želeni oksatiazol-2-onski elektrofilni center. To bomo naredili z uporabo sklopitvenih reagentov EDC in HOt preko aktiviranih estrov. Sledila bo identifikacija potrebnih reagentov in topil ter izvedba pilotne reakcije. Vse vmesne stopnje in končne spojine bomo potrdili s pomočjo NMR, IR, MS. Pilotna reakcija bo kot produkt imela najpreprostejšo obliko želene molekule, v primeru uspele reakcije pa bomo šli v sintezo različnih derivatov, ki jih bomo biokemično ovrednotili (Slika 19).



Slika 19: Pilotni sintezni načrt

Velik poudarek bomo dali zlasti na sintezi elektrofilnega centra, saj je lahko problematična pri derivatih z bazičnimi centri. To bo ključnega pomena, saj bomo na ta način dobili, kot smo v uvodu omenili, najbolj iCP selektiven elektrofil.

8 MATERIALI IN METODE

Poimenovanje in risanje struktur smo izvedli s programom ChemDraw Professional 15.1., podjetja CambridgeSoft. Sintezne postopke in drugo literaturo smo iskali s spletno bazo podatkov SciFinder Scholar. Obdelavo NMR spektrov smo izvedli s programom MestReC podjetja Mestrelab.

8.1 Materiali

Reagenti in topila, ki smo jih uporabili pri laboratorijskem delu, so bila dobavljena s strani proizvajalcev Acros Organics, Merck, Aldrich ter Fluka.

8.2 Metode

➤ Kromatografske metode

Tankoplastna kromatografija (TLC)

Za tankoplastno kromatografijo (TLC) smo uporabili plošče Kieselgel 60 F₂₅₄ proizvajalca Merck, ki ima 0,20 mm nanos silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem. Mobilne faze, ki smo jih uporabili za TLC, so omenjene pri posamezni reakciji. Spojine smo detektirali s pomočjo UV-svetilke z valovno dolžino $\lambda=254\text{nm}$. TLC plošče smo oroševali z različnimi orositvenimi reagenti, ki so prav tako navedeni posebej.

Kolonska kromatografija

Za kolonsko kromatografijo smo za stacionarno fazo uporabljali silikagel, velikosti delcev 0,040-0,063 nm proizvajalca Merck, mobilne faze pa so bile odvisne od spojin in so omenjene pri reakcijah.

➤ Spektroskopske metode

Jedrska magnetna resonanca (NMR)

NMR spektri so bili posneti z aparaturom Bruker Avance DPX₄₀₀ 400 MHz. Pri ¹H NMR spektrih smo kot topilo uporabljali devterirana topila kot so DMSO-d₆ in CDCl₃. Kot interni standard smo uporabljali tetrametilsilan (TMS).

Masna spektroskopija (MS)

MS spektri so bili delno posneti na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, z aparaturom ADVION expression CMSL, delno pa na Inštitutu Jožef Štefan z aparaturom IC PMS, Aglient 7500 Series.

Infrardeča spektroskopija

IR spektri so bili posneti z aparaturom Thermo Nicolet FT-IR na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

➤ Ekstrakcije

Za ekstrakcije smo uporabili EtOAc, petroleter, nasičeni NaCl_(aq) ter NaHCO_{3(aq/s)}.

➤ Določevanje tališča

Tališča smo določali s pomočjo mikroskopa Polytherm A Heintsch z ogrevalno mizo.

➤ Biološka testiranja

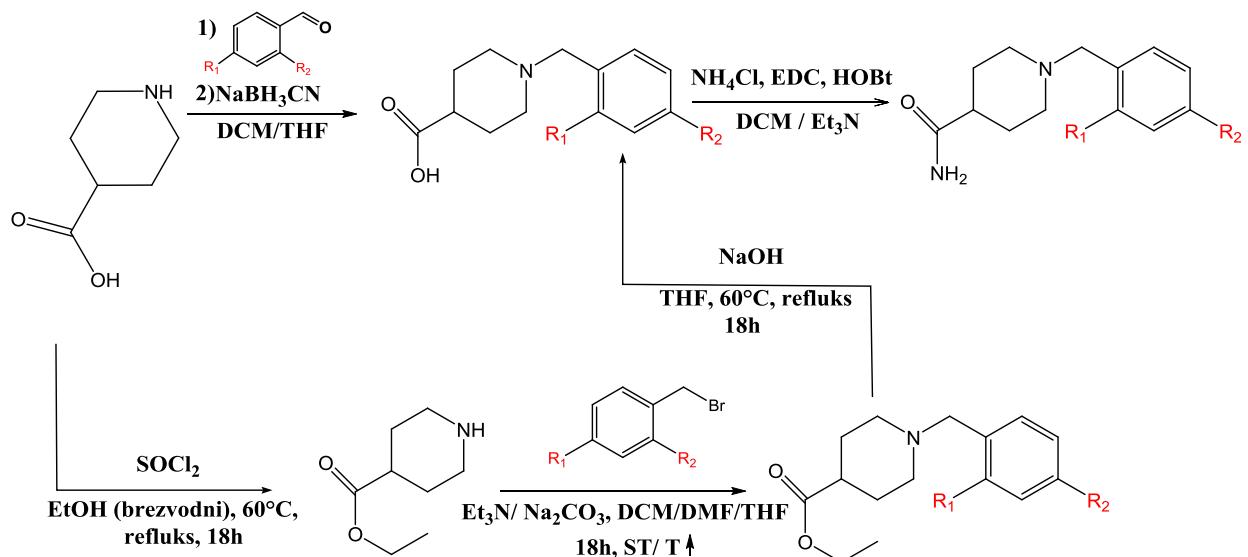
Biološka testiranja aktivnosti končnih spojin so bila izvedena na Katedri za klinično biokemijo, na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Opraviti bi morali baterijo testov, med katerimi smo objavili le rezultate IC₅₀ za prečiščen človeški iCP (β 5i podenoto). Poleg IC₅₀ so preostali testi še čas hidrolize fluorogenega substrata Suc-LLVY-AMC s strani iCP in cCP, v prisotnosti naših končnih spojin. Prav tako so pomembna testiranja na celičnih lizatih celic HeLa in THP-1, z namenom preverjanja, ali končne spojine izražajo aktivnost v prisotnosti drugih citosolnih komponent. THP-1 lizati imajo močno izražen iCP, saj se te vrste celic pojavljajo pri akutni monocitni levkemiji. HeLa celice pa izražajo v glavnem cCP.

8.3 Aparature

V raziskovalnem delu smo uporabljali zgolj standardno laboratorijsko steklovino ter magnetna mešala, laboratorijsko tehniko Mettler Toledo, analitsko tehniko Mettler Toledo, odstranjevalec topil pod znižanim tlakom Buchi (rotavapor) in plinsko neprepustne brizge Hamilton. Rotavapor smo uporabljali pri 40 °C in pri podtlaku, prilagojenem glede na topilo, kot je navedeno pri posamezni reakciji.

9 EKSPERIMENTALNO DELO

9.1 Sinteza 1-benzilpiperidin-4-karboksilne kisline in njenih derivatov

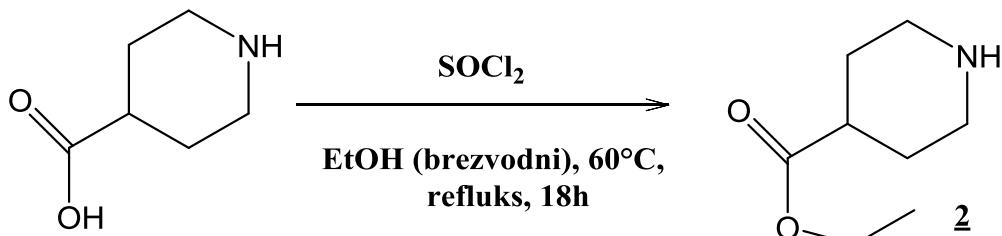


9.1.1 Sinteza 1-benzilpiperidin-4-karboksilne kisline (**1**)



1,00 g (7,74 mmol, 1 ekv.) izonipekotinske kisline smo raztopili v 30 mL zmesi THF:MeOH:H₂O = 1:1:1. Nato smo dodali 0,9 mL (8,901 mmol, 1.15 ekv.) benzaldehida. Mešali smo na sobni temperaturi eno uro, dokler nismo dobili bistro raztopino, nakar smo dodali NaBH₃CN. Dodali smo tudi 2 mL 1M CH₃COOH (2 mmol). Reakcijsko zmes smo nato mešali čez noč pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo uparili zmes topil pod znižanim tlakom. Oljnatemu zaostanku smo dodali 10 mL 1M NaOH, prenesli v lij ločnik ter ekstrahirali s petroletrom. Vodno fazo smo nakisali z 1M HCl, in ekstrahirali z EtOAc (2×20 mL). Združene organske faze smo spirali z H₂O (1×20 mL) in nasičenim NaCl_(aq) (1×20 mL), sušili z Na₂SO_{4(s)} ter čez 15 min odparili topilo pod znižanim tlakom in dobili bel trden produkt, ki pa po NMR spektru ni bil naša željena spojina.

9.1.2 Sinteza etil piperidin-4-karboksilata (**2**)



15,00 g (0,117 mol, 1 ekv) izonipekotinske kisline smo raztopili v 300 mL brezvodnega EtOH. Bučko smo dali na led ter počasi dokapali 35 mL SOCl₂ (0,483 mol, 4 ekv). Nato smo bučko opremili s povratnim hladilnikom in reakcijsko zmes segrevali pri 60 °C čez noč. Naslednji dan smo jo ohladili ter dodali 50 mL H₂O s tempraturo 0°C. S trdnim NaHCO_{3(s)} smo reakcijsko zmes naalkalili do rahlo bazičnega pH (pH 7,5 – 8). Pod znižanim tlakom smo uparili EtOH ter nato še H₂O. Zaostanek smo nato ekstrahirali z EtOAc (4×40 mL). Združenim organskim fazam smo dodali Na₂SO_{4(s)} ter čez 15 min uparili EtOAc pod znižanim tlakom, dokler ni izpadel bel produkt, ki smo ga sušili še 30 min. V vodni fazi je ostalo še nekaj produkta, zato smo ponovili postopek ekstrakcije z EtOAc (20×20 mL) ter izvedli identično izolacijo. Tudi tu smo dobili amorfen produkt bele barve.

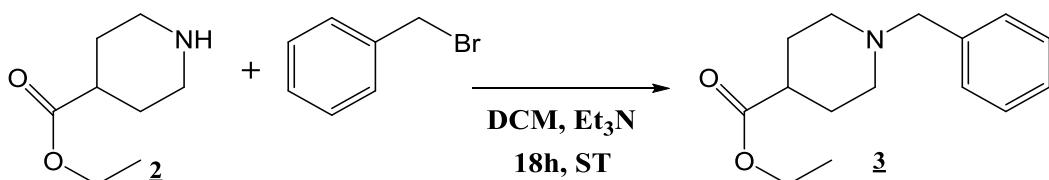
Ime / molska masa: etil piperidin-4-karboksilat (**2**) 157,21 g/mol

Izgled / izkoristek: bel trden produkt / 33 %

TLC / oroševalni reagent: Rf (EtOAc:MeOH=2:1)= 0,49 / ninhidrin

¹H NMR: spojina znana po literaturi, popisana s strani Sigma-Aldrich (Advanced Chemistry Development, Inc.).

9.1.3 Sinteza etil 1-benzilpiperidin-4-karboksilata (**3**)



530 mg spojine **2** (3,37 mmol, 1 ekv) smo raztopili v 30 mL DCM. Nato smo dodali 0,5 mL Et₃N (3,6 mmol, 1.1 ekv) ter 0,5 mL benzilbromida (4,2 mmol, 1.2 ekv). Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo pod znižanim tlakom odparili DCM. Z 1M HCl smo nakisali do pH 2-3. Dodali smo 20 mL H₂O in 20 mL EtOAc ter ločili fazi. Vodno fazo smo naalkalili do pH 8 in jo v lij ločniku ekstrahirali z EtOAc (2×20 mL). Združene organske faze smo spirali z H₂O (1×20 mL) in nasičenim NaCl_(aq) (1×20 mL). Organske faze smo združili, jih dodali Na₂SO_{4(s)}, ter čez 15 min uparili EtOAc pod znižanim tlakom. Izpadel je tekoč produkt, ki smo mu dodali petroleter in pustili čez noč v hladilniku. Izpadla je bela trdna snov, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem.

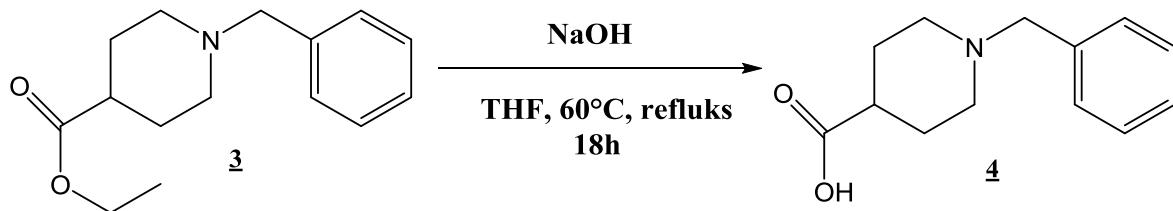
Ime / molska masa: etil 1-benzilpiperidin-4-karboksilat (**3**) 247,34 g/mol

Izgled / izkoristek: bel trden produkt / 14 %

TLC / oroševalni reagent: Rf (EtOAc:MeOH=2:1)= 0,46 / ninhidrin

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.16-1.19 (m, 3H, CH₃), 1.50-1.84 (m, 4H, CH₂), 1.95-2.00 (m, 1H, CH), 2.25-2.31 (m, 2H, CH₂), 2.72-2.75 (m, 2H, CH₂), 3.34-3.43 (m, 2H, CH₂), 4.03-4.08 (m, 2H, CH₂), 7.24-7.38 (m, 5H, ArH)

9.1.4 Sinteza 1-benzilpiperidin-4-karboksilne kisline (**4**)



40 mg spojine **3** (0,16 mmol) smo raztopili v 10 mL THF in dodali 10 mL 2M NaOH. Reakcijsko bučko smo opremili s povratnim hladilnikom, segrevali na 60 °C in mešali čez noč. Naslednji dan smo odparili topila pod znižanim tlakom. Po 30 min sušenju na vakuumu, smo dobili tekoč produkt. Ker ni izpadel trden produkt, smo dodali EtOAc in pustili čez noč v hladilniku. Naslednje jutro smo odfiltrirali nastalo oborino. Dobili smo trden, bel produkt.

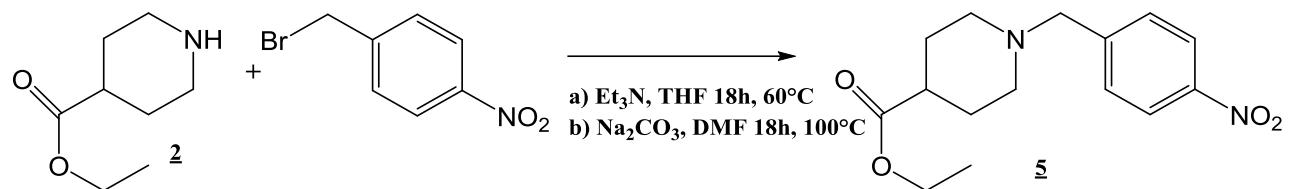
Ime / molska masa: *1-benzilpiperidin-4-karboksilna kislina (**4**)* 219,28 g/mol

Izgled / izkoristek: bel trd produkt / 41 %

TLC / oroševalni reagent: Rf (EtOAc:MeOH=2:1)= 0,69 / kalijev permanganat

¹H NMR: spojina znana in popisana po literaturi (8)

9.1.5 Sinteza etil 1-(4-nitrobenzil)piperidin-4-karboksilata (**5**)



a) 500 mg spojine **2** (3,2 mmol, 1 ekv) smo raztopili v 60 mL THF. Dodali smo 900 mg 4-nitrobenzilbromida (4,2 mmol, 1,15 ekv) ter 0,5 mL Et₃N (3,6 mmol, 1,15 ekv).

Reakcijsko bučko smo opremili s povratnim hladilnikom in segrevali na 60 °C čez noč.

Naslednji dan smo uparili THF pod znižanim tlakom. Zaostanek smo nakisali z 1M HCl do pH 2 in dodali 20 mL H₂O. Dodali smo 30 mL EtOAc in ločili fazi, vzeli nato vodno fazo in jo naalkalili do pH 8 z NaHCO_{3(aq)}. Ekstrahirali smo jo z EtOAc (2×20 mL), združene organske faze spirali z H₂O (1×20 mL), nasičenim NaCl_(aq) (1×20 mL) in jih sušili z Na₂SO_{4(s)}. Pod znižanim tlakom smo odparili topilo in dobili olje (bledo zelene barve).

Ime / molska masa: *etil 1-(4-nitrobenzil)piperidin-4-karboksilat (**5**)* 292,34 g/mol

Izgled / izkoristek: olje (bledo zelene barve) / 25 %

TLC / oroševalni reagent: Rf (EtOAc:MeOH=2:1)= 0,07 / ninhidrin

b) Reakcijo smo nato ponovili pri spremenjenih pogojih, s ciljem izboljšati izkoristek.

Tokrat smo 500 mg spojine **2** (3,2 mmol, 1 ekv) raztopili v 60 mL DMF. Dodali smo 1,4 g 4-nitrobenzilbromida (6,4 mmol, 2 ekv) ter 400 mg Na₂CO_{3(s)} (3,6 mmol, 1,15 ekv).

Reakcijsko bučko smo opremili s povratnim hladilnikom, segrevali na 100 °C in pustili mešati čez noč. Izolacija je bila identična kot pri prejšnji reakciji. Po uparevanju topila smo

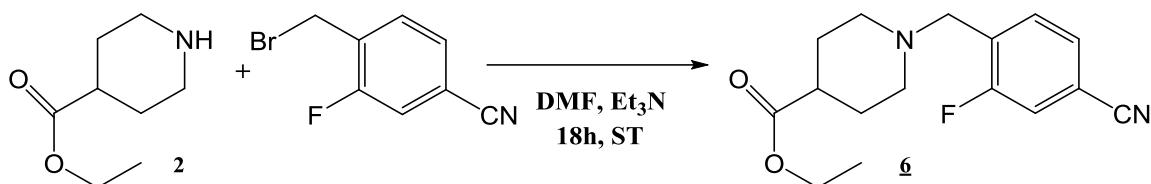
dobili zmes, ki ni bila olje in na pogled ni bila podobna prejšnji, ki je dokazano pravi produkt. TLC je pokazal primesi, zato smo se lotili čiščenja s kolonsko kromatografijo, mobilna faza: EtOAc:heksan = 1:1. Zbirali smo frakcije po 2 mL. Po 10 frakcijah smo nato zamenjali mobilno fazo in prešli na EtOAc ter zbrali še preostanek. Združili smo frakcije, ki so vsebovale spojino z $R_f = 0,90$. Tem smo potem uparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo olje (bistre barve).

Izgled / izkoristek: olje (bistre barve) / 11 %

TLC / oroševalni reagent: R_f (EtOAc:MeOH=2:1)= 0,07 / ninhidrin

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 1.16-1.19 (m, 3H, CH₃), 1.56-1.84 (m, 2H, CH₂), 2.02-2.08 (m, 2H, CH₂), 2.28-2.34 (m, 1H, CH), 2.72-2.75 (m, 4H, CH₂), 3.56-3.59 (s, 2H, CH₂), 4.03-4.09 (m, 2H, CH₂), 7.57-7.60 (m, 2H, ArH), 8.18-8.21 (m, 2H, ArH)

9.1.6 Sinteza etil 1-(4-ciano-2-fluorobenzil)piperidin-4-karboksilata (**6**)



500 mg spojine **2** (3,2 mmol, 1 ekv) smo raztopili v 50 mL DMF. Dodali smo 1,4 g 2-fluoro-4-cianobenzil bromida (6,4 mmol, 2 ekv) in 0,5 mL Et₃N (3,6 mmol, 1,15 ekv). Reakcijsko zmes smo pustili mešati preko noči na sobni temperaturi. Naslednji dan smo uparili DMF pod znižanim tlakom. Zaostanek smo nakisali z 1M HCl do pH 2 in dodali 20 mL H₂O. Dodali smo še 30 mL EtOAc in ločili fazi, nato uporabili vodno fazo in jo naalkalili do pH 8 z NaHCO_{3(aq)}. Ekstrahirali smo z EtOAc (2×20 mL), združene organske faze spirali z H₂O (1×20 mL) in nasičenim NaCl_(aq) (1×20 mL), jih sušili z Na₂SO_{4(s)} in nato odparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo olje (bistre barve).

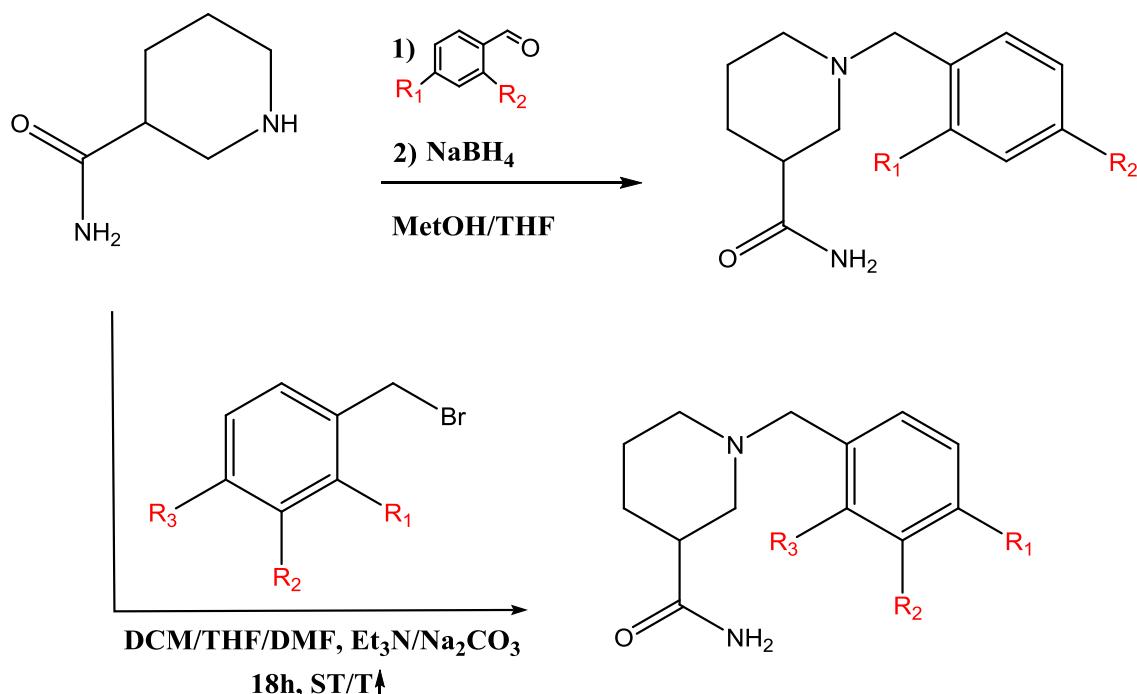
Ime / molska masa: etil 1-(4-nitrobenzil)piperidin-4-karboksilat (**6**) / 290,34 g/mol

Izgled / izkoristek: olje (bistre barve) / 27 %

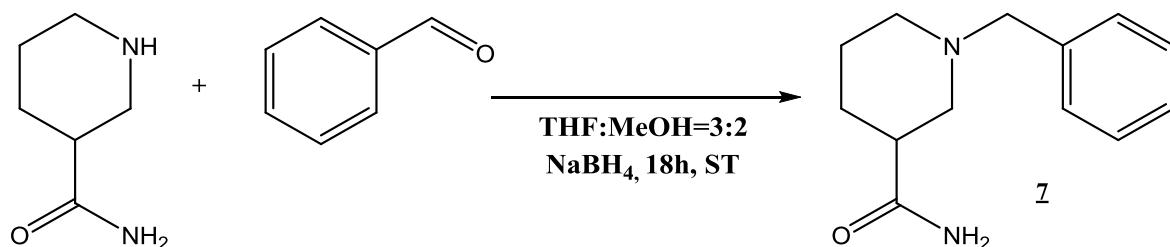
TLC / oroševalni reagent: R_f (EtOAc:MeOH=2:1)= 0,07 / ninhidrin

1H NMR: Spektroskopske meritve niso bilo opravljene, saj je bil takšen način sinteze (prek estrov) opuščen v nadaljevanju dela.

9.2 Sinteza 1-benzilpiperidin-3-karboksamida in njegovih derivatov



9.2.1 Sinteza 1-benzilpiperidin-3-karboksamida (**7**) z reduktivnim aminiranjem



1 g nipekotamida (7,8 mmol, 1 ekv) smo raztopili v 30 mL THF in 20 mL MeOH. Dodali smo 0,915 mL benzaldehida (8,9 mmol, 1,15 ekv). Nato smo ohladili reakcijsko zmes na ledu in dodali 564 mg NaBH_4 (8,9 mmol, 1,15 ekv). Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč. Naslednje jutro smo topili odparili pod znižanim tlakom. Ostanku smo dodali 30 mL EtOAc. Sledilo je spiranje organske faze z $\text{NaHCO}_3\text{(aq)}$ (2×25 mL), H_2O (1×20 mL) ter NaCl (1×25 mL). Organsko fazo smo sušili z Na_2SO_4 . Po 15 min smo nato uparili EtOAc pod znižanim tlakom. Dobili smo belo trdno snov. Rezultati NMR so pokazali da ni šlo za našo željeno spojino.

9.2.2 Sinteza 1-benzilpiperidin-3-karboksamida (**7**) z alkiliranjem



a) 500 mg nipekotamida (3,6 mmol, 1 ekv) smo natehtali in ga raztopili v 50 mL DCM. Dodali smo 0,5 mL Et₃N (3,9 mmol, 1,10 ekv) ter 0,5 mL benzilbromida (4,2 mmol, 1,15 ekv). Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Naslednje jutro smo uparili DCM pri znižanem tlaku in ostanku dodali 10 mL 1M HCl, 10 mL H₂O ter 20 mL EtOAc. Fazi, ki sta nastali, smo ločili. Vodno fazo smo naalkalili do rahlo bazičnega pH 8. Nato smo jo ekstrahirali z EtOAc (1×25 mL), združene organske faze spirali z H₂O (1×20 mL) in NaCl_(aq) (1×20 mL) ter sušili z Na₂SO_{4(s)}. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom. Izpadla je bela trdna oborina.

Ime / molska masa: *1-benzilpiperidin-3-karboksamid (7)* 218,30 g/mol

Izgled / izkoristek / temperatura tališča: trdna bela snov / 40 % / 108-110 °C

TLC / oroševalni reagent : Rf (EtOAc:MeOH=2:1)= 0,51 / ninhdin

b) Reakcijo smo nato ponovili zaradi relativno slabega izkoristka. 500 mg nipekotamida (3,9 mmol, 1 ekv) smo raztopili v 50 mL DMF. Najprej smo dodali 460 mg Na₂CO_{3(s)} (4,4 mmol, 1,15 ekv) in nato še 1,440 g benzil bromida (8,2 mmol, 2,10 ekv). Reakcijsko bučko smo opremili s povratnim hladilnikom in segrevali na 100 °C preko noči. Izolacija je potekala na enak način kot v prvem primeru z ustrezno večjimi količinami topil.

Ime / molska masa: *1-benzilpiperidin-3-karboksamid (7)* 218,30 g/mol

Izgled / izkoristek / temperatura tališča: trdna bela snov / 56 % / 108-110 °C

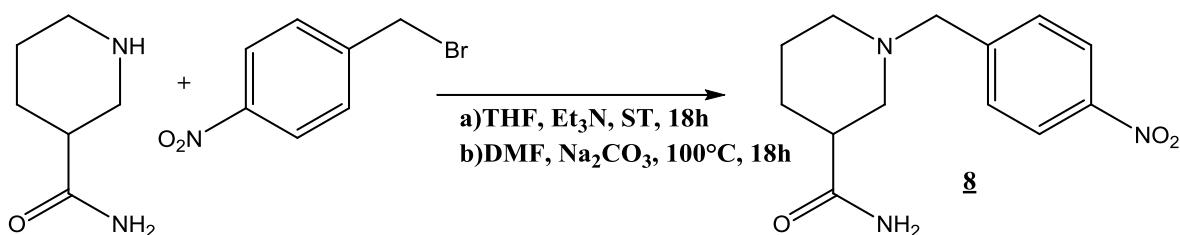
TLC / oroševalni reagent: Rf (EtOAc:MeOH=2:1)= 0,50 / ninhdin

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 1.34–1.48 (m, 2H, CH₂), 1.58–1.74 (m, 2H, CH₂), 1.85–1.99 (m, 2H, CH₂), 2.27–2.32 (m, 1H, CH), 2.68–2.78 (m, 2H, CH₂ in CH), 3.44 (dd, J=4.4, 13.2 Hz, 2H, CH₂), 6.75 (br s, 1H, NH₂), 7.22–7.34 (m, 6H, ArH in NH₂)

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 22.8, 26.9, 41.8, 53.8, 55.0, 63.5, 127.4, 128.4, 129.2, 137.6, 178.0

IR (ATR): ν 3333, 3148, 2932, 2758, 1632, 1429, 1368, 1356, 1337, 1253, 1100, 1070, 1002, 858, 734, 698, 666, 564, 518 cm⁻¹

9.2.3 Sinteza 1-(4-nitrobenzil)piperidin-3-karboksamida (**8**)



a) 250 mg nipekotamida (1,95 mmol, 1 ekv) smo raztopili v 50 mL THF. Dodali smo 0,25 mL Et₃N (1,8 mmol, 0.9 ekv) in 454 mg 4-nitrobenzilbromida (2,1 mmol, 1.10 ekv). Reakcijsko bučko smo pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Naslednje jutro smo uparili THF pod znižanim tlakom. Zaostanek smo raztopili v 10 mL 1M HCl ter dodali še 10 mL H₂O in 20 mL EtOAc. Ločili smo fazi, vodno fazo naalkalili z NaHCO_{3(aq)} do pH 8 in jo ekstrahirali z EtOAc (3×30 mL). Združene organske faze smo spirali z H₂O (1×30mL) ter nasičenim NaCl_(aq), sušili z Na₂SO_{4(s)}, nato uparili EtOAc pod znižanim tlakom in dobili belo trdo snov.

Ime / molska masa: *1-(4-nitrobenzil)piperidin-3-karboksamid (**8**)* 263,30 g/mol

Izgled / izkoristek / temperatura tališča: trda bela snov / 34 % / 111-114 °C

b) Reakcijo smo nato ponovili pod drugimi pogoji, z ciljem doseči boljši izkoristek. 500 mg nipekotamida (3,9 mmol, 1 ekv) smo raztopili v 50 mL DMF. Najprej smo dodali 460 mg Na₂CO_{3(s)} (4,4 mmol, 1.15 ekv), nato še 1,685 g 4-nitrobenzil bromida (7,8 mmol, 2 ekv). Reakcijsko bučko smo opremili z povratnim hladilnikom ter jo dali segrevati na 100 °C. Reakcijsko zmes smo mešali čez noč. Izolacija je potekala na enak način kot v prvem primeru z ustrezno večjimi količinami topil.

Ime / molska masa: *1-(4-nitrobenzil)piperidin-3-karboksamid (**8**)* 263,30 g/mol

Izgled / izkoristek / temperatura tališča: trda belo-oranžna snov / 93 % / 111-114 °C

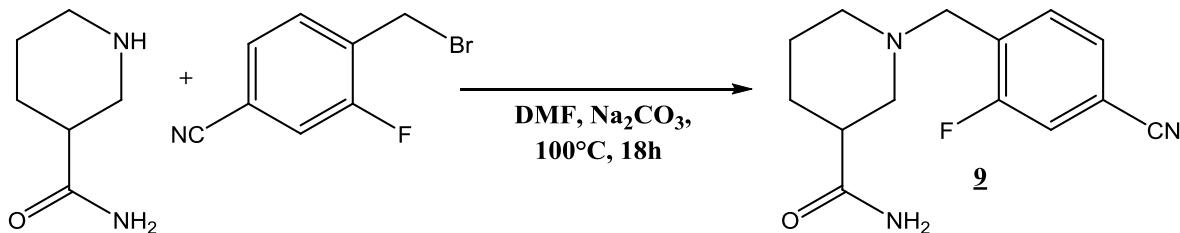
TLC / oroševalni reagent: Rf (EtOAc:MeOH=2:1)= 0,63 / kalijev permanganat

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 1.33–1.36 (m, 1H, CH₂), 1.43–1.48 (m, 1H, CH₂), 1.60–1.65 (m, 1H, CH₂), 1.72–1.76 (m, 1H, CH₂), 1.91–2.09 (m, 2H, CH₂), 2.30–2.33 (m, 1H, CH₂), 2.69–2.78 (m, 2H, CH₂ in CH), 3.55–3.63 (m, 2H, CH₂), 6.76 (br s, 1H, NH₂), 7.27 (br s, 1H, NH₂), 7.56–7.60 (m, 2H, ArH), 8.19 (dd, J=2.0, 4.8 Hz, 2H, ArH)

¹³C NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 24.4, 27.0, 42.3, 53.2, 55.8, 61.4, 123.3, 129.6, 146.5, 146.9, 175.4

IR (ATR): ν 3385, 3180, 2926, 2787, 1644, 1605, 1512, 1421, 1341, 1249, 1204, 1166, 1102, 1048, 989, 862, 797, 736, 720 cm^{-1}

9.2.4 Sinteza 1-(4-ciano-2-fluorobenzil)piperidin-3-karboksamida (**9**)



500 mg nipekotamida (3,9 mmol, 1 ekv) smo raztopili v 50 mL DMF. V reakcijsko zmes smo dodali 1,75 g 4-ciano-2-fluorobenzilbromida (8,2 mmol, 2.10 ekv) in 466 mg $\text{Na}_2\text{CO}_{3(s)}$ (4,4 mmol, 1.15 ekv). Reakcijsko bučko smo opremili s povratnim hladilnikom in segrevali na 100°C čez noč. Naslednje jutro smo uparili DMF pod znižanim tlakom. Ostanku smo dodali 10 mL 1M HCl, 20 mL H_2O in 30 mL EtOAc. Ločili smo fazi in vodno fazo naalkalili z $\text{NaHCO}_{3(aq)}$ do pH 8. Sledila je ekstrakcija vodne faze z EtOAc (4×30 mL). Združene organske faze smo spirali z H_2O (1×50 mL) in nasičeno $\text{NaCl}_{(aq)}$ (1×40 mL), sušili z $\text{Na}_2\text{SO}_{4(s)}$ in nato uparili EtOAc. Dobili smo svetlo rumen produkt.

Ime / molska masa: *1-(4-ciano-2-fluorobenzil)piperidin-3-karboksamid (**9**)* 261,30 g/mol

Izgled / izkoristek / temperatura tališča: trdna rumeno-bela snov / 71 % / 126-128 $^\circ\text{C}$

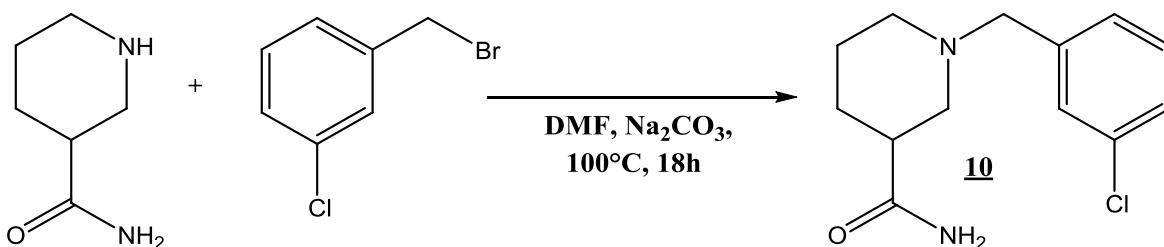
TLC oroševalni reagent: Rf (EtOAc:MeOH=2:1)= 0,66 / ninhidrin

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 1.30–1.31 (m, 1H, CH_2), 1.42–1.45 (m, 1H, CH_2), 1.59–1.64 (m, 1H, CH_2), 1.69–1.73 (m, 1H, CH_2), 1.93–1.99 (m, 1H, CH_2), 2.02–2.08 (m, 1H, CH_2), 2.28–2.33 (m, 1H, CH_2), 2.67–2.70 (m, 1H, CH_2), 2.74–2.78 (m, 1H, CH), 3.58 (s, 2H, CH_2), 6.77 (br s, 1H, NH_2), 7.27 (br s, 1H, NH_2), 7.61 (t, $J=7.6$ Hz, 1H, ArH), 7.68 (dd, $J=1.6, 6.4$ Hz, 1H, ArH), 7.82 (dd, $J=1.6, 8.4$ Hz, 1H, ArH)

$^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, CDCl₃): δ 22.9, 26.8, 41.9, 53.5, 55.3, 56.0, 112.8, 117.5, 119.2, 128.1, 130.8, 132.3, 162.1, 177.5

IR (ATR): ν 3364, 3187, 2929, 2811, 2227, 1646, 1611, 1569, 1486, 1411, 1350, 1298, 1246, 1201, 1166, 1089, 1002, 941, 849, 830, 731 cm^{-1}

9.2.5 Sinteza 1-(3-klorobenzil)piperidin-3-karboksamida (**10**)



500 mg nipekotamida (3,9 mmol, 1 ekv) smo raztopili v 50 mL DMF. Najprej smo dodali 460 mg Na_2CO_3 _(s) (4,4 mmol, 1,15 ekv), nato še 1,05 mL 3-klorobenzilbromida (8 mmol, 2 ekv). Reakcijsko bučko smo opremili s povratnim hladilnikom in segrevali na 100 °C preko noči. Naslednje jutro smo uparili DMF pod znižanim tlakom. Ostanku smo dodali 10 mL 1M HCl, 20 mL H_2O in 30 mL EtOAc. Ločili smo fazi in vodno fazo naalkalili z NaHCO_3 _(aq) do pH 8. Ekstrahirali smo jo z EtOAc (4×30 mL), združene organske faze pa nato spirali z H_2O (1×50 mL) in nasičenim NaCl _(aq) (1×40 mL). Zbrane organske faze smo sušili z Na_2SO_4 , odparili EtOAc in dobili svetlo oranžen produkt. ¹H-NMR je pokazal, da produkt ni čist, zato smo ga očistili s kolonsko kromatografijo; MF = EtOAc:MeOH=2:1; Rf = 0,63. Dobili smo belo trdno snov.

Ime / molska masa: *1-(3-klorobenzil)piperidin-3-karboksamid (**10**)* / 252,74 g/mol

Izgled / izkoristek : trdna bela snov / 53 %

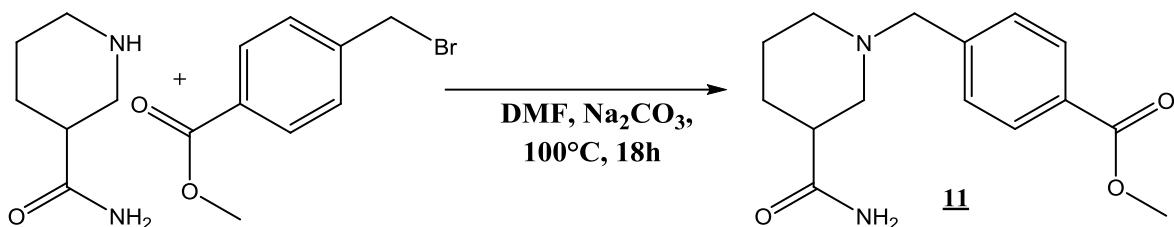
TLC / oroševalni reagent: Rf (EtOAc:MeOH=2:1)= 0,60 / ninhidrin

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.55–1.61 (m, 1H, CH₂), 1.65–1.77 (m, 2H, CH₂), 1.82–1.84 (m, 1H, CH₂), 2.26 (s, 1H, CH₂), 2.44–2.53 (m, 2H, CH₂), 2.59 (s, 1H, CH₂), 2.73 (s, 1H, CH), 3.46 (s, 2H, CH₂), 6.07 (br s, 1H, NH₂), 7.14–7.16 (m, 1H, NH₂), 7.24–7.26 (m, 4H, ArH)

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 22.9, 26.9, 41.9, 53.7, 55.1, 62.9, 127.2, 127.6, 129.1, 129.7, 134.3, 139.8, 177.8

IR (ATR): ν 3342, 3162, 2937, 2800, 2763, 1626, 1597, 1573, 1426, 1371, 1342, 1300, 1256, 1207, 1157, 1106, 1075, 1044, 996, 985, 930, 892, 875, 863, 808, 786, 776, 717, 682, 655, 569, 516 cm⁻¹

9.2.6 Sinteza metil 4-((3-karbamoilpiperidin-1-il)metil)benzoata (**11**)



200 mg nipekotamida (1,6 mmol, 1 ekv) smo raztopili v 50 mL DMF. Dodali smo 320 mg $\text{Na}_2\text{CO}_3(s)$ (3 mmol, 1.9 ekv), nato še 540 mg metil 4-(bromometil)benzoata (2,34 mmol, 1.5 ekv). Reakcijsko bučko smo opremili s povratnim hladilnikom in segrevali na 100 °C preko noči. Naslednje jutro smo uparili DMF pod znižanim tlakom. Ostanku smo dodali 10 mL 1M HCl, 20 mL H_2O in 30 mL EtOAc. Ločili smo fazi in vodno fazo naalkalili z $\text{NaHCO}_3(aq)$ do pH 8. Ekstrahirali smo jo z EtOAc (4×30 mL), združene organske faze pa nato spirali z H_2O (1×50 mL) in nasičenim $\text{NaCl}_{(aq)}$ (1×40 mL). Zbrane organske faze smo sušili z $\text{Na}_2\text{SO}_4(s)$, uparili EtOAc in dobili bel, trden produkt.

Ime / molska masa: metil 4-((3-karbamoilpiperidin-1-il)metil)benzoat (**11**) / 276,34 g/mol

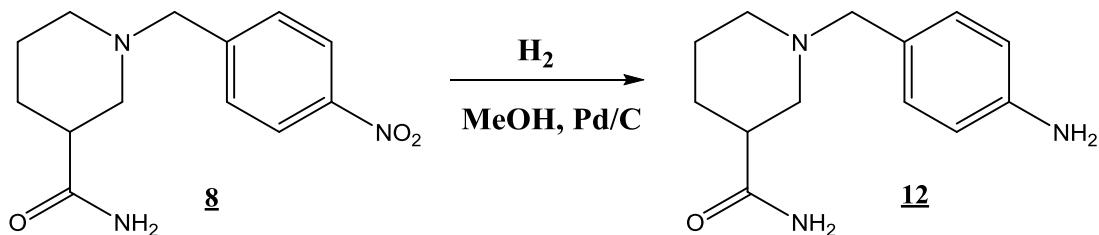
Izgled / izkoristek: bela trdna snov / 91 %

TLC / oroševalni reagent: Rf (EtOAc:MeOH=2:1)= 0,62 / ninhidrin

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.32–1.42 (m, 1H, CH₂), 1.44–1.49 (m, 1H, CH₂), 1.59–1.64 (m, 1H, CH₂), 1.71–1.75 (m, 1H, CH₂), 1.88–1.95 (m, 1H, CH₂), 1.98–2.03 (m, 1H, CH₂), 2.29–2.35 (m, 1H, CH₂), 2.68–2.71 (m, 1H, CH₂), 2.74–2.78 (m, 1H, CH), 3.52 (d, *J*=2.8 Hz, 2H, CH₂), 3.85 (s, 3H, CH₃), 6.77 (br s, 1H, NH₂), 7.27 (br s, 1H, NH₂), 7.44 (d, *J*=8.4 Hz, 2H, ArH), 7.92 (dd, *J*=2.0, 4.8 Hz, 2H, ArH)

IR (ATR): ν 3403, 3183, 2936, 2797, 1715, 1647, 1434, 1415, 1273, 1239, 1199, 1165, 1112, 1086, 1027, 995, 964, 860, 806, 760, 754, 706 cm⁻¹.

9.3 Sinteza 1-(4-aminobenzil)piperidin-3-karboksamida (**12**)



V troglavi bučki smo raztopili 850 mg spojine **8** (3,23 mmol, 1 ekv) v 70 mL MeOH. Bučko smo nato prepihalo z Ar_(g). Dodali smo 100 mg Pd/C (10% (m/m)). Nato smo v bučko uvajali plinasti H_{2(g)} pri sobni temperaturi s pomočjo balončka, dokler na TLC plošči ni izginila lisa z R_f = 0,60. Nato smo Pd/C odfiltrirali s presesavanjem skozi plast peska in celita ter filtratu uparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo olje (zelene barve). ¹H-NMR in TLC sta pokazala, da spojina ni čista, zato smo jo očistili s kolonsko kromatografijo. Ločeno smo zbrali dve lisi in izolirali spojino z R_f=0,20. Kot mobilno fazo smo uporabili EtOAc:MeOH=2:1. Izoliran produkt smo takoj uporabili v naslednji reakcijski stopnji.

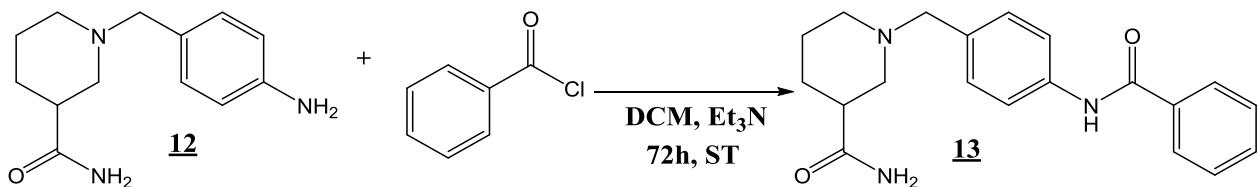
Ime / molska masa: *1-(4-aminobenzil)piperidin-3-karboksamid (**12**)* / 233,32 g/mol

Izgled / izkoristek: olje / 20 %

TLC / oroševalni reagent: R_f (EtOAc:MeOH=2:1)= 0,14 / ninhidrin

¹H NMR: premalo spojine za zanesljivo analizo spektra, preostanek pa je bil uporabljen takoj v naslednji reakciji. Potrebna bi bila ponovna sinteza in analiza.

9.4 Sinteza *1-(4-benzamidobenzil)piperidin-3-karboksamida (**13**)*



75 mg spojine **12** (0,3 mmol, 1 ekv) smo raztopili v 30 mL DCM ter dodali 340 µl Et₃N (2,47 mmol, 8 ekv). Nato smo dodali 40 µl benzoil klorida (0,33 mmol, 1.1 ekv) in pustili mešati na sobni temperaturi 3 dni. Po končani reakciji smo uparili DCM pod znižanim tlakom ter zaostanek nakisali z 10 mL 1M HCl. Dodali smo še 10 mL H₂O in 20 mL EtOAc. Ločili smo fazi ter vodno fazo naalkalili z NaHCO_{3(aq)} do pH 8 in ekstrahirali z EtOAc (2×15 mL). Združene organske faze smo spirali z H₂O (1×20 mL) in nasičeno vodno raztopino NaCl_(aq) (1×20 mL). Zbrane organske faze smo sušili z Na₂SO_{4(s)}, uparili EtOAc in dobili olje kot produkt.

Ime / molska masa: *1-(4-benzamidobenzil)piperidin-3-karboksamid (**13**)* / 337,42 g/mol

Izgled / izkoristek: olje / 82 %

TLC / oroševalni reagent: R_f (EtOAc:MeOH=2:1)= 0,36 / ninhidrin

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 1.06–1.63 (m, 1H, CH₂), 1.64–1.70 (m, 3H, CH₂ in CH₂), 1.89–1.99 (m, 1H, CH₂), 2.29–2.34 (m, 2H, CH₂), 2.67–2.76 (m, 1H, CH₂), 2.78–

2.99 (m, 1H, CH), 3.01–3.51(m, 2H, CH₂), 6.76 (br s, 1H, NH₂), 7.24–7.29 (m, 3H, ArH in NH₂), 7.52–7.62 (m, 3H, ArH), 7.72–7.76 (m, 2H, ArH), 7.95–7.97 (m, 2H, ArH), 10.26 (d, *J*=4.4 Hz, 1H, NH).

9.5 Sinteza 5-(1-benzilpiperidin-3-il)-1,3,4-oksatiazol-2-ona in njegovih derivatov

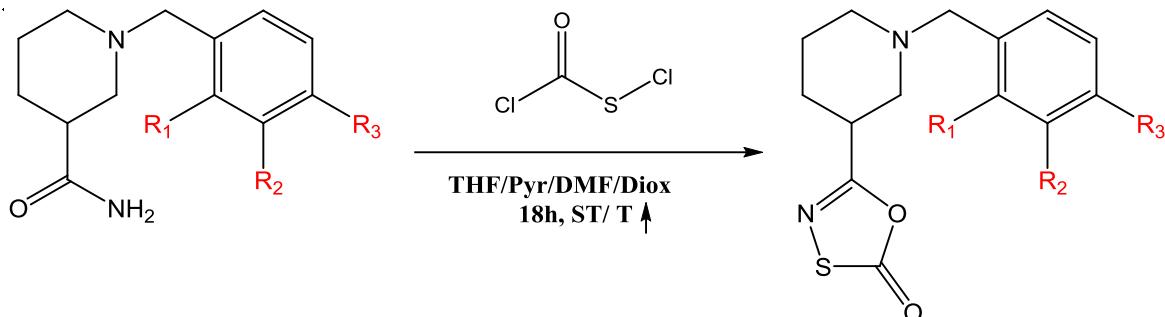
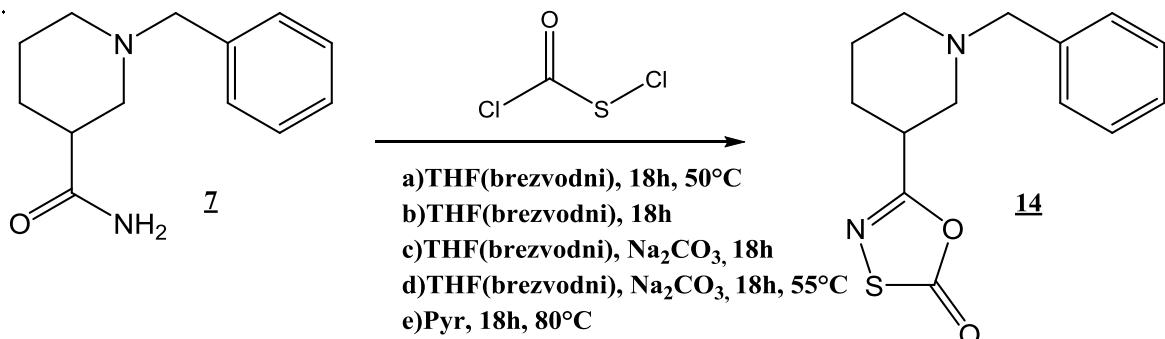


Tabela I: derivati 5-(1-benzilpiperidin-3-il)-1,3,4-oksatiazol-2-ona

	OSE 24	OSE 28	OSE 29	OSE 30	OSE 33	OSE 34
R₁	/	/	F	/	/	/
R₂	/	/	/	Cl	NHCOPh	/
R₃	NO ₂	COOCH ₃	CN	/	/	/

9.5.1 Poskusi sinteze 5-(1-benzilpiperidin-3-il)-1,3,4-oksatiazol-2-ona (**14**)



a) Ker reakcija zahteva brezvodne pogoje, smo najprej pripravili brezvodni THF. Vzeli smo molekulska sita, jih dali v erlenmajerico ter jih segrevali (120 °C). Po segrevanju smo jih prepihalili z argonom. Nato smo dodali sveže destiliran THF. Na dvoglavo bučko smo nastavili povratni hladilnik s septumom za prepihanje z argonom. Na drugo glavo smo dodali stranski septum za dodajanje reagentov. V bučko smo nato dodali 100 mg spojine **7** (0,458 mmol, 1 ekv) in 4 mL brezvodnega THF. Ko se je izhodna spojina raztopila, smo bučko dali na led in z brizgo prek septuma po kapljicah dodali 0,1 mL ClOSCl (1,185

mmol, 2,5 ekv). Reakcijsko zmes smo nato segrevali pri 50 °C. Po 1h smo dodali še 2 mL THF ter 2 mL DMF. Reakcijo smo pustili v argonovi atmosferi teči preko noči. Topila smo uparili pod znižanim tlakom in preostanek očistili s kolonsko kromatografijo. Dobili smo minimalno količino produkta po stenah bučke.

Izgled / izkoristek / : trdna snov / minimalen

TLC / oroševalni reagent: Rf (EtOAc)= 0,89 / ninhidrin

b) Sočasno smo nastavili isto reakcijo pri spremenjenih pogojih. Potek reakcije je bil enak kot prej, s to razliko, da smo zmes mešali v argonovi atmosferi čez noč pri sobni temperaturi. Naslednje jutro se nismo odločili za izolacijo, saj smo s TLC opazili, da reakcija ni potekla.

c) Pogoje smo še bolj spremenili. Postopek smo izvedli kot v prejšnji reakciji, s to razliko, da smo sedaj v reakcijsko zmes dodali še 100 mg Na₂CO₃ (0,916 mmol, 2 ekv). Nastavili smo 2 reakciji. Pri prvi smo reakcijsko zmes pustili mešati pri sobni temperaturi v atmosferi argona čez noč, pri drugi (d) pa smo segrevali na 55 °C. Izolacija je bila identična pri obeh. Naslednje jutro smo dodali 0,32 mL Et₃N (2,29 mmol, 5 ekv) in 20 mL brezvodnega THF. Pustili smo mešati 15 min, nato pa smo odfiltrirali oborino prek teflonskega filtra. Matičnici smo uparili THF pod znižanim tlakom, zaostanek raztopili v EtOAc in ga nanesli na kolono. Kolono smo pripravili z 18 g silikagela in EtOAc kot mobilno fazo. Zbirali smo frakcije po 2 mL. Pri reakciji, ki je potekala pri temperaturi 55 °C, smo zbrali frakcije vseh lis, a je bilo vzorca pri vseh premalo za nadaljnje analize. Pri drugi reakciji smo zbirali frakcije, ki so ustrezale spojini z Rf = 0,80. Po uparevanju EtOAc in sušenju na vakuumu 30 min, smo dobili rjavkasto trdno snov na stenah bučke.

Izgled: trdna snov / 12 %

TLC / oroševalni reagent : Rf (EtOAc)= 0,80 / ninhidrin

e) Sledil je eksperiment v piridinu. Najprej smo prežarili bučko, vanjo dodali 100 mg spojine **7** (0,458 mmol, 1 ekv) in 5 mL piridina. Reakcijsko zmes smo postavili na led in po kapljicah s stekleno brizgo dodali 0,1 mL ClOSCl (0,916 mmol, 2 ekv). Reakcijsko zmes smo opremili s povratnim hladilnikom in segrevali pri 80 °C čez noč. Naslednje jutro smo dodali 0,32 mL Et₃N (2,29 mmol, 5 ekv). Pustili smo mešati 15 min, nato pa odfiltrirali oborino s presesavanjem. Matičnici smo uparili piridin pod znižanim tlakom. Nato smo pripravili kolono z 18 g silikagela in CH₂Cl₂:MeOH=9:1 kot mobilno fazo.

Zbrali smo frakcije, ki so ustrezale spojini z $R_f = 0,80$. Po uparevanju EtOAc smo dobili rjavkasto trdno snov na stenah bučke.

Ime / molska masa: *1-benzilpiperidin-3-karbonitril (15)* / 200,29 g/mol

Izgled / izkoristek: trdna rjava snov / 33 %

TLC / oroševalni reagent: R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=9:1$)= 0,95 / ninhidrin

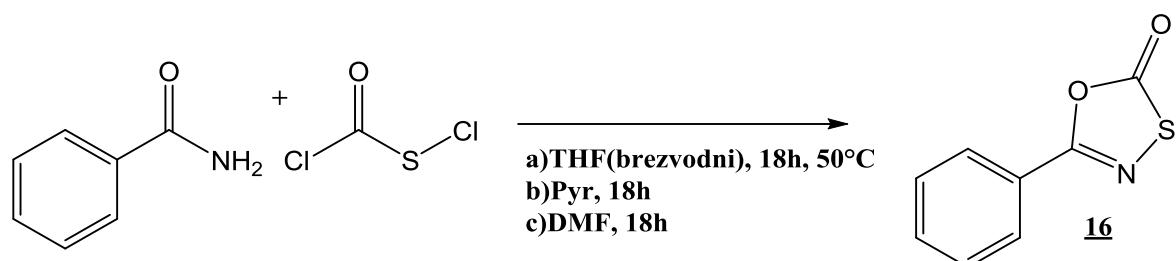
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 1.54 (s, 1H, CH_2), 1.67 (s, 3H, CH_2), 2.27–2.28 (m, 1H, CH_2), 2.46–2.55 (m, 2H, CH_2 in CH), 2.59 (s, 1H, CH_2), 3.01 (s, 1H, CH_2), 3.50–3.57 (m, 2H, CH_2), 7.26–7.36 (m, 5H, ArH)

$^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 22.8, 26.6, 42.3, 53.1, 55.8, 61.5, 121.8, 126.9, 128.1, 128.2, 128.4, 128.6, 137.8

IR (ATR): ν 2943, 2804, 2766, 2240, 1493, 1452, 1393, 1349, 1309, 1257, 1205, 1151, 1099, 1072, 1011, 985, 959, 911, 868, 773, 604, 565, 542, 510 cm^{-1}

HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ teoretična za $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$, 201.1397, dejanska 201.1392

9.5.2 Sinteza 5-fenil-1,3,4-oksatiazol-2-ona (16)



a) Reakcijo smo izvajali na enak način kot pri **14** a) reakciji. V bučko smo dodali 350 mg benzamida (2,9 mmol, 1 ekv) in 10 mL brezvodnega THF. Mešali smo, dokler se reagent ni raztopil, bučko postavili na led in po kapljicah dodali 420 μl ClOSCl (4,96 mmol, 1.7 ekv). Po izolaciji (uparevanje topila pod tlakom) smo dobili olje (rdeče-rjave barve).

Ime / molska masa: *5-fenil-1,3,4-oksatiazol-2-on (16)* / 179,19 g/mol

Izgled / izkoristek: olje (rdeče-rjave barve) / 89 %

TLC / oroševalni reagent: R_f (EtOAc)= 0,87 / ninhidrin

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 7.57-7.70 (m, 3H, ArH), 7.93-7.95 (m, 2H, ArH)

$^{13}\text{C NMR}$: spojina znana in popisana po literaturi (9)

b) Prejšnja reakcija je bila uspešna, vendar smo želeli poskusiti še z drugimi reagenti, saj z nipekotamidom nismo imeli uspeha. Poskusili smo z več različnimi topili. Prvi je bil piridin. Najprej smo prežarili bučko, jo močno prepigli s argonom, vanjo dodali 250 mg

benzamida (2,06 mmol, 1 ekv) in ga raztopili v 10 mL piridina, ki smo ga dodali s stekleno brizgo. Nato smo dodali 350 μ l ClOSCl (4,12 mmol, 2 ekv). Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi v argonovi atmosferi. Naslednje jutro smo dodali 1,4 mL Et₃N (10,3 mmol, 5 ekv). Pustili smo mešati 15 min, nato pa odfiltrirali oborino s presesavanjem. Matičnici smo uparili piridin pod znižanim tlakom. Nato smo pripravili kolono z 18 g silikagela in heksan:EtOAc=2:1 kot mobilno fazo. Zbrali smo frakcije, ki so vsebovale spojino z R_f = 0,95. Po uparevanju mobilne faze smo dobili trdno rjavkasto snov. Reakcija ni bila uspešna.

Izgled / izkoristek: trda rjava snov / zanemarljiv

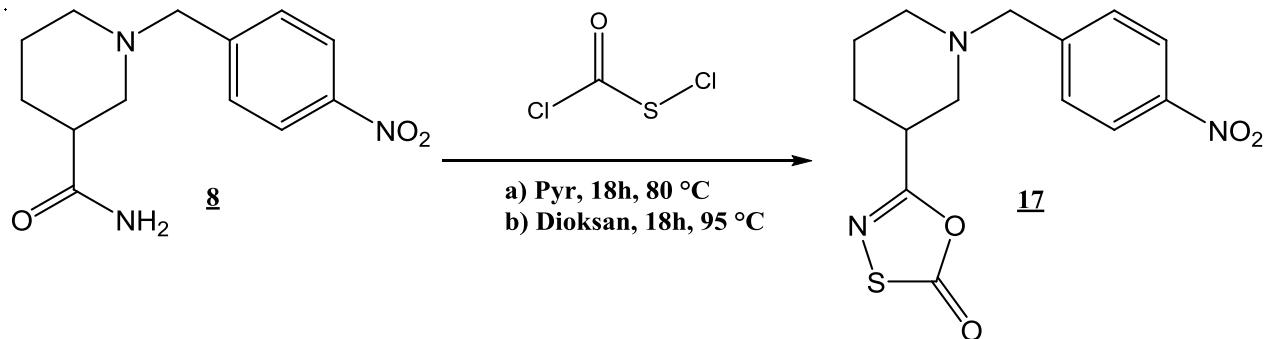
TLC / oroševalni reagent: R_f (H:EtOAc=2:1)= 0,95 / ninhidrin

c) Kot naslednje topilo smo uporabili DMF. Postopek je bil identičen kot pri piridinu, s to razliko, da smo raztopili benzamid v 10 mL DMF, ter da smo po 3h reakcije dodali še 175 μ l ClOSCl, (2,06 mmol, 1 ekv). Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi v argonovi atmosferi. Naslednje jutro smo dodali 1,4 mL Et₃N (10,3 mmol, 5 ekv). Pustili smo mešati 15 min, nato pa odfiltrirali oborino s presesavanjem. Matičnici smo uparili DMF pod znižanim tlakom. Nato smo pripravili kolono z 18 g silikagela in H:EtOAc=2:1 kot mobilno fazo. Zbrali smo frakcije, ki so vsebovale spojino z R_f = 0,75. Po uparevanju mobilne faze in sušenju na vakuumu 30 min, smo dobili olje kot pri a) reakciji.

Izgled / izkoristek: olje / zanemarljiv

TLC / oroševalni reagent: R_f (H:EtOAc=2:1)= 0,75 / ninhidrin

9.5.3 Sinteza 5-(1-(4-nitrobenzil)piperidin-3-il)-1,3,4-oksatiazol-2-ona (17)



a) Najprej smo prežarili bučko, vanjo dodali 100 mg **8** (0,379 mmol, 1 ekv) ter s stekleno brizgo dodali 10 mL piridina. Bučko smo nato dali na led ter po dodali 0,1 mL ClOSCl

(0,759 mmol, 2 ekv). Reakcijsko zmes smo opremili s povratnim hladilnikom in jo segrevali pri 80°C. Pustili smo jo mešati na argonski atmosferi čez noč. Naslednje jutro smo dodali 0,32 mL Et₃N (2,29 mmol, 5 ekv). Pustili smo mešati 15 min, nato odfiltrirali oborino s presesavanjem. Matičnici smo uparili piridin pod znižanim tlakom. Nato smo pripravili kolono z 18 g silikagela in CH₂Cl₂:MeOH=9:1 kot mobilno fazo. Zaostanek po uparevanju smo raztopili v minimalni količini mobilne faze. To smo nanesli na kolono in zbirali frakcije po 2 mL. Zbrali smo frakcije, ki so vsebovale spojino z R_f = 0,96. Po uparevanju mobilne faze in sušenju na vakuumu 30 min, smo dobili rjavkasto trdno snov kot pri **15** na stenah bučke.

Ime / molska masa : 1-(4-nitrobenzil)piperidin-3-karbonitril (**18**) / 245,28 g/mol

Izgled / izkoristek: trdna rjava snov / 34 %

TLC / oroševalni reagent: R_f (CH₂Cl₂:MeOH=9:1)= 0,96 / ninhidrin

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.64–1.65 (m, 1H, CH₂), 1.79–1.85 (m, 3H, CH₂), 2.46 (s, 2H, CH₂), 2.63 (s, 2H, CH₂), 2.81–2.84 (m, 1H, CH), 3.63 (dd, J=6.8, 14.4 Hz, 2H, CH₂), 7.53 (d, 2H, CH₂), 8.19 (dd, J=2.0, 4.8 Hz, 2H, ArH)

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 23.4, 27.4, 27.9, 53.3, 55.1, 61.7, 121.0, 123.7, 129.2, 145.8, 147.3

IR (ATR): ν 2945, 2802, 2240, 1599, 1467, 1439, 1154, 1093, 1033, 1012, 990, 955, 801, 773, 696, 651, 547 cm⁻¹

HRMS-ESI (m/z): [M+H]⁺ teoretična za C₁₄H₁₅N₃O₄S, 246.1242, dejanska 246.1243

b) Reakcijo smo ponovili še v dioksanu. Najprej smo prežarili bučko pri visoki temperaturi. Nato smo jo prepihalo z argonom in dodali 20 mL dioksana. Dodali smo 100 mg spojine **6** (0,379 mmol, 1 ekv). Ko se je izhodna spojina raztopila, smo dodali še 200 mg Na₂CO_{3(s)} (1,895 mmol, 5 ekv). Nato smo počasi s stekleno, plinsko neprepustno brizgo, prek septuma, dodali po kapljicah 70 μl ClOSCl (0,759 mmol, 2 ekv). Namestili smo povratni hladilnik na bučko in reakcijsko zmes segrevali pri 95 °C čez noč. Naslednje jutro smo dodali 270 μl Et₃N (1,895 mmol, 5 ekv) ter pustili mešati 15 min. Nato smo odfiltrirali oborino s presesavanjem in matičnici uparili dioksan. Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo; mobilna faza: heksan:EtOAc=2:1. Združili smo vse frakcije, ki so ustrezale spojini z R_f = 0,38. Pod znižanim tlakom smo odparili topilo. Dobili smo olje (rumenkaste barve).

Ime / molska masa: 5-(1-(4-nitrobenzil)piperidin-3-il)-1,3,4-oksatiazol-2-on (17) /
321,35 g/mol

Izgled / izkoristek: olje (rumeno) / 22 %

TLC / oroševalni reagent : Rf (H:EtOAc=2:1)= 0,38 / ninhidrin

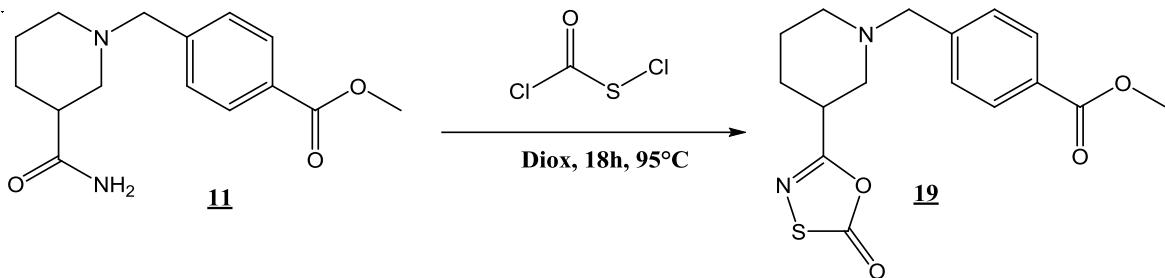
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 1.52–1.58 (m, 2H, CH₂), 1.71–1.74 (m, 1H, CH₂), 1.91–1.94 (1H, CH₂), 2.16 (s, 1H, CH₂), 2.26 (d, J=9.6 Hz, CH₂), 2.65–2.68 (m, 1H, CH₂), 2.88–2.96 (m, 2H, CH₂ in CH), 3.65 (s, 2H, CH₂), 7.58 (d, J=8.8 Hz, 2H, ArH), 8.18 (d, J=8.8 Hz, 2H, ArH)

¹³C NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 24.1, 26.6, 38.3, 53.5, 54.9, 61.5, 123.8, 130.1, 147.0, 162.9, 174.7

IR (ATR): v 2939, 2792, 1758, 1598, 1515, 1340, 1191, 1092, 926, 858, 802, 738, 650, 571 cm⁻¹

HRMS-ESI (m/z): [M+H]⁺ teoretična za C₁₄H₁₅N₃O₄S, 322.0867, dejanska 322.0862

9.5.4 Sinteza metil 4-((3-(2-okso-1,3,4-oksatiazol-5-il)piperidin-1-il)metil)benzoata (19)



Na identičen način, kot pri reakciji **17** b), smo tudi tu prežarili bučko, jo prepihalo z argonom in dodali 30 mL dioksana in 300 mg (1,082 mmol, 1 ekv) izhodne spojine **11**, vendar v dveh paralelkah, eno takoj, drugo po 3h segrevanja. Najprej smo dodali 200 mg spojine (0,721 mmol, 2/3 ekv). Ko se je izhodna spojina raztopila, smo dodali še 570 mg Na₂CO_{3(s)} (5,41 mmol, 5 ekvin 180 µl ClOSiCl (2,164 mmol, 2 ekv). Namestili smo povratni hladilnik na bučko in reakcijsko zmes segrevali pri 95 °C. Čez 3h smo nato dodali še preostalih 100 mg spojine **11** (0,360 mmol, 1/3 ekv), 90 µl ClOSiCl (1,082 mmol, 1 ekv) in pustili mešati čez noč. Naslednje jutro smo dodali 0,75 mL Et₃N (5,41 mmol, 5 ekv) ter pustili mešati 15 min. Nato smo odfiltrirali oborino s presesavanjem in matičnici uparili dioksan. Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo; mobilna faza: heksan:EtOAc=2:1. Združili smo vse frakcije, ki so ustrezale spojini z Rf = 0,38. Pod znižanim tlakom smo odparili topilo. Dobili smo olje (rumene barve).

Ime / molska masa: metil 4-((3-(2-okso-1,3,4-oksatiazol-5-il)piperidin-1-il)metil)benzoat (**19**) / 334,39 g/mol

Izgled / izkoristek: olje (rumeno) / 43 %

TLC / oroševalni reagent: Rf (H:EtOAc=2:1)= 0,29 / ninhidrin

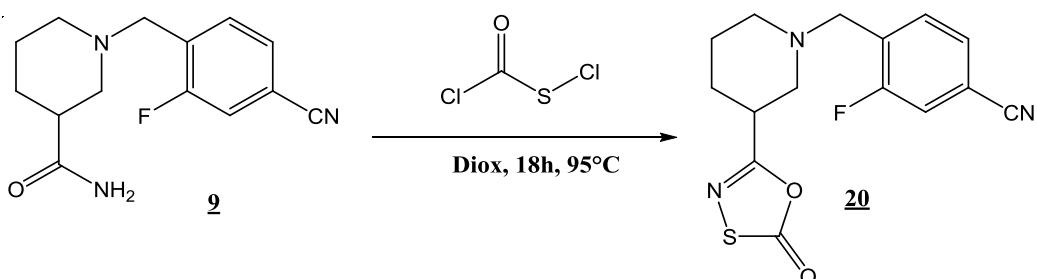
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 1.45–1.57 (m, 2H, CH₂), 1.72–1.75 (m, 1H, CH₂), 1.91–1.95 (m, 1H, CH₂), 2.09–2.17 (m, 1H, CH₂), 2.24–2.34 (m, 1H, CH₂), 2.65–2.68 (m, 1H, CH₂), 2.87–2.96 (m, 2H, CH₂ in CH), 3.59 (s, 2H, CH₂), 3.85 (s, 3H, CH₃), 7.45 (d, J=8.4 Hz, 2H, ArH), 7.93 (dd, J=2.0, 4.8 Hz, 2H, ArH)

¹³C NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 23.5, 26.1, 37.5, 52.0, 53.0, 54.5, 61.5, 128.3, 128.7, 128.8, 129.1, 129.1, 144.0, 162.4, 166.1, 174.2

IR (ATR): v 2946, 2801, 1759, 1717, 1609, 1434, 1415, 1395, 1349, 1309, 1275, 1190, 1173, 1106, 1049, 980, 928, 885, 801, 758, 731, 701, 650, 572, 538 cm⁻¹

HRMS-ESI (m/z): [M+H]⁺ teoretična C₁₆H₁₈N₂O₄S, 335.1061, dejanska 335.1066.

9.5.5 Sinteza 3-fluoro-4-((3-(2-okso-1,3,4-oksatiazol-5-il)piperidin-1-il)metil)benzonitrila (**20**)



Na identičen način, kot pri reakciji **17 b**), smo tudi tu prežarili bučko, jo prepihalo z argonom in dodali 30 mL dioksana in 300 mg (1,148 mmol, 1 ekv) izhodne spojine **10**, vendar v dveh paralelkah, eno takoj, drugo po 3h segrevanja. Najprej smo dodali 200 mg spojine (0,765 mmol, 2/3 ekv). Ko se je izhodna spojina raztopila, smo dodali še 608 mg Na₂CO_{3(s)} (5,74 mmol, 5 ekv) in ClOSiCl (2,296 mmol, 2 ekv). Namestili smo povratni hladilnik na bučko in reakcijsko zmes segrevali pri 95 °C. Čez 3h smo nato dodali še preostalih 100 mg spojine **10** (0,383 mmol, 1/3 ekv), 97 µl ClOSiCl (1,148 mmol, 1 ekv) in mešali čez noč. Naslednje jutro smo dodali 0,80 mL Et₃N (5,74 mmol, 5 ekv) ter pustili mešati 15 min. Nato smo odfiltrirali oborino s presesavanjem in matičnici uparili dioksan. Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo; mobilna faza: heksan:EtOAc=3:1. Združili smo vse frakcije, ki so ustrezale spojini z R_f = 0,29. Pod znižanim tlakom smo odparili topilo. Dobili smo olje (rumene bave).

Ime / molska masa: 3-fluoro-4-((3-(2-okso-1,3,4-oksatiazol-5-il)piperidin-1-il)metil)benzonitril (**20**) / 319,35 g/mol

Izgled / izkoristek: olje (rumeno) / 43 %

TLC / oroševalni reagent: Rf (H:EtOAc=3:1)= 0,29 / ninhidrin

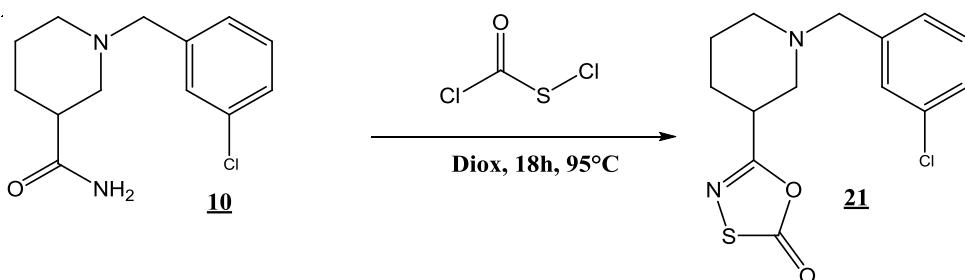
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 1.51–1.56 (m, 2H, CH₂), 1.70–1.72 (m, 1H, CH₂), 1.91–1.92 (m, 1H, CH₂), 2.14–2.19 (m, 1H, CH₂), 2.30–2.35 (m, 1H, CH₂), 2.64–2.67 (m, 1H, CH₂), 2.91–2.95 (m, 2H, CH in CH₂), 3.65 (s, 2H, CH₂), 7.62 (t, J =7.6 Hz, 1H, ArH), 7.69 (dd, J =1.6, 6.4 Hz, 1H, ArH), 7.83 (dd, J =1.2, 8.4 Hz, 1H, ArH)

^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 23.5, 26.0, 37.5, 52.7, 54.2, 54.3, 111.3, 117.7, 119.3, 128.5, 131.2, 132.2, 158.8, 162.4, 174.2

IR (ATR): ν 2947, 2811, 2232, 1758, 1599, 1571, 1496, 1413, 1356, 1260, 1189, 1153, 1089, 1050, 1024, 981, 941, 925, 870, 835, 783, 711, 621, 569 cm⁻¹

HRMS-ESI (m/z): [M+H]⁺ teoretična C₁₅H₁₄FN₃O₂S, 320.0873, dejanska, 320.0869

9.5.6 Sinteza 5-(1-(3-klorobenzil)piperidin-3-il)-1,3,4-oksatiazol-2-ona (**21**)



Na identičen način, kot pri reakciji **17 b**), smo tudi tu prežarili bučko, jo prepihalo z argonom in dodali 30 mL dioksana in 300 mg (1,187 mmol, 1 ekv) izhodne spojine **10**, vendar v dveh paralelkah, eno takoj, drugo po 3h segrevanja. Najprej smo dodali 200 mg spojine (0,791 mmol, 2/3 ekv). Ko se je izhodna spojina raztopila, smo dodali še 630 mg Na₂CO_{3(s)} (5,94 mmol, 5 ekv) in 200 µl ClOSCl (2,374 mmol, 2 ekv). Namestili smo povratni hladilnik na bučko in reakcijsko zmes segrevali na 95 °C. Čez 3h smo nato dodali še preostalih 100 mg spojine **10** (0,396 mmol, 1/3 ekv), 100 µl ClSOC₁ (1,187 mmol, 1 ekv) in pustili mešati čez noč. Naslednje jutro smo dodali 825 µl Et₃N (5,94 mmol, 5 ekv) in pustili mešati 15 min. Nato smo odfiltrirali oborino s presesavanjem in matičnici uparili dioksan. Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo; mobilna faza: heksan:EtOAc=3:1. Združili smo vse frakcije, ki so ustrezale spojini z Rf = 0,42. Pod znižanim tlakom smo odparili topilo. Dobili smo olje (rumene barve).

Ime / molska masa: 5-(1-(3-klorobenzil)piperidin-3-il)-1,3,4-oksatiazol-2-on (**21**) /
310,80 g/mol

Izgled / izkoristek: olje (rumeno) / zanemarljiv

TLC / oroševalni reagent: Rf (H:EtOAc=3:1)= 0,42 / ninhidrin

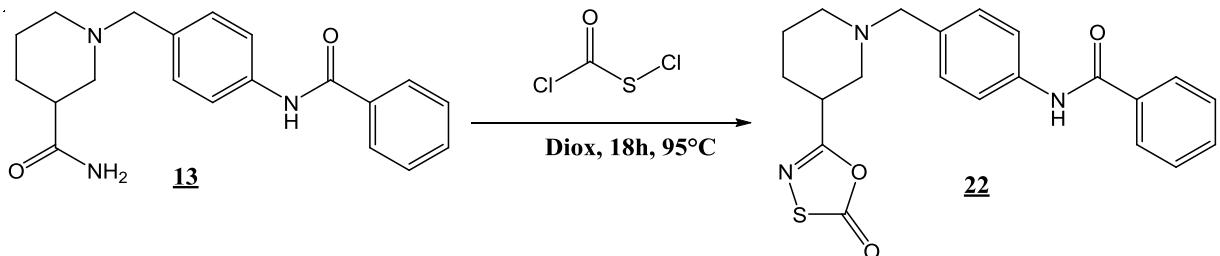
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.57–1.69 (m, 2H, CH₂), 1.77–1.83 (m, 1H, CH₂), 2.01–2.04 (m, 1H, CH₂), 2.09–2.14 (m, H, CH₂), 2.28–2.33 (m, 1H, CH₂), 2.73–2.76 (m, 1H, CH₂), 2.89–2.98 (m, 2H, CH₂ in CH), 3.50 (s, 2H, CH₂), 7.16–7.31 (m, 4H, ArH)

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 24.2, 26.9, 38.6, 53.5, 55.1, 62.5, 126.9, 127.4, 128.9, 128.6, 134.2, 140.2, 162.7, 174.3

IR (ATR): 3339, 3160, 2938, 2801, 2764, 1762, 1626, 1598, 1573, 1463, 1427, 1371, 1342, 1300, 1257, 1207, 1157, 1105, 1075, 1046, 997, 930, 892, 876, 863, 808, 776, 717, 705, 682, 655, 569, 536, 516 cm⁻¹

HRMS–ESI (m/z): [M+H]⁺ teoretična C₁₄H₁₅ClN₂O₂S, 311.0626, dejanska, 311.0621

9.5.7 Sinteza N-(4-((3-(2-okso-1,3,4-oksatiazol-5-il)piperidin-1-il)metil)fenil)benzamida (**22**)



Na identičen način, kot pri reakciji **17 b**), smo tudi tu prežarili bučko, jo prepahali z argonom, dodali 30 mL dioksana in 83 mg (0,2459 mmol, 1 ekv) izhodne spojine **13**. Ko se je izhodna spojina raztopila, smo dodali še 130 mg Na₂CO_{3(s)} (1,223 mmol, 5 ekv) in 40 µL ClOSCl (0,492 mmol, 2 ekv). Namestili smo povratni hladilnik na bučko in reakcijsko zmes segrevali na 95 °C čez noč. Naslednje jutro smo dodali 170 µL Et₃N (1,225 mmol, 5 ekv) ter pustili mešati 15 min. Nato smo odfiltrirali oborino s presesavanjem in matičnici uparili dioksan. Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo; mobilna faza: heksan:EtOAc=3:1. Združili smo vse frakcije, ki so ustrezale spojnini z Rf = 0,42. Pod znižanim tlakom smo odparili topilo. Dobili smo olje (rumene barve).

Ime / molska masa: N-(4-((3-(2-okso-1,3,4-oksatiazol-5-il)piperidin-1-il)metil)fenil)benzamida (**22**) / 395,48 g/mol

Izgled / izkoristek: rjava trdna snov / 16 %

TLC / oroševalni reagent: Rf (H:EtOAc=3:1)= 0,07 / ninhidrin

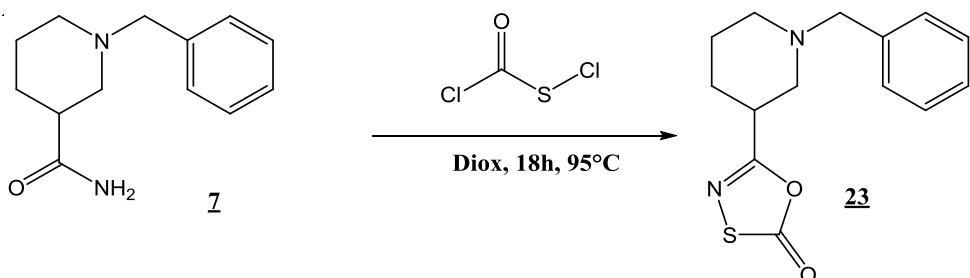
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 1.02–1.24 (m, 2H, CH₂), 1.54–1.56 (m, 1H, CH₂), 1.68 (s, 2H, CH₂), 2.28–2.30 (m, 1H, CH₂), 2.46–2.47 (m, 1H, CH₂), 2.58–2.60 (m, 1H, CH₂), 3.02 (s, 1H, CH), 3.44–3.55 (m, 2H, CH₂), 7.28 (d, J =8.4 Hz, 2H, ArH), 7.52–7.60 (m, 3H, ArH), 7.74 (d, J =8.4 Hz, 2H, ArH), 7.94–7.97 (m, 2H, ArH), 10.26 (s, 1H, NH)

$^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, CDCl₃): δ 23.4, 27.6, 52.9, 54.7, 62.1, 76.5, 120.2, 127.1, 128.8, 129.8, 131.9, 134.9, 165.8

IR (ATR): ν 2950, 2916, 2868, 2837, 1655, 1601, 1523, 1458, 1410, 1376, 1319, 1258, 1167, 1098, 997, 973, 841, 809, 168, 694 cm⁻¹

HRMS-ESI (m/z): [M+H]⁺ teoretična C₁₂H₂₁N₃O₃S, 396.1377, dejanska 396.1382.

9.5.8 Sinteza 5-(1-benzilpiperidin-3-il)-1,3,4-oksatiazol-2-ona (23)



Na identičen način, kot pri reakciji **17 b**), smo tudi tu prežarili bučko, jo prepihali z argonom, dodali 30 mL dioksana in 240 mg (1,100 mmol, 1 ekv) izhodne spojine **7**. Ko se je izhodna spojina raztopila, smo dodali še 580 mg Na₂CO_{3(s)} (5,5 mmol, 5 ekv) in 185 µl ClOSC_l (2,2 mmol, 2 ekv). Namestili smo povratni hladilnik na bučko in reakcijsko zmes segrevali na 95 °C čez noč. Naslednje jutro smo dodali 765 µl Et₃N (5,5 mmol, 5 ekv) in pustili mešati 15 min. Nato smo odfiltrirali oborino s presesavanjem in matičnici uparili dioksan. Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo; mobilna faza: heksan:EtOAc=3:1. Združili smo vse frakcije, ki so ustrezale spojini z Rf = 0,56. Pod znižanim tlakom smo odparili topilo. Dobili smo olje (rumene barve).

Ime / molska masa: 5-(1-benzilpiperidin-3-il)-1,3,4-oksatiazol-2-on (**23**) / 276,35 g/mol

Izgled / izkoristek: olje (rumeno) / 68 %

TLC / oroševalni reagent: Rf (H:EtOAc=3:1)= 0,56 / ninhidrin

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 1.50–1.56 (m, 2H, CH₂), 1.70–1.72 (m, 1H, CH₂), 1.88–1.93 (m, 1H, CH₂), 2.08–2.12 (m, 1H, CH₂), 2.20–2.25 (m, 1H, CH₂), 2.65–2.68 (m, 1H, CH₂), 2.88–2.92 (m, 2H, CH₂ in CH), 3.50 (d, J =2.8 Hz, 2H, CH₂), 7.23–7.34 (m, 5H,

ArH)

^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 24.2, 27.0, 38.6, 53.5, 55.1, 63.1, 127.2, 128.3, 128.9, 137.8, 162.9, 174.3

IR (ATR): ν 2942, 2800, 1758, 1666, 1599, 1493, 1467, 1450, 1350, 1320, 1287, 1188, 1152, 1097, 1071, 1049, 1025, 981, 926, 879, 791, 769, 738, 697, 664, 633, 599, 569, 522 cm^{-1}

HRMS–ESI (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ teoretična $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$, 277.1015, dejanska 277.1011

10 Rezultati in razprava

S pomočjo računalniške opreme smo poenostavili psoralenski osnovni skelet objavljenih spojin in dobili substituiran nipekotinski derivat.

10.1 Sinteza 1-benzilpiperidin-4-karboksilne kisline

Prvo stopnjo v sintezi naše spojine je predstavljala vezava substituirane benzilne skupine na piperidinski skelet. Izhajali smo iz izonipekotinske kisline. Na bazični center piperidina smo skušali prijeti aromatski del z reduktivnim aminiranjem. Pri tem tipu reakcije pride do pretvorbe karbonilne skupine v aminske prek iminskega intermediata. Ker smo pri sintezi spojine **1** uporabili NaBH_3CN , smo morali dodati ocetno kislino, da smo zagotovili rahlo kisle pogoje, ki so potrebni za nastanek imina. NaBH_3CN nato zreagira z iminskimi solmi do terciarnega amina. Čeprav smo videli izhajanje mehurčkov H_2 , ki se je sproščal pri reakciji, smo z NMR dokazali, da produkt ni pravi. Zato smo poskusili z močnejšim reducentom, ki ne potrebuje kislega okolja, NaBH_4 (**7**). Reakcija z NaBH_4 je bila precej burnejša. Po izolaciji in dobljenem NMR spektru smo ugotovili, da je reducent neselektiven in je reduciral benzaldehid do benzilnega alkohola. Tudi topilo ni bilo najbolj ustrezno, saj je bil nipekotamid zelo slabo topen. V vseh nadaljnjih poskusih smo reduktivno aminiranje zamenjali z alkiliranjem piperidinskega dušika z derivati benzilbromida.

Najprej smo pripravili etilni ester izonipekotinske kisline (**2**). SOCl_2 in EtOH zreagirata do etilklorida in brezvodnega HCl , ta pa omogoči kislinsko katalizirano esterifikacijo. Brezvodni HCl protonira karboksilno kislino, kar poveča elektrofilnost ogljika. Sledita nukleofilni napad $-\text{OH}$ skupine etanola in eliminacija vode, pri čemer nastane etilni ester izonipekotinske kisline. Ključnega pomena so brezvodni pogoji, saj SOCl_2 reagira z vodo, pri čemer nastane H_2SO_4 , reakcija pa je eksotermna. Ker je bil SOCl_2 v prebitku, smo morali biti pri izolaciji pozorni na več stvari. Po končani reakciji

smo v reakcijsko zmes dodali ledeno mrzlo H_2O . S tem smo pretvorili preostali SOCl_2 do H_2SO_4 . Nato smo nevtralizirali nastalo kislino s trdnim $\text{NaHCO}_{3(\text{s})}$. Tako smo preprečili delno hidrolizo estra. Pri ekstrakciji smo opazili, da se ester porazdeljuje tudi v vodni fazi in smo ga zelo težko ekstrahirali v organsko fazo, kar je privedlo do izgub.

Hidrolizo estra do proste karboksilne kisline smo izvajali v močno bazičnem mediju, ker je v tem primeru ireverzibilna. Pri sobni temperaturi je potekala počasi, zato smo reakcijsko zmes segrevali preko noči. Uporabili smo 2M NaOH , ki reagira tako, da hidroksidni ion napade karbonilni C-atom estra, pri čemer pride do nukleofilne substitucije. Kot produkt nastaneta sol karboksilne kisline in alkohol. Čeprav bi morala reakcija potekati brez težav, smo po izolaciji dobili zelo malo produkta. Nizke izkoristke lahko pripisemo neustreznemu topilu, v katerem je bil izhodni ester slabo topen.

Ker so reakcije esterifikacije in hidrolize imele nizke izkoristke in je teh reakcij na poti do končnih spojin veliko, smo se odločili preskočiti te stopnje in nadaljevati delo na bistveno dražjem, a vseeno komercialno dostopnem nipekotamidu.

10.2 Sinteza 1-benzilpiperidin-3-karboksamida in njegovih derivatov

Pri alkiliranju aminov poteče nukleofilna substitucija $\text{S}_{\text{N}}2$ tipa. Aminski nukleofilni dušik napade elektrofilni C-atom benzilbromida, pri čemer izstopi bromidni ion in nastane nova C-N vez. Bazični center (tako pri nipekotinski kislini kot pri nipekotamidu) lahko reagira s kislino in nastane sol. Zato smo dodali bazo (izhodna spojina v prebitku oziroma terciarni amin), da smo obdržali spojino v neprotonirani obliki, v kateri je lahko vstopala v reakcijo. Med reakcijo je nastajala oborina $\text{Et}_3\text{NH}^+\text{Br}^-$. Z NMR smo potrdili nastanek želenih produktov.

Upoštevajoč dosedanje ugotovitve pri optimizaciji, smo pri sintezi 1-benzilpiperidin-3-karboksamida uporabili za topilo DMF, saj ima višjo temperaturo vrelja (153 °C), kar omogoča višjo temperaturo, pri kateri lahko izvajamo reakcije, vsi reagenti pa se v njem razapljujo. Poleg tega smo namesto $\text{Et}_3\text{N}_{(\text{l})}$ kot bazo dodali nehlapni $\text{Na}_2\text{CO}_{3(\text{s})}$. Segrevali smo pri 100 °C čez noč in dobili precej boljše izkoristke tako za 7 (56%) kot za 8, katerega izkoristek je bil kar 93%. Ker sta bili reakciji nastavljeni na enak način in pri enakih pogojih, je razlog verjetno v izhodni spojini, saj smo benzilbromida imeli zelo malo na razpolago, hkrati je bil precej star. Prav tako smo verjetno nekaj produkta izgubili med izolacijo. Vse ostale derivate karboksamida smo sintetizirali na enak

način, torej je razlog različnih izkoristkov vpliv reagentov (elektronski efekti substituentov na aromatu) in izgube med izolacijo.

10.3 Sinteza 1-(4-benzamidobenzil)piperidin-3-karboksamida

Z dosedanjimi reakcijami smo dobili samo HT1054-u (Slika 16 – **1j**) strukturno podobne spojine. Ker so manjše molekule bolj selektivne za mikobakterijski proteasom, smo želeli sintetizirati molekulo z večjim lipofilnim fragmentom. Izkoristili smo nitro skupino **8**, jo najprej reducirali do amina (**12**), nato acilirali in s tem vgradili še dodatni aromatski obroč (**13**). Redukcijo smo izvedli s pomočjo katalizatorja, paladija na ogljiku, in v zaprt sistem dovajali $H_2(g)$. S TLC smo spremljali potek reakcije, dokler ni izginila lisa izhodne spojine. Nastajali sta dve lisi z $R_f = 0,20$ in $R_f = 0,86$. Po NMR analizi smo ugotovili, da je produkt spojina z nižjim R_f , ki smo jo očistili s kolonsko kromatografijo.

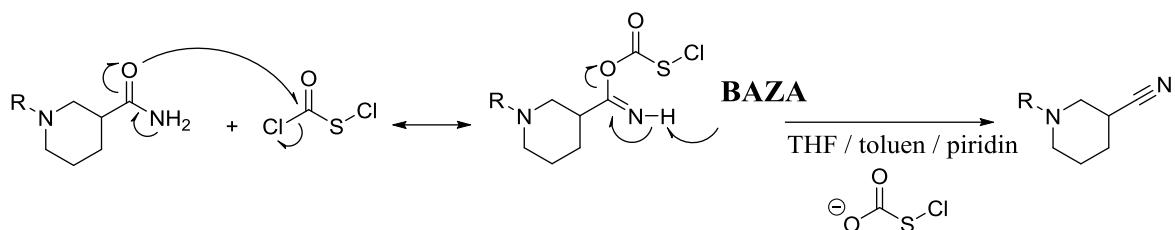
Po izolaciji smo dobljeni produkt takoj acilirali. Pri aciliranju gre za nukleofilno acilno substitucijo, pri čemer pride do napada nukleofilnega aromatskega amina na elektrofilni karbonilni C-atom benzoilklorida. Cl^- je dobra izstopajoča skupina in ob njenem izstopu nastane na tem mestu nova vez C-N. Tako nastane amidni produkt. Acilirali smo z benzoilkloridom, dodali DCM kot topilo ter Et_3N kot bazo, da veže novonastalo kislino ter ohrani našo izhodno spojino v neprotонirani obliki.

10.4 Sinteza 5-(1-benzilpiperidin-3-il)-1,3,4-oksatiazol-2-on in njegovih derivatov

Ključna reakcija pri sintezi naših spojin je bila ciklizacija ustrezeno substituiranih nipekotamidov do piperidin-3-il-oksatiazol-2-onov oz. sinteza elektrofilnega centra, izjemno selektivnega do proteasomskega Thr10. V literaturi smo našli postopek, kjer so sintetizirali želeni fragment na analogu bortezomiba s $ClOSCl$ v THF (7). Kljub natančnemu upoštevanju navodil in številnim poskusom nam ni uspelo pripraviti produkta. Poskušali smo s spremembom topila, izbrali smo nepolarni toluen, ki je bolj inerten in ima višjo temperaturo vrelišča. Rezultati so bili podobni kot pri THF. Reakcije, ki smo jih izvajali na sobni temperaturi, so bile neuspešne, saj smo na TLC ploščah opazili samo nezreagirano izhodno spojino. Pri višjih temperaturah smo dobili zmes številnih produktov. Podobno se je zgodilo, ko smo kot topilo uporabili piridin, ki je bil boljši z vidika raztapljanja reagentov in produktov. Težava je bila verjetno v bazičnem centru piperidinskih derivatov, ki v člankih do sedaj ni bila opisana.

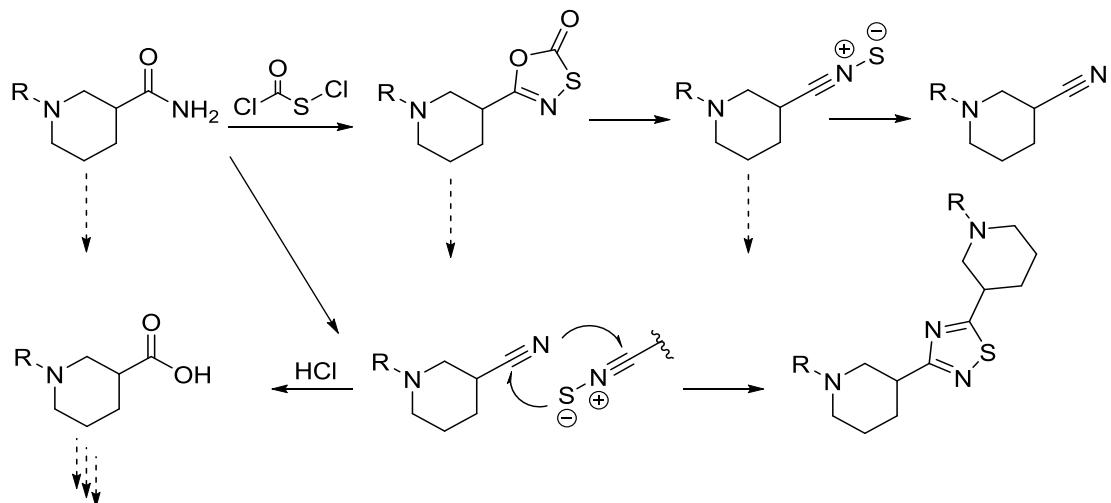
Do napredka je prišlo pri sintezi spojine **15**, katero smo dobili pri enemu izmed

poskusov sinteze **14**. Eden izmed produktov je precej izstopal z relativno visokim izkoristkom, 33 %. NMR eksperimenti so nakazali, da bi lahko šlo za našo spojino, vendar smo imeli težave s karboksamidnim C-atomom, ki je bil na spektru pri 121.8 ppm, moral pa bi biti precej višje. IR spekter je nato pokazal vrh pri 2240 cm^{-1} , ki je značilen za nitrilno skupino. S HRMS smo potrdili, da je kot stranski produkt nastal 1-benzilpiperidin-3-karbonitril. Sklepamo, da je potekla dehidracija primarnih amidov do nitrilov po spodaj prikazanem mehanizmu (Slika 20).



Slika 20: Predlagani mehanizem pretvorbe primarnih amidov do nitrilov

Gonilna sila dehidracije je primarni amid, ki reagira s ClOSCl, pri čemer nastane intermedijat, podobno kot pri reagentih za eliminacijo vode iz alkoholov. Sledi eliminacija, ki jo lahko katalizira izhodna spojina kot baza, ali pa druga baza v sistemu, v tem primeru piridin. Rezultat eliminacije je nastanek nitrilne skupine. Z odkritjem mehanizma stranske reakcije smo nato lahko sklepali na izvor ostalih stranskih produktov. Reakcije, ki lahko potečejo, so termična razgradnja nastalega oksatiazol-2-ona ter reakcije hidrolize (Slika 21). Pri termični razgradnji oksatiazol-2-ona lahko *in situ* nastane nitriilsulfid. To je zelo reaktivna kemijska zvrst, ki sodeluje pri cikloadicijah. Reagira lahko tudi z oksatiazol-2-onom, pri čemer nastanejo tiadiazoli.

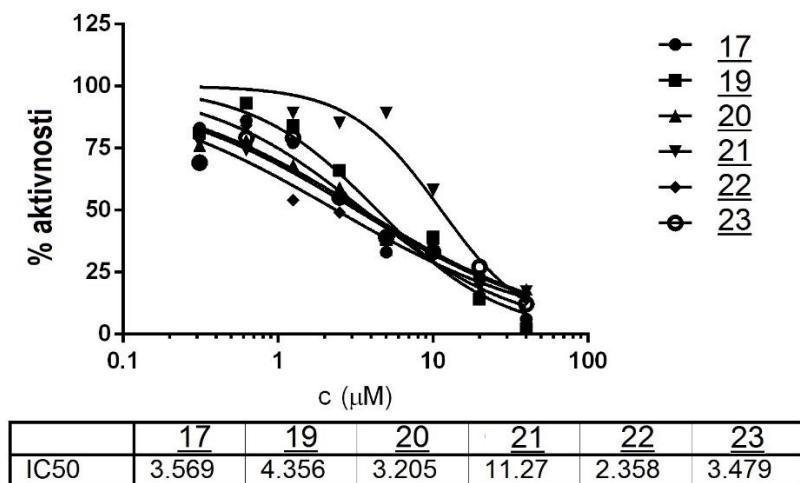


Slika 21: Možne stranske reakcije ciklizacije

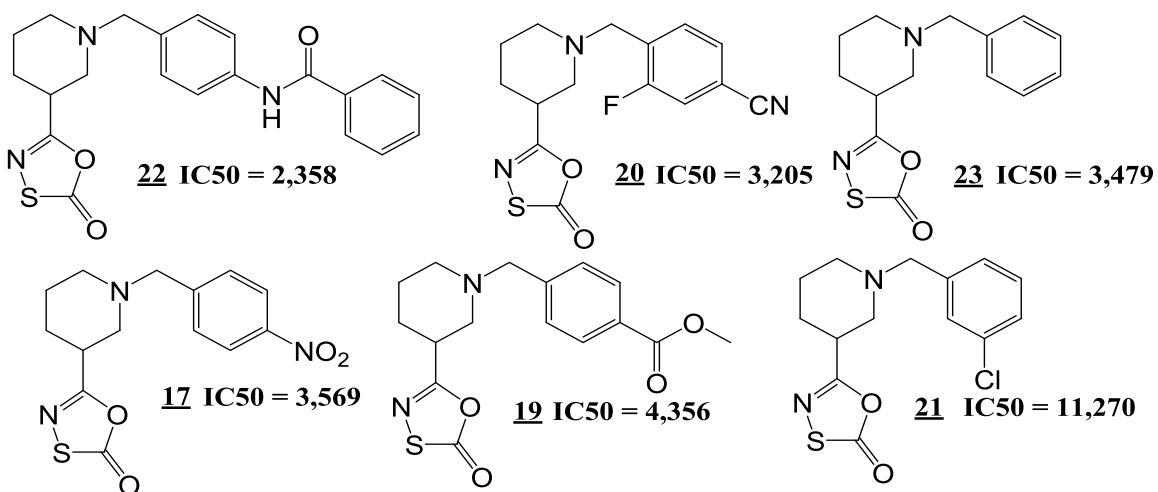
Ker so bili naši poskusi neuspešni, smo poskusili še z dioksanom pri temperaturi vrenja (**17 b**). Postopek smo priredili in smo karboksamide najprej raztopili v brezvodnem dioksanu (27 mL/1 mmol karboksamida) v inertnih pogojih. Dodali smo 5 ekvivalentov Na_2CO_3 ter 2 ekvivalenta ClOSCl . Reakcijsko zmes smo mešali pri 100 °C, 16h v inertni argonovi atmosferi. Po izolaciji smo z ^1H , ^{13}C NMR, IR in HRMS spektri dokazali, da smo dobili ustrezen produkt. Sledila je ciklizacija vseh karboksamidov, pri čemer smo na koncu dobili 6 končnih spojin.

10.5 Biokemično testiranje

Rezultati biokemičnih testiranj naših končnih spojin so predstavljeni v Sliki 22. Na podlagi IC_{50} vrednosti za prečiščen človeški iCP (β 5i podenoto) smo ugotovili, da večji, lipofilni fragmenti povečajo jakost, kar je opazno pri spojni **22**. Zanimivi so derivati s halogeni. Najmanjšo jakost je imel derivat s klorom na para mestu benzilnega obroča (**21**), derivat s fluoro skupino na drugem, ter ciano skupino na četrtem mestu (**20**) je bil $3,5\times$ aktivnejši od njega. Jakosti derivatov z navadnim benzilbromidm (**23**) ter nitrobenzilbromidom (**17**) sta bili primerljivi, rahlo manjšo je imel derivat z metilbenzoatom (**21**). (Slika 23) Zanimivo bi bilo še naprej raziskovati vpliv halogenov na aktivnost, ter vpliv večjih, lipofilnih fragmentov.



Slika 22: IC_{50} vrednosti končnih spojin za prečiščen človeški iCP



Slika 23: Strukture končnih spojin s pripadajočimi IC₅₀ vrednostmi v μM

11 Sklep

Cilj magistrske naloge, načrtovanje in sinteza derivatov piperidin-3-il-oksatiazol-2-ona, je bil uspešno opravljen, saj smo sintetizirali šest končnih spojin, ki so bile biokemično ovrednotene kot zaviralci proteasoma. Nekatere so imele zelo dobro aktivnost in predstavljajo potencial za nadaljnje raziskave.

Pripenjanje aromatskih obročev smo izvedli z alkiliranjem sekundarne aminske skupine piperidinskega obroča. Tako smo lahko pripravili številne spojine, ki so potrebovale le še zadnjo stopnjo, ciklizacijo – NH₂ do oksatiazol-2-onskega obroča. Po več poskusih, v katerih smo spreminjali reakcijske pogoje, smo pripravili ciljne molekule.

V magistrski nalogi smo odkrili reakcijske pogoje, ki nam omogočajo pripravo nabora različnih spojin, ki zavirajo imunoproteasom. Rezultate smo objavili v raziskovalnem članku (19).

12 Literatura

1. https://en.wikipedia.org/wiki/Proteasome#Structure_and_organization (Dostop 19.2.2017)
2. Ferrington A.D.; Gregerson D.S. Immunoproteasomes Structure, Function, and Antigen Presentation. *Prog Mol Biol Transl Sci.* **2012**, 109, 75–112.
3. Huber A. M.; Groll M. Inhibitors for the Immuno- and Constitutive Proteasome: Current and Future Trends in Drug Development. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2012**, 51, 8708-8720.
4. Sosič I.; Gobec M.; Brus B.; Knez D.; Živec D.; Konc J.; Lešnik S.; Ogrizek M.; Obreza A.; Žigon D.; Janežič D.; Mlinarič-Raščan I.; Gobec S. Nonpeptidic Selective Inhibitors of the Chymotrypsin-Like (β 5i) Subunit of the Immunoproteasome. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2016**, 55(19), 5745-5748.
5. McCarthy K.M.; Weinberg B.J. The immunoproteasome and viral infection: a complex regulator of inflammation. *Front Microbiol.* **2015**, 29, 6-21.
6. Dubiella C: Development and Characterization of Selective Immunoproteasome Inhibitors. Technische Universität München: Fakultät für Chemie: Lehrstuhl für Biochemie. München, **2015**.
7. Gryder E. B.; Guerrant W.; Ho Chen C.; Oyelere K. A.. Oxathiazole-2-one derivative of bortezomib: Synthesis, stability and proteasome inhibition activity. *Med. Chem. Commun.* **2011**, 2, 1083-1086.
8. Manetti D.; Mannelli L. D. C.; Dei S.; Guandalini L.; Martini E.; Banchelli M.; Ghelardini C. [35S]GTP γ S binding studies of amphiphilic drugs-activated Gi proteins: A caveat. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* **2009**, 19, 2224-2229.
9. Gang L.; Dongyang L.; Luiz Pedro S. d. C.; Haiteng D.; Hui T.; Guillaume V.; Kangyun W.; Jean S.; Tamutenda C.; J. David W., Huilin L.; Carl N. Inhibitors Selective for Mycobacterial versus Human Proteasomes. *Nature.* **2009**, 461(7624), 621-626.
10. Bhattacharai S.; Ghannam K.; Krause S.; Benveniste O.; Marg A.; de Bruin G.; ×in B-T.; Overkleef H.S.; Spuler S.; Stenzel W.; Feist E. The immunoproteasomes are key to regulate myokines and MHC class I expression in idiopathic inflammatory myopathies. *Journal of Autoimmunity.* **2016**, 75, 118-129.

11. Basler M.; Kirk J. C.; Groettrup M. The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions. *Current Opinion in Immunology*. **2013**, 25, 74–80.
12. Lonial S.; Boise H. L. Current Advances in Novel Proteasome Inhibitor-Based Approaches to the Treatment of Relapsed Refractory Multiple Myeloma. *Oncology (Williston Park)*. **2011**, 25(2), 25-31.
13. Basler M.; Mundt S.; Bitzer A.; Schmidt C.; Groettrup M. The immunoproteasome - a novel drug target for autoimmune diseases. *Clin Exp Rheumatol*. **2015**, 33 (92), 74-79.
14. Ghouzali I.; Lemaitre C.; Bahlouli W.; Azhar S.; Bole-Feysot C.; Meleine M.; Ducrotte P.; Dechelotte P.; Coeffier M. Targeting immunoproteasome and glutamine supplementation prevent intestinal hyperpermeability. *Biochimica et Biophysica Acta 1861*. **2017**, 3278–3288.
15. Lip Z.Y.P.; Demasi M.; Bonatto D. The role of the ubiquitin proteasome system in the memory process. *Neurochemistry International*. **2017**, 102, 57-65.
16. Wang J.; Maldonado A.M. The Ubiquitin-Proteasome System and Its Role in Inflammatory and Autoimmune Diseases. *Cellular & Molecular Immunology*. **2006**, 4, 255-261.
17. Momose I.; Kawada M.. Therapeutic Potential of Immunoproteasome Inhibition in Duchenne Muscular Dystrophy. *International Immunopharmacology*. **2016**, 37, 23–30.
18. P. Öhrngren, A. Fardost, F. Russo, J. S. Schanche, M. Fagrell, M. Evaluation of a Nonresonant Microwave Applicator for Continuous-Flow Chemistry Applications *Larhed, Org. Process Res. Dev.* **2012**, 16, 1053–1063.
19. Jukić M., Grabrijan K., Kadić S., Lera Garrido FJ, Sosić I., Gobec S., Obreza A. Chlorocarbonylsulfenyl Chloride Cyclizations Towards Piperidin-3-yl-oxathiazol-2-ones as Potential Covalent Inhibitors of Threonine Proteases. *Acta Chim. Slov.* **2017**, 64 (4), 771-781.