

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NIKA NUSDORFER

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA
FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NIKA NUSDORFER

**SINTEZA KOVALENTNIH ZAVIRALCEV
IMUNOPROTEASOMA Z AMINO-SUBSTITUIRANIM
PIPERIDINSKIM OBROČEM**

**SYNTHESIS OF COVALENT IMMUNOPROTEASOME
INHIBITORS WITH AMINO-SUBSTITUTED PIPERIDINE RING**

MASTER'S STUDY PROGRAMME INDUSTRIAL PHARMACY

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvom prof. dr. Aleša Obreze, mag. farm., in somentorstvom doc. dr. Marka Jukiča, mag. farm. Spektroskopske meritve so opravili na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Zahvala

Za vso pomoč, čas, nasvete in usmeritve med eksperimentalnim delom magistrske naloge se iskreno zahvaljujem mentorju prof. dr. Alešu Obrezi, mag. farm., in somentorju doc. dr. Marku Jukiču, mag. farm.

Posebna zahvala gre tudi mojim domačim za vso podporo in pomoč tekom študija.

Izjava

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

Nika Nusdorfer

Predsednik magistrske komisije: doc. dr. Tomaž Bratkovič, mag. farm.

Članica magistrske komisije: asist. dr. Špela Zupančič, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	I
KAZALO SLIK.....	III
POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1 UVOD.....	1
1.1 Splošno o razgradnji proteinov	1
1.2 Ubikvitin-proteasomski sistem razgradnje proteinov	1
1.3 Proteasom 26S	2
1.4 Imunoproteasom	5
1.5 Bolezenska stanja, povezana z (imuno)proteasomom	7
1.6 (Imuno)proteasom kot tarča zdravilnih učinkovin – zaviralci proteasoma	8
1.6.1 Neselektivni zaviralci proteasoma.....	9
1.6.2 Selektivni zaviralci proteasoma.....	11
2 NAMEN DELA	15
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 Materiali.....	17
3.2 Analizne metode	17
3.2.1 Kromatografske metode	17
3.2.2 Spektroskopske metode	18
3.2.3 Določanje temperature tališč	19
4 EKSPERIMENTALNO DELO	20
4.1 Sinteza bifetil-4-acetamidnih derivatov	20
4.1.1 Sinteza <i>terc</i> -butil (1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-4-il)karbamata (1)	20
4.1.2 Sinteza [1,1'-bifenil]-4-il(4-aminopiperidin-1-il)metanona (2).....	22
4.1.3 Sinteza <i>N</i> -(1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-4-il)-2-kloroacetamida (3)	22
4.1.4 Sinteza [1,1'-bifenil]-4-il(4-((oksiran-2-ilmetil)amino)piperidin-1-il)metanona (4)	24
4.1.5 Sinteza <i>N</i> -(1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-4-il)oksiran-2-karboksamida (5)	25
4.1.6 Sinteza <i>terc</i> -butil (1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-3-il)karbamata (6)	27
4.1.7 Sinteza (1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-3-amonijevega trifluoroacetata (7)	28
4.1.8 Sinteza <i>N</i> -(1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-3-il)-2-kloroacetamida (8)	28

4.1.9	Sinteza N-(1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-3-il)oksiran-2-karboksamida (9)	29
4.2	Sinteza 4-morfolinobenzoil-4-acetamidnih derivatov	31
4.2.1	Sinteza terc-butil (1-(4-morfolinobenzoil)piperidin-4-il)karbamata (10)	31
4.2.2	Sinteza 1-(4-morfolinobenzoil)piperidin-4-amonijevega trifluoroacetata (11)	32
4.2.3	Sinteza 2-kloro-N-(1-(4-morfolinobenzoil)piperidin-4-il)acetamida (12)	33
4.2.4	Sinteza N-(1-(4-morfolinobenzoil)piperidin-4-il)oksiran-2-karboksamida (13)	34
4.2.5	Sinteza terc-butil (1-(4-morfolinobenzoil)piperidin-3-il)karbamata (14)	36
4.2.6	Sinteza 1-(4-morfolinobenzoil)piperidin-3-amonijevega trifluoroacetata (15)	36
4.2.7	Sinteza 2-kloro-N-(1-(4-morfolinobenzoil)piperidin-3-il)acetamida (16)	37
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	39
5.1	Sinteza amidov z uporabo kislinskega klorida.....	39
5.2	Sinteza amidov iz karboksilne kisline (N-aciliranje).....	40
5.3	Odstranitev Boc zaščitne skupine z acidolizo.....	42
5.4	Uvedba elektrofilnega centra na aminopiperidinski skelet – uvedba kloroacetamidne »bojne glave«.....	43
5.5	Uvedba elektrofilnega centra na aminopiperidinski skelet – uvedba oksiran-2-karboksamidne (epoksiketonske) »bojne glave«.....	45
5.6	Uvedba elektrofilne metiloksiranske »bojne glave« na aminopiperidinski skelet	46
5.7	Komentar neuspešnih sintez reakcij z epiklorhidrinom.....	47
6	SKLEP	49
7	VIRI.....	50

KAZALO SLIK

Slika 1: Proces ubikvitinacije in vezave tarčnega proteina na proteasom 26S (prirejeno po 2).....	2
Slika 2: Struktura proteasoma 26S (prirejeno po 4)	3
Slika 3: Struktura proteasoma 20S (prirejeno po 6)	3
Slika 4: Zgradba proteasoma 19S in 20S (prirejeno po 7)	4
Slika 5: Primerjava struktur cCP in iCP (prirejeno po 11)	6
Slika 6: Vezavna mesta v aktivnem mestu katalitičnih podenot proteasoma (prirejeno po 9)	7
Slika 7: Vezavna mesta za substrat v podenoti $\beta 5$ v konstitutivnem proteasomu (levo) in v podenoti LMP-7 imunoproteasoma (desno) (prirejeno po 18).....	7
Slika 8: Struktura bortezomiba (rdeče obarvana elektrofilna bojna glava, modro pa vezavna mesta)	9
Slika 9: Struktura karfilzomiba (z zeleno označen morfolinski obroč, ki izboljša topnost, z modro vezavna mesta, z rdečo pa elektrofilna bojna glava).....	10
Slika 10: Struktura iksazomiba (desno) in njegovega predzdravila (levo).....	11
Slika 11: Strukturna formula ONX 0914 (z zeleno je označena N-morfolinil acetilna skupina, z rdečo epoksiketonska elektrofilna bojna glava, z modro so označena vezavna mesta iCP)	12
Slika 12: Terapevtske indikacije zdravljenja z ONX 0914 (prirejeno po 9)	12
Slika 13: Strukturna formula PR-924 (z rdečo je označena elektrofilna bojna glava, z modro pa vezavna mesta)	13
Slika 14: Struktura IPSI-001 (z rdečo je obkrožena elektrofilna bojna glava, z modro pa so označena vezavna mesta).....	14
Slika 15: Strukturne formule načrtovanih končnih spojin (s črno je obarvan skupni aminopiperidinski skelet, z zeleno stranske verige, z rdečo elektrofilne »bojne glave«) ...	16
Slika 16: Reakcijska shema sinteze N-(1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-4-il)-2-kloroacetamida (3), [1,1'-bifenil]-4-il(4-((oksiran-2-ilmetil)amino)piperidin-1-il)metanona (4) in N-(1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-4-il)oksiran-2-karboksamida (5)	20
Slika 17: Reakcijska shema sintez končnih spojin N-(1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-3-il)-2-kloroacetamida (8) in N-(1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-3-il)oksiran-2-karboksamida (9).....	26
Slika 18: Reakcijska shema sinteze 2-kloro-N-(1-(4-morfolinobenzoil)piperidin-4-il)acetamida (12) in N-(1-(4-morfolinobenzoil)piperidin-4-il)oksiran-2-karboksamida (13)	31
Slika 19: Reakcijska shema sinteze 2-kloro-N-(1-(4-morfolinobenzoil)piperidin-3-il)acetamida (16).....	35
Slika 20: Mehanizem nukleofilne substitucije.....	39
Slika 21: Mehanizem reakcije amina in karboksilne kisline s pomočjo sklopitvenih reagentov	41
Slika 22: Mehanizem odstranitve Boc- zaščitne skupine z uporabo TFA.....	43
Slika 23: Strukture končnih spojin pridobljenih po pripenjanju kloracetamidnega elektrofilnega centra	44
Slika 24: Reakcija pripenjanja kloracetamidne bojne glave na aminopiperidin (prirejeno po 28).....	45
Slika 25: Strukture končnih spojin pridobljenih s pripenjanjem epoksiketonske »bojne glave«	46

Slika 26: Struktura končne spojine pridobljene s pripenjanjem metiloksiranskega elektrofilnega centra	47
Slika 27: Shema neuspešne sinteze spojine 17	47
Slika 28: Shema neuspešne sinteze spojine 18	48

POVZETEK

Vzdrževanje ravnotežja med sintezo in razgradnjo proteinov v telesu je nujno za njegovo pravilno delovanje. Proteasom je ključni mehanizem v telesu, ki skrbi za optimalno razgradnjo znotrajceličnih proteinov. Konstitutivni proteasom je izražen v večini celic, imunoproteasom pa le v celicah imunskega sistema. Strukturno sta si oba tipa proteasoma zelo podobna, razlikujeta se le v treh katalitičnih podenotah β . Trenutno so na trgu trije neselektivni zaviralci proteasoma, težava katerih so številni neželeni učinki. Načrtovanje in sinteza selektivnih zaviralcev imunoproteasoma bi lahko pomenila nove načine zdravljenja avtoimunskih in rakavih obolenj.

Cilj magistrske naloge je bil načrtovanje in sinteza selektivnih kovalentnih zaviralcev imunoproteasoma, ki bi se vezali na aktivno mesto v katalitični podenoti LMP-7. Želeli smo, da se spojine najprej nekovalentno vežejo na podenoto LMP-7 in se tako približajo aktivnemu mestu treoninske proteaze, nato pa bi tvorili kovalentno vez s treoninom preko elektrofilne »bojne glave«. Odločili smo se za uvedbo kloroacetamidnih, metiloksiranskih in epoksiketonskih elektrofilnih centrov na substituiran aminopiperidinski skelet.

V vlogi izhodnih spojin smo imeli Boc-(terc-butiloksikarbonil)-zaščiten 3-aminopiperidin in 4-aminopiperidin. Osnovni mehanizem večine reakcij je bila nukleofilna substitucija, izjema je reakcija acidolize. Preden smo odstranili Boc-zaščitno skupino, smo na prostem dušiku tvorili amid s pomočjo kislinskih kloridov in sklopitvenih reagentov. Aminopiperidinski skelet, zaščiten z Boc, smo substituirali z bifenil-4-karbonil kloridom, sintetizirali pa smo tudi aminopiperidinski skelet, na katerega smo pripeli 4-morfolinobenzojsko kislino z uporabo sklopitvenih reagentov. Nato smo spojinam odstranili Boc-zaščito in na prostoaminsko skupino pripeli tri različne elektrofilne centre, ki so se prek amidne vezi povezali na aminopiperidinski skelet.

Uspešno smo sintetizirali štiri spojine s kloroacetamidno »bojno glavo«, eno z metiloksiransko »bojno glavo« in tri zaviralce z epoksiketonsko »bojno glavo«. Vseh osem končnih spojin bodo biokemijsko vrednotili na izolirani podenoti LMP-7 imunoproteasoma.

Ključne besede: imunoproteasom, aminopiperidin, selektivni zaviralci, podenota LMP-7

ABSTRACT

Maintaining normal cell homeostasis between synthesis and degradation of proteins is crucial for the proper functioning of the body. The proteasome is a key mechanism in the eukaryotic organisms that ensures optimum degradation of intracellular proteins. The constitutive proteasome is expressed in most eukaryotic cells whereas immunoproteasome is only expressed in the cells of the immune system. Structurally, both types of proteasomes are very similar, differing only in three catalytic β subunits. At the moment, there are three non-selective proteasome inhibitors approved by the FDA; the main problem of these inhibitors is the high presence of adverse effects. Designing and synthesis of selective immunoproteasome inhibitors would allow for new therapeutic possibilities in the treatment of autoimmune disorders and cancer therapy.

The purpose of the master thesis was the design and synthesis of selective covalent immunoproteasome inhibitors, that would bind to the active site of threonine in a catalytic subunit LMP-7. We wanted the compounds first to bind non-covalently to the subunit LMP-7 and thus approach the active site of threonine protease. Then, the inhibitors would covalently bind the electrophilic "warhead" to the catalytic threonine. We decided to introduce chloroacetamide, methylenioxirane and epoxyketone electrophilic centers to a substituted aminopiperidine skeleton.

Our starting compounds were Boc protected 3-aminopiperidine and 4-aminopiperidine. The fundamental mechanism of most reactions was nucleophilic substitution, except for acidolysis. Before removing the Boc protecting group, an amide was formed on the free nitrogen with the use of acid chlorides and coupling reagents. The aminopiperidine skeleton protected with Boc was substituted with biphenyl-4-carbonyl chloride. We also synthesized the aminopiperidine skeleton to which 4-morpholinobenzoic acid was added using coupling reagents. Subsequently, Boc-protecting group was removed from the compounds and three free electrophilic centers joined to the free amine group through the amide bond.

We successfully synthesized four compounds with a chloroacetamide "warhead", one with an ethylenoxirane "warhead" and three epoxyketones "warhead" inhibitors. All eight compounds will be biochemically evaluated on isolated subunits LMP-7 of immunoproteasome.

Key words: immunoproteasome, aminopiperidine, selective inhibitors, LMP-7 subunit

SEZNAM OKRAJŠAV

ATP	adenozin trifosfat
Boc	terc-butiloksikarbonilna zaščita
CDCl ₃	devterirani kloroform
cCP	konstitutivni proteasom
DMF	dimetilformamid
DKM	diklorometan
DMSO-d ₆	devterirani dimetilsulfoksid
E1	ubikvitin aktivirajoči encim
E2	ubikvitin konjugacijski encim
E3	ubikvitin ligaza
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
Et ₃ N	triethylamin
Et ₂ O	dietileter
EtOAc	etilacetat
FDA	Zvezna agencija za hrano in zdravila
HOBt	hidroksibenzotriazol
iCP	imunoproteasom
IFN-γ	interferon-gama
IR	infrardeča spektroskopija
LMP	nizko molekularni proteini
MS	masna spektrometrija

MECL-1	multikatalitična endopeptidazna podenota
MHC	poglavitni kompleks tkivne skladnosti
NMM	<i>N</i> -metilmorfolin
NMR	jedrska magnetna resonanca
Rf	retencijski faktor
Rpn11	regulatorna neATPazna podenota 11
TFA	trifluoroocetna kislina
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoplastna kromatografija
TNF- α	dejavnik tumorske nekroze alfa
Ub	ubikvitin

1 UVOD

1.1 Splošno o razgradnji proteinov

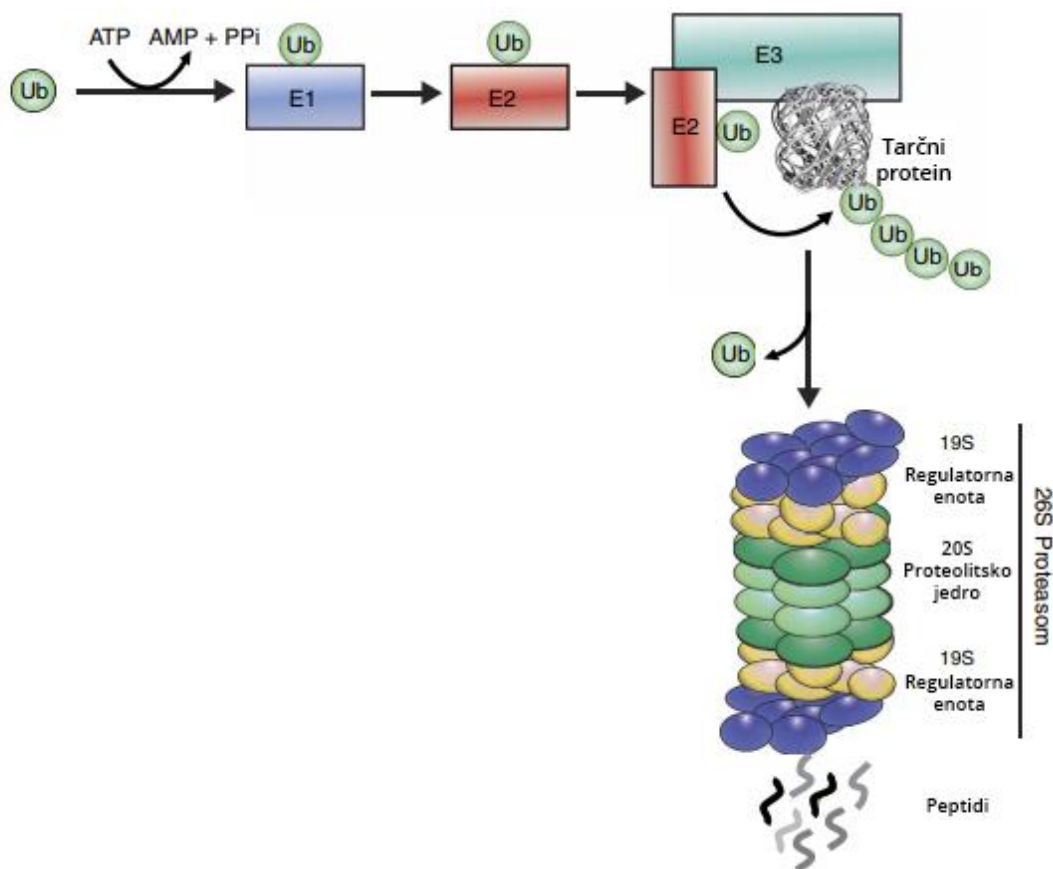
V telesu neprestano teče sinteza in razgradnja proteinov z namenom doseganja homeostaze in uravnavanja celičnega metabolizma. Razgradijo se napačno zviti, okvarjeni proteini in tisti, ki za telo niso več potrebni. Proteini se razgradijo s pomočjo encimov proteinaz, ki hidrolizirajo peptidno vez do krajših peptidov, ki se potem sprostijo v citosol. Znotrajcelični in zunajcelični proteini se razgradijo v dveh različnih procesih. Zunajcelični proteini so podvrženi zlasti lizosomalni razgradnji, medtem ko se znotrajcelični v veliki meri razgradijo s pomočjo proteasomov. Mehanizem razgradnje prek lizosomov je nespecifičen, proteini s pinocitozo ali endocitozo vstopijo v lizosom, kjer jih katepsini razgradijo. Razgradnja s proteasomi pa temelji na prepoznavi proteinov, označenih z ubikvitinom, ki so podvrženi proteasomski razgradnji (1, 2, 3).

1.2 Ubikvitin-proteasomski sistem razgradnje proteinov

Ubikvitin (Ub) je peptid, zgrajen iz 78 aminokislinskih ostankov, ki se preko treh encimov veže na protein in ga s tem označi za razgradnjo s pomočjo 26S proteasoma. Encimska kaskada vezave encimov na ubikvitin oz. ubikvitinacija se začne z vezavo cisteinskega ostanka ubikvitin aktivirajočega encima (E1) na C-končni glicin ubikvitina, pri tem se porabi energija v obliki hidrolize ATP. Aktiviran Ub se nato prenese in veže na cisteinski del ubikvitin konjugacijskega encima (E2) s procesom transesterifikacije. Zadnji korak ubikvitinacije je vezava Ub iz vezavnega mesta E2 na lizinski ostanek tarčnega proteina, ta korak katalizira encim ubikvitin ligaza (E3). Ubikvitin ligaze E3 so odgovorne za selektivnost do tarčnih proteinov. Na enak način se na prvo molekulo Ub vežejo še ostale in tvorijo polimerne verige ubikvitina. Na označen protein morajo biti vezane vsaj štiri molekule Ub, da ga proteasom prepozna in razgradi.

Vezava na proteasom 26S se začne s prepoznavo in vezavo tarčnega proteina na regulatorni protein 19S, ki je del proteasoma 26S. Njegova naloga je, da odstrani ostanke ubikvitina s proteina in s pomočjo ATPaz katalizira njegovo razvitje. Razvit tarčni protein se potem premesti v proteolizno notranjost proteasoma 20S, kjer se razcepi na peptide, dolge približno 8 aminokislin, ki se sprostijo v citosol za nadaljnjo uporabo ali razgradnjo. Proces

ubikvitinacije in vezave označenega proteina na proteasom 26S je predstavljen na sliki 1 (2, 4).

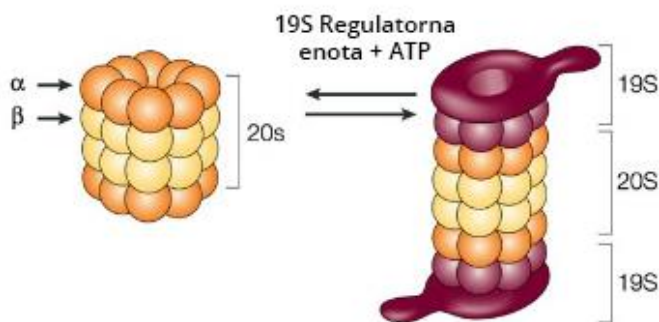


Slika 1: Proces ubikvitinacije in vezave tarčnega proteina na proteasom 26S (prirejeno po 2)

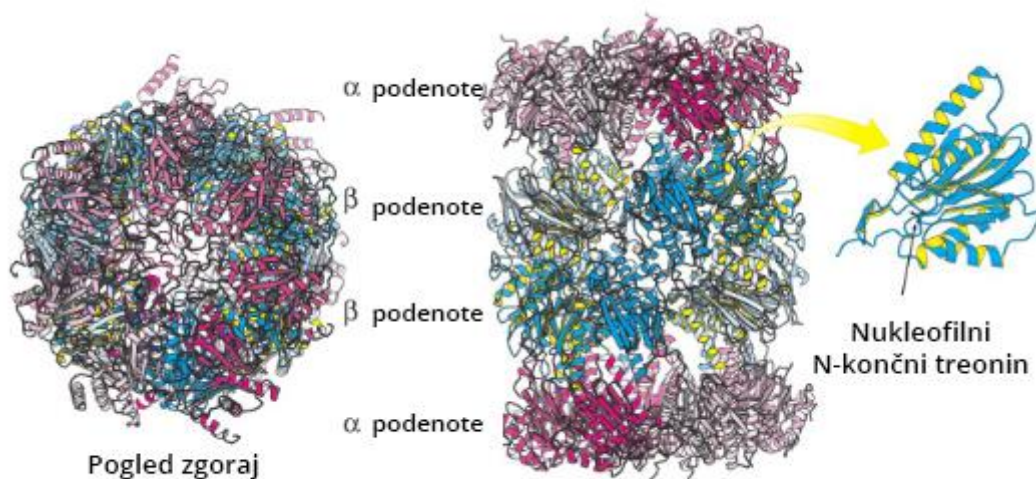
1.3 Proteasom 26S

V citosolu evkariontskih celic je proteasom 26S, 2,6 MDa velik, od ATP odvisen proteinski kompleks, sestavljen iz 31 podenot, ki skrbijo za strogo regulirano proteolizo proteinov, na katere je kovalentno vezan Ub. Poleg tega ima 26S proteasom pomembno vlogo pri nadzorovanju celičnega cikla, obdelavi in predstavitvi antigenov ter pri programirani celični smrti (apoptozi). 26S proteasom je znana tarča zdravilnih učinkovin za zdravljenje rakavih obolenj, morebitne nepravilnosti v njegovem delovanju pa so lahko vzrok tudi za pojav nevrodegenerativnih bolezni, kot sta Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen (5). Podenote 26S proteasoma imajo različno vlogo v procesu proteolize, nekatere so odgovorne za prepoznavo proteinov, druge za njihovo razvitje, translokacijo in razgradnjo proteinov. Podenote 26S proteasoma so razvrščene v dva kompleksa. 20S predstavlja proteolizno jedro proteasoma, 19S pa je regulatorni del proteasoma, ki prepozna, razvije in pomaga pri translokaciji tarčnih proteinov. 19S enoti proteasoma sta na enem ali obeh koncih

proteoliznega jedra. 20S enota je sestavljena iz podenot α in β , ki so v obliki valja razvrščene v štiri heptamerne obroče. Podenote si sledijo v zaporedju $\alpha\beta\beta\alpha$ (sliki 2 in 3). Za hidrolizo peptidnih vezi proteinov so odgovorni trije deli podenote β , to so $\beta 1$, $\beta 2$ in $\beta 5$. Nukleofilni N-končni ostanek treonina, ki se nahaja na katalitičnih podenotah β je zadolžen za cepitev in razgradnjo označenih proteinov.



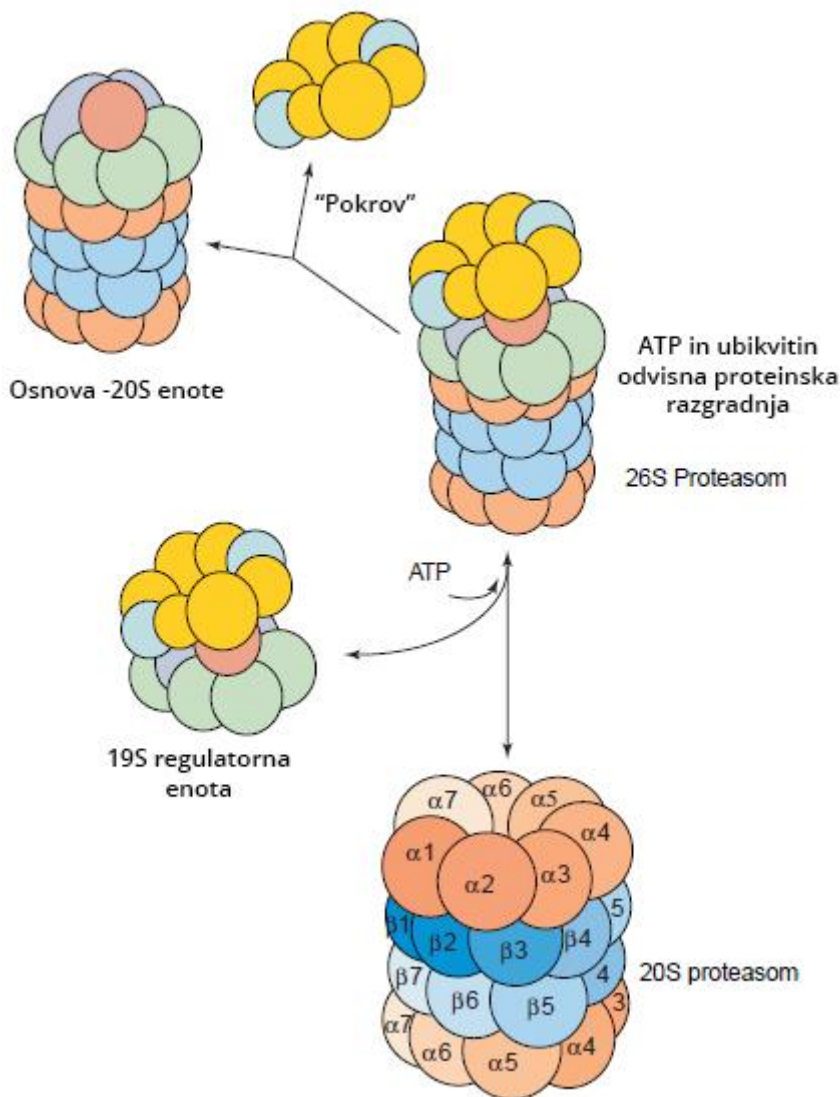
Slika 2: Struktura proteasoma 26S (prirejeno po 4)



Slika 3: Struktura proteasoma 20S (prirejeno po 6)

Podenoti α nadzorujeta vstop le razvitih proteinov, s tem se prepreči vstop za razgradnjo neustreznih proteinov in drugih sestavin celičnega okolja (4, 6). 19S kompleks proteasoma prepozna označene proteine, katalizira cepitev poliubikvitinske verige na monomerne enote Ub, ki ponovno vstopajo v proces ubikvitinacije. 19S enota denaturira in razvije označene polipeptide ter jih prenese v proteolizno jedro 20S enote (7). Regulatorna 19S enota je sestavljena iz vsaj 17 podenot, ki jih razdelimo na dva dela: na osnovo (ang. *base*) in pokrov (ang. *lid*) (slika 4). Prvi del oz. osnovo sestavlja šest različnih ATPaznih enot, ki so v stiku

z α -podenotami 20S, in tri od ATP neodvisne enote. Naloga ATPaz na osnovni enoti je vezava proteinov, pripravljenih na razgradnjo, in prenos do 20S enote. Proteini morajo biti v linearni obliki, da lahko preidejo ozek kanal, ki vodi do proteasoma 20S. Energija v obliki ATP je potrebna tako pri razvitju proteinov kot za njihovo translokacijo skozi ozek kanal v 20S enoto proteasoma. Drugi del oz. pokrov sestavljajo le neATPazne enote in izopeptidaza Rpn11, encim zadolžen za deubikvitinacijo; naloga tega dela je, da cepi poliubikvitinsko verigo na monomerne enote in tako reciklira Ub (4, 6, 8).

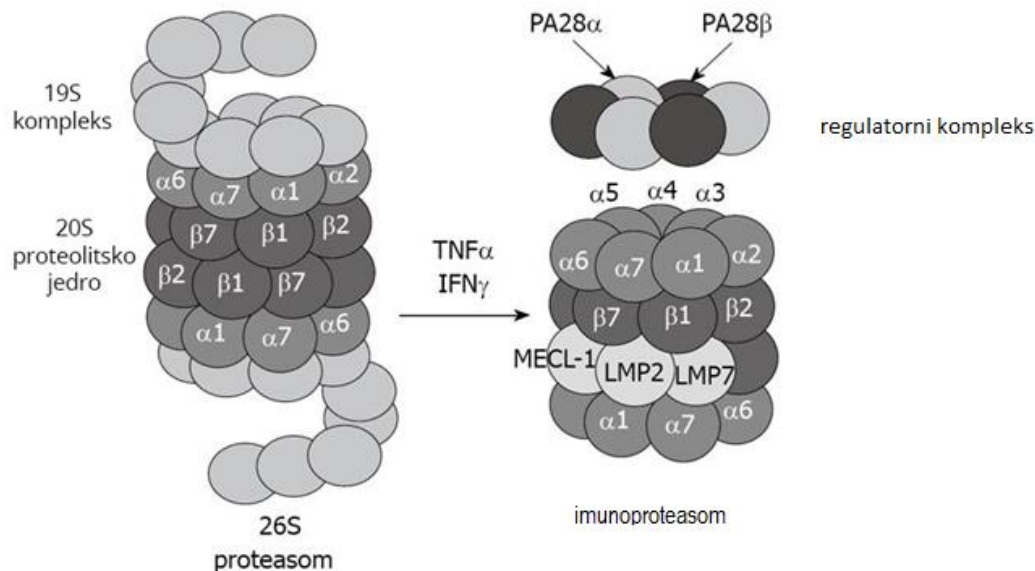


Slika 4: Zgradba proteasoma 19S in 20S (prirejeno po 7)

1.4 Imunoproteasom

Spremembe in zamenjave podenot β v proteoliznem jedru proteasoma 20S vplivajo na njegovo aktivnost, specifičnost in biološke funkcije. Poznamo tri tipe proteoliznega jedra: konstitutivni proteasom (cCP), ki je opisan zgoraj in ga najdemo v večini tkiv, timoproteasom, specifičen za epiteljske celice skorje timusa, in imunoproteasom (iCP), ki ga najdemo predvsem v monocitih in limfocitih. Imunoproteasom najdemo v tkivih imunskega sistema, to so timus, jetra, ledvica, debelo in tanko črevo, poleg tega pa je lahko izražen tudi v tkivih, ki niso povezana z imunskim sistemom, pod vplivom interferona- γ (IFN- γ) in dejavnika tumorske nekroze α (TNF- α) (9, 10). Izražanje iCP stimulirata oksidativni stres in prisotnost provnetnih citokinov. Njegova naloga je tvorba peptidov s hidrofobnim C-koncem, ki se pripnejo na molekule MHC razreda I in jih antigen-predstavitvene celice predstavljajo citotoksičnim celicam T, ki sprožijo imunski odziv. Izražanje imunoproteasoma je povečano pri avtoimunskih in nevrodegenerativnih boleznih, saj je pri teh boleznih povečana tudi vsebnost provnetnih citokinov. Z zaviranjem imunoproteasoma znižamo vsebnost citokinov, protiteles, zmanjšamo odziv citotoksičnih celic T in preprečimo napredovanje bolezni, kot so revmatoidni artritis, kolitis in lupus (11). Regulatorni del iCP se razlikuje od cCP, saj se 19S nadomesti z 11S oz. PA28, ki je sestavljen iz podenot α in β . Imunoproteasom se razlikuje od konstitutivnega proteasoma

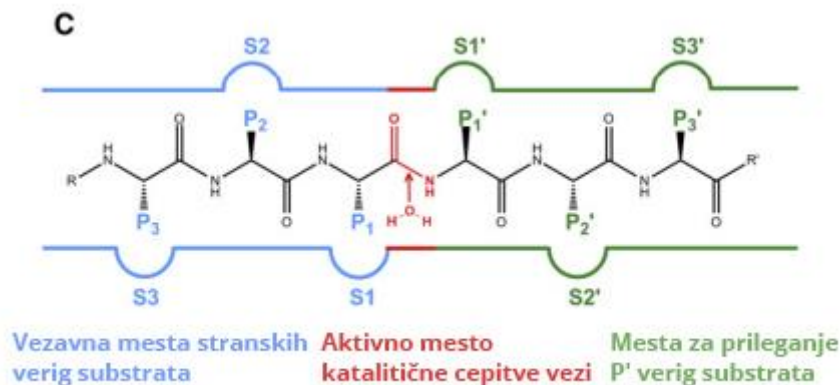
26S po zamenjavi katalitskih podenot, in sicer ima namesto podenot $\beta 1$, $\beta 2$ in $\beta 5$ izražene podenote LMP-2 (namesto $\beta 1$), LMP-7 ($\beta 5$) in MECL-1 ($\beta 2$) (slika 5).



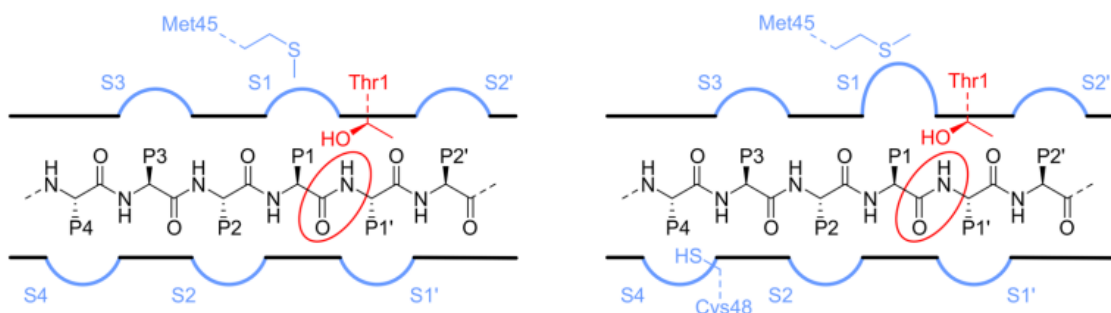
Slika 5: Primerjava struktur cCP in iCP (prirejeno po 11)

MECL-1 ima enako aktivnost kot podenota $\beta 2$, torej tripsinu podobno proteolitično aktivnost, podenota LMP-7 ima kimotripsinu podobno proteolitično aktivnost, ki se tudi ne razlikuje od konstitutivne podenote $\beta 5$. V proteolitični aktivnosti se poglavitno razlikujeta podenoti $\beta 1$ in LMP-2, in sicer ima podenota $\beta 1$ kaspazi podobno proteolitično aktivnost, podenota LMP-2 pa kimotripsinu podobno aktivnost in posledično cepi vez za hidrofobnimi aminokislinskimi ostanki, kar je ključno za vezavo razgrajenih peptidov na MHC-I. Terciarnе strukture podenot β se med iCP in cCP ne razlikujejo, razlikujejo pa se aminokislinska zaporedja. Do bistvenih razlik, pomembnih za načrtovanje sinteze selektivnih zaviralcev iCP, pride v strukturi vezavnih žepkov na aktivnem mestu katalitičnih podenot (slika 6). Katalitična podenota LMP-2 je za eno aminokislino krajša od podenote $\beta 1$, poleg tega je spremenjen tudi vezavni žepok S1, in sicer je v primerjavi z žepkom S1 cCP bolj hidrofoben ter manjši. Posledično bo vezavni žepok podenote S1 LMP-2 raje vezal majhne, hidrofobne peptide z nepolarnim C-koncem. Podenota LMP-7 se v vezavnem mestu S4 razlikuje zaradi zamenjave alanina s cisteinom. Posledično se vezavno mesto zmanjša in dobi bolj hidrofilen značaj. Cistein v vezavnem mestu S4 iCP je izrazito nukleofil in lahko

napade stransko verigo substrata. Vezavno mesto S1 v podenoti LMP-7 je v primerjavi s podenoto cCP bistveno večje, saj je bolj stabilizirano z van der Waalsovimi interakcijami zaradi drugačne orientacije aminokisline metionin (slika 7). Strukturne razlike med vezavnimi mesti katalitičnih podenot so ključne za sintezo in načrtovanje selektivnih zaviralcev imunoproteasoma (11, 12).



Slika 6: Vezavna mesta v aktivnem mestu katalitičnih podenot proteasoma (prirejeno po 9)



Slika 7: Vezavna mesta za substrat v podenoti $\beta 5$ v konstitutivnem proteasomu (levo) in v podenoti LMP-7 imunoproteasoma (desno) (prirejeno po 18)

1.5 Bolezenska stanja, povezana z (imuno)proteasomom

Nepravilnosti v delovanju proteasoma in imunoproteasoma se kažejo v številnih bolezenskih stanjih, kot so rakava obolenja, odpoved ledvic, nevrodegenerativne bolezni, avtoimunske bolezni, kardiomiopatije, Crohnova bolezen in degeneracija rumene pege. Konstitutivni proteasom in imunoproteasom imata pomembno vlogo pri uravnavanju celičnega cikla, homeostazi proteinov in imunskem odzivu, zato predstavljata potencialni tarči zdravilnih učinkovin. Konstitutivni proteasom je tarča zdravilnih učinkovin predvsem pri nekaterih vrstah raka, medtem ko je imunoproteasom potencialna tarča zdravilnih učinkovin za

zdravljenje bolezni povezanih z imunologijo. Težavi širokospektralnih zaviralcev proteasoma sta nespecifičnost in posledično veliko neželenih učinkov, zato je cilj iskanje selektivnih zaviralcev imunoproteasoma. Ti reagirajo le s katalitičnimi podenotami, specifičnimi za imunoproteasom. Bolezni na katere vpliva delovanje imunoproteasoma so vnetne črevesne bolezni, nevrodegenerativne bolezni, avtoimunske bolezni, revmatoidni artritis in rakava obolenja (8, 13).

1.6 (Imuno)proteasom kot tarča zdravilnih učinkovin – zaviralci proteasoma

Konstitutivni proteasom vpliva na številne celične funkcije, zato na začetku ni predstavljal pomembne tarče za iskanje novih zdravilnih učinkovin, saj lahko njegovo zaviranje vodi v prekinitev celičnega cikla in porušenje proteinskega ravnotežja v telesu. Zaviranje proteasoma vodi v nalaganje nepravilno zviti proteinov in sintezo reaktivnih kisikovih zvrsti, ki organizmu povzročijo dodaten stres. Povečana koncentracija konstitutivnega proteasoma je tudi eden izmed glavnih markerjev prisotnosti tumorskih celic. Začetne študije zaviralcev proteasoma so dokazale njihovo protirakavo delovanje, saj preprečijo razgradnjo tumor supresorskih proteinov, zmanjšajo in preprečijo aktivacijo signalne poti preko jedrnega transkripcijskega dejavnika NF- κ B in tako zmanjšajo vnetni odziv. Posledično zaviralci proteasoma povzročijo nalaganje in visoko koncentracijo apoptozo stimulirajočih dejavnikov zlasti v rakavih celicah, kar vodi v smrt tumorskih celic, zdrave celice pa ta stres prenašajo lažje in niso podvržene apoptozi (9, 14, 15).

Povečana koncentracija imunoproteasoma je povezana z motnjami delovanja centralnega živčnega sistema, z avtoimunskimi boleznimi in tudi nekaterimi oblikami raka. Selektivni zaviralci imunoproteasoma naj bi imeli manj neželenih učinkov, saj zavirajo le točno določene podenote iCP. Manjša toksičnost zaviralcev imunoproteasoma je posledica zaviranja le specifičnih celic, ki izkazujejo višje ravni imunoproteasoma, te pa se nahajajo v tkivih, kjer pride do zorenja limfocitov. Ostale celice v telesu s selektivnim zaviranjem imunoproteasoma ne bi bile prizadete (9, 14, 15).

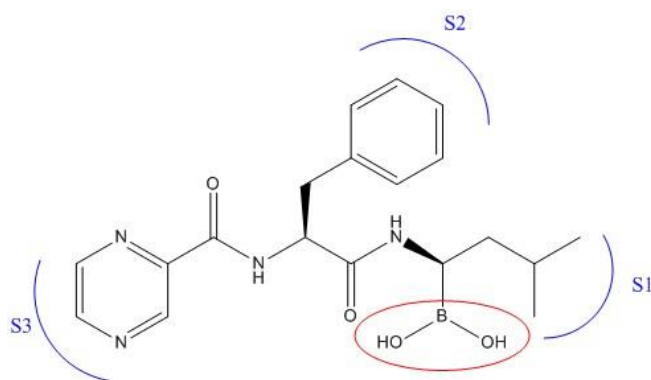
Mehanizem delovanja selektivnih in neselektivnih zaviralcev proteasoma je enak, selektivnost na podenote iCP dosežemo s spremenjenimi strukturnimi fragmenti v molekulah zaviralcev za boljše prileganje v katalitične podenote imunoproteasoma. Obe različici proteasoma delujeta kot endopeptidazi. Njun *N*-končni treonin nukleofilno napade elektrofilni ogljikov atom peptidne vezi, kar privede do tvorbe acil-encimskega intermedata

in razgrajenega peptida z novim *N*-koncem. Vezava vode v vlogi nukleofila povzroči hidrolizo nastalega acil-encimskega intermediata in odcep razgrajenega peptida na *C*-koncu, tako se sprostí aktivno mesto v proteasomu. Zaviralci morajo imeti elektrofilno »bojno glavo«, ki se reverzibilno ali ireverzibilno kovalentno veže na nukleofilno –OH skupino stranske verige treonina v aktivnem mestu proteasoma. Kovalentne zaviralce na grobo razvrščamo v sedem skupin: vinilsulfoni, boronati, aldehidi, vinilamidi, epoksiketoni, ketoaldehidi in β -laktoni. Na trgu so s strani FDA odobreni le trije neselektivni zaviralci proteasoma (9).

1.6.1 Neselektivni zaviralci proteasoma

BORTEZOMIB

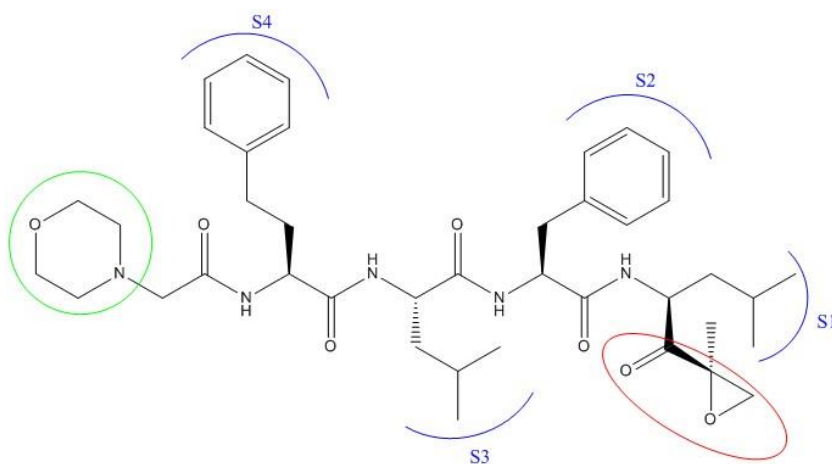
Bortezomib je prvi neselektivni zaviralec proteasoma, odobren s strani FDA, in je na trgu od leta 2003 za zdravljenje MM. Bortezomib je reverzibilni dipeptidni derivat boronata, ki zavira delovanje proteasoma zaradi zaviranja kimotripsinske katalitične podenote $\beta 5$. Elektrofilna bojna glava boronata se veže s treoninom v aktivnem mestu katalitičnih podenot in tvori reverzibilen tetraedričen intermediat (slika 8). Bortezomib moramo aplicirati intravensko, poleg tega ima resne neželene učinke, kot so periferna nevropatija, trombocitopenija in motnje gastrointestinalnega trakta. Poleg imunoproteasoma zavira tudi delovanje serinskih proteaz, izraženih v nevronih, ravno posledica tega je pojav periferne nevropatije (9, 16, 17).



Slika 8: Struktura bortezomiba (rdeče obarvana elektrofilna bojna glava, modro pa vezavna mesta)

KARFILZOMIB

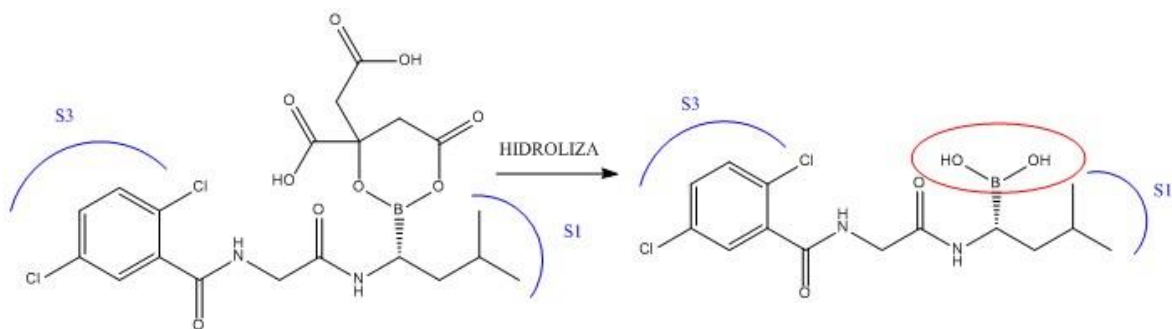
Karfilzomib predstavlja drugo generacijo zaviralcev imunoproteasoma. Strukturno je derivat naravnega produkta epoksimicina, tetrapeptida, ki spada v epoksiketonsko skupino zaviralcev proteasoma. Neselektivno zavira podenoto $\beta 5$ proteasoma, vendar je bolj selektiven kot njegov predhodnik bortezomib. S tvorbo morfolinskega obroča se kovalentno veže na treonin v aktivnem mestu (slika 9). Na trgu je od leta 2012 z indikacijo za zdravljenje MM. Karfilzomib je uspešen tudi pri terapiji proti bortezomibu odpornih MM celičnih linij. Prav tako kot bortezomib ga moramo aplicirati intravensko in ima razpolovno dobo le 30 minut. V klinične študije je vstopil tudi analog karfilzomiba, ki bi ga lahko aplicirali peroralno. Velika prednost karfilzomiba je, da ne povzroči periferne nevrotoksičnosti (9, 16, 17).



Slika 9: Struktura karfilzomiba (z zeleno označen morfolinski obroč, ki izboljša topnost, z modro vezavna mesta, z rdečo pa elektrofilna bojna glava)

IKSAZOMIB

Iksazomib je tretji zaviralec proteasoma, odobren s strani FDA leta 2015. Spada v drugo generacijo peptidov, ki so derivati boronske kisline. Poleg tega je prvi zaviralec proteasoma, ki ga apliciramo peroralno, in sicer v obliki predzdravila, ki v telesu hitro hidrolizira do biološko aktivnega boronata (slika 10). Iksazomib neselektivno zavira podenoti $\beta 1$ in $\beta 5$ (9, 16, 17).

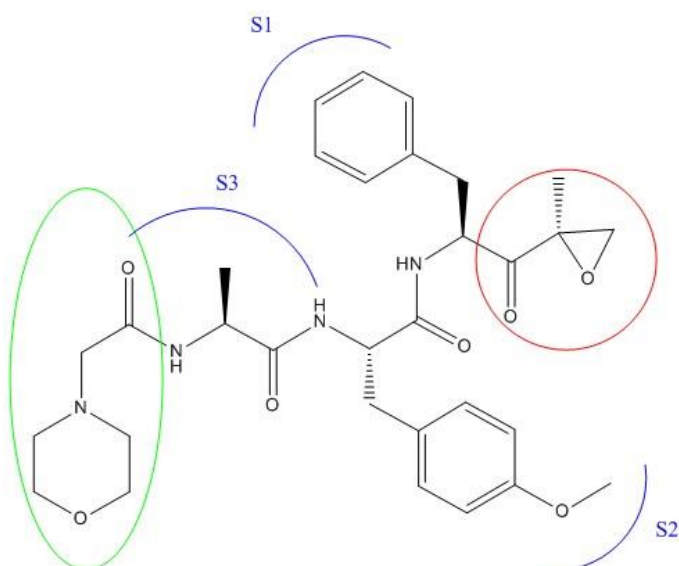


Slika 10: Struktura iksazomiba (desno) in njegovega predzdravila (levo)

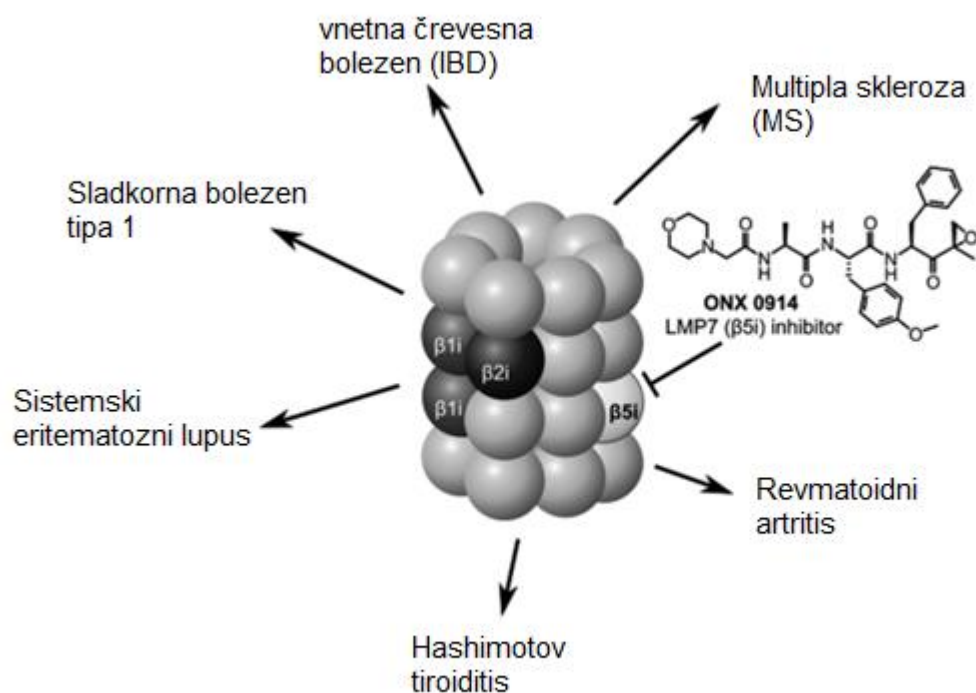
1.6.2 Selektivni zaviralci proteasoma

ONX 0914 (PR-957)

ONX 0914 je prvi selektivni zaviralec imunoproteasoma, ki zavira njegovo katalitično podenoto LMP-7. Spada v skupino epoksiketonov in se ireverzibilno veže na katalitsko mesto LMP-7 v imunoproteasomu (slika 11). Deluje tako, da zavre sintezo provnetnih citokinov in zmanjša vnetje, erozijo kosti, sintezo protiteles, odziv T-celic pomagalk in citotoksičnih celic. Prepreči poslabšanje revmatoidnega artritisa, kronične vnetne bolezni, multiple skleroze, sistemskega eritematoznega lupusa in Hashimotove bolezni (slika 12). Velika prednost kovalentnega zaviralca ONX 0914 je, da učinkuje že v koncentraciji, desetkrat nižji od tiste, ki jo dosežemo z maksimalnim dovoljenim odmerkom. Razlog boljše farmakološke lastnosti tega zaviralca je prosta *N*-končna morfolinil acetilna skupina učinkovine. Ta ne pride v stik s podenoto LMP-7, ima pa veliko vlogo v povečanju topnosti in posledično boljši biološki aktivnosti. Podenota LMP-7 ima v primerjavi s podenoto $\beta 5$ cCP večje vezavno mesto S1, zato se benzenov obroč selektivno veže v S1 vezavno mesto podenote LMP-7. Trenutno je v predkliničnih fazah razsikav (9, 13, 16).



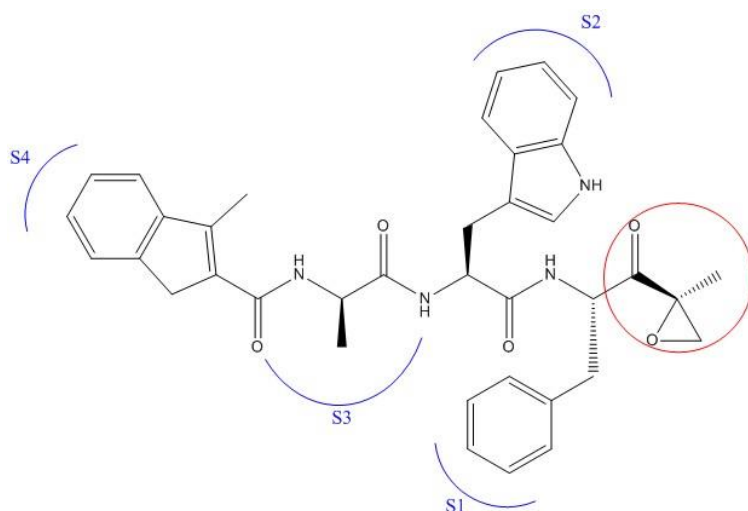
Slika 11: Strukturna formula ONX 0914 (z zeleno je označena N-morfolinil acetilna skupina, z rdečo epoksiketonska elektrofilna bojna glava, z modro so označena vezavna mesta iCP)



Slika 12: Terapevtske indikacije zdravljenja z ONX 0914 (prirejeno po 9)

PR-924

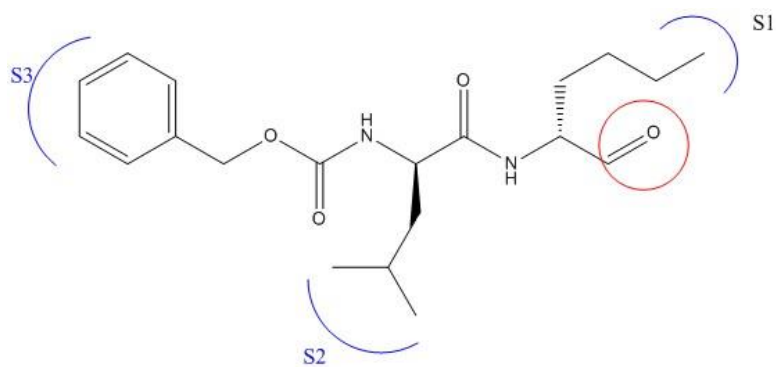
PR-924 je selektivni zaviralec podenote imunoproteasoma LMP-7, ki se kovalentno veže na *N*-končni treonin na aktivnem mestu. Kemijsko je tripeptid in spada v skupino epoksiketonskih zaviralcev (slika 13). PR-924 ima protirakavo delovanje, saj zavira rast in sproži apoptozo celičnih linij multiplega mieloma, ne vpliva pa na zdrave krvotvorne celice. Z zaviranjem podenote LMP-7 se zmanjša sinteza citokinov in posledično ne pride do kroničnih vnetnih obolenj. Poleg tega inducira apoptozo celičnih linij multiplega mieloma z aktivacijo kaspaze-3, kaspaze-8 in kaspaze-9. Trenutno kaže PR-924 obetavne rezultate na predkliničnih študijah, avgusta 2016 pa je vstopil tudi v prvo fazo kliničnih testiranj (9, 17, 18).



Slika 13: Strukturna formula PR-924 (z rdečo je označena elektrofilna bojna glava, z modro pa vezavna mesta)

IPSI-001

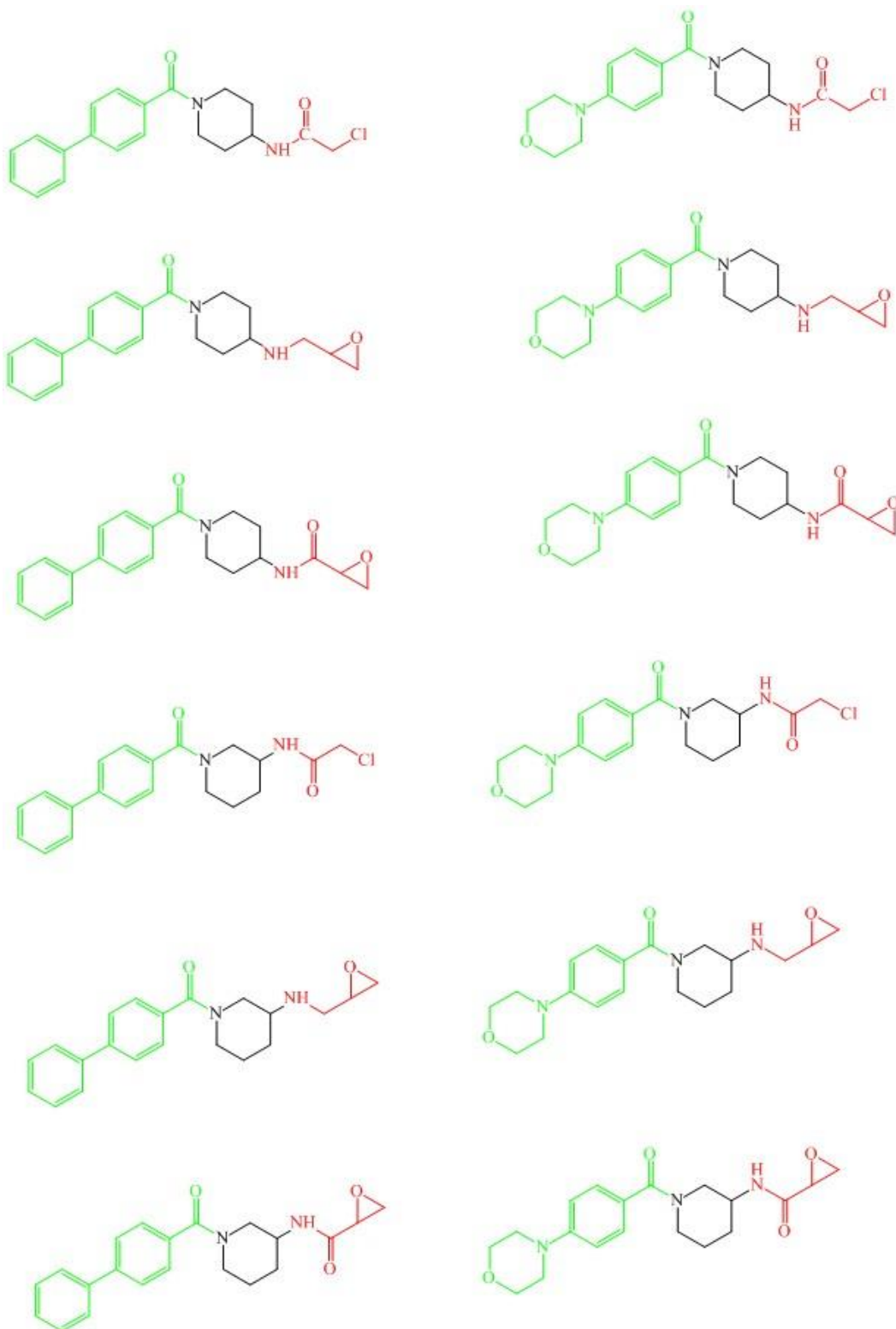
IPSI-001 je dipeptidni aldehyd s pripeto hidrofobno glavo na C-koncu, ki v primerjavi s podenoto $\beta 1$ konstitutivnega proteasoma stokrat poveča selektivnost za podenoto LMP-2. Treonin v aktivnem mestu podenote LMP-2 napade karbonilni ogljik učinkovine (slika 14). IPSI-001 inducira apoptozo celičnih linij multiplega mieloma, tudi tistih, ki so odporne proti zdravljenju z bortezomibom. Potencialno bi ga lahko uporabljali za zdravljenje bolnikov z multiplim mielomom. Poleg tega je manj citotoksičen za zdrave celice in ima posledično manj neželenih učinkov (9, 18).



Slika 14: Struktura IPSI-001 (z rdečo je obkrožena elektrofilna bojna glava, z modro pa so označena vezavna mesta)

2 NAMEN DELA

V okviru magistrske naloge se bomo osredotočili na sintezo kovalentnih zaviralcev katalitične podenote $\beta 5i$ imunoproteasoma. Pri tem bomo izhajali iz do sedaj že pripravljenih in v nekaterih primerih tudi objavljenih spojin Univerze v Ljubljani, Fakultete za farmacijo, Katedre za farmacevtsko kemijo. Načrtovali bomo spojine, ki naj bi se sprva nekovalentno vezale na podenoto $\beta 5i$ in s tem približale elektrofilno »bojno glavo« treoninskemu ostanku v katalitičnem delu imunoproteasoma. Elektrofilna »bojna glava« naj bi potem tvorila kovalentno vez z nukleofilno hidroksilno skupino treonina in zavirala njegovo delovanje. Kot elektrofilne »bojne glave« smo izbrali kloroacetamidno, epoksiketonsko in metiloksiransko elektrofilno skupino. Vsem načrtovanim končnim spojinam je skupen 3- oz. 4-substituiran aminopiperidinski skelet, na katerega bomo vezali različne stranske skupine in elektrofilne centre. Izhodne spojine imajo aminopiperidinski obroč zaščiten s terc-butiloksikarbonilno (Boc) skupino z namenom selektivnega uvajanja stranskega, večjega lipofilnega fragmenta preko tvorbe amida na prosti aaminski skupini. V prvem koraku bomo s pomočjo kislinskih kloridov na zaščitene aminopiperidine pripeli bifenilno skupino. Nato bomo tako substituiranim spojinam z acidolizo odstranili Boc-zaščitno skupino. V zadnji stopnji sinteze pa bomo tako pripravljenim spojinam pripeli elektrofilno »bojno glavo«. Drugi skupini načrtovanih spojin bomo namesto bifenilne stranske skupine pripeli morfolinbenzoilno stransko skupino, prav tako s tvorbo amidne vezi. Načrtujemo 12 končnih spojin, ki so narisane na sliki 15. Potencialne kovalentne zaviralce imunoproteasoma bodo nato biokemijsko ovrednotili na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo z določanjem njihove zaviralne aktivnosti na podenoto LMP-7.



Slika 15: Strukturne formule načrtovanih končnih spojin (s črno je obarvan skupni aminopiperidinski skelet, z zeleno stranske verige, z rdečo elektrofilne »bojne glave«)

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

Topila in reagenti

Pri laboratorijskem delu magistrske naloge smo uporabljali topila in reagente različnih proizvajalcev: Merck, Fluka, Sigma-Aldrich in Acros Organics. Pri pripravi raztopin in za izolacije smo uporabili prečiščeno vodo.

Aparature in laboratorijska oprema

Pri eksperimentalnem delu v laboratoriju smo uporabljali standardno laboratorijsko opremo:

- Analitsko tehtnico: Mettler Toledo AG245, Švica
- Precizno tehtnico: Kern EG220-3NM
- Rotavaporje: Buchi R-205, heating bath B-490, črpalka VAC V-500, Švica
Buchi R-114, waterbath B-480, črpalka Vario PC 3001, Švica
Buchi R-114, waterbath B-480, črpalka Buchi Vacuum controller 8-721, Švica
- UV-svetilko: Camag, Švica
- Magnetno mešalo: IKA[®] RTC basic, Nemčija

Računalniška programska oprema

Sintezne protokole in znanstvene članke smo iskali v podatkovnih zbirkah SciFinder, Google Scholar in Science Direct. Kemijske strukture in reakcijske sheme smo narisali s pomočjo računalniškega programa ChemDraw Professional 16.0[®], podjetja PerkinElmer. Prav tako smo s tem programom izračunali molekulske mase spojin in jih poimenovali. Posnete ¹H NMR in ¹³C NMR spektre smo obdelali z računalniškim programom MestRe-C[®] 4.8.6.0, podjetja Mestrelab Research Sl.

3.2 Analizne metode

3.2.1 Kromatografske metode

Tankoplastna kromatografija (TLC)

Metodo tankoplastne kromatografije smo uporabili za spremljanje poteka reakcij in za istovetenje spojin. Poleg tega smo s pomočjo TLC izbrali primerno mobilno fazo za čiščenje

spojin s kolonsko kromatografijo, uporabili pa smo jo tudi za ugotavljanje prisotnosti nečistot v spojini. Za stacionarno fazo smo uporabili kromatografske ploščice TLC Silica gel 60 F₂₅₄ proizvajalca Merck. Mobilne faze so se razlikovale pri posameznih sintezah in so navedene pri specifičnih molekulah. Spojine smo detektirali s pomočjo UV-svetilke pri valovni dolžini 254 nm, poleg tega smo pri nekaterih spojinah uporabili tudi način detekcije z orositvenim reagentom ninhidrin.

Kolonska kromatografija

Metodo kolonske kromatografije smo uporabili za čiščenje produktov kemijskih reakcij. Glede na maso vzorca smo uporabili steklene kolone različnih velikosti in debelin. Stacionarna faza je bila v vseh primerih enaka, in sicer smo uporabili silikagel 60 z velikostjo delcev od 0,04 do 0,063 mm, proizvajalca Merck. Mobilne faze so se razlikovale in so navedene posamezno pri vsakem sinteznem postopku.

3.2.2 Spektroskopske metode

Jedrska magnetna resonanca (NMR)

¹H NMR spektre in ¹³C NMR spektre smo posneli s spektrometrom Bruker Avance III 400 MHz na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo. Kot topilo smo v večini primerov uporabili devteriran dimetilsulfoksid (DMSO-d₆), drugače pa devteriran kloroform (CDCl₃). Interni standard, ki je dodan topilu, je tetrametilsilan (TMS), njegov signal v spektru definira kemijski premik nič. Kemijske premike (δ) smo podali v delih na milijon delov (ppm), sklopitvene konstante (J) pa v Hz. Za procesiranje posnetih spektrov smo uporabili program MestRe-C®.

Masna spektrometrija (MS)

Masne spektre smo posneli s tehniko ionizacije z razprševanjem elektronov (ESI oz. electrospray ionisation). Uporabili smo spektrometer Advion expression L na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo.

Infrardeča spektroskopija (IR)

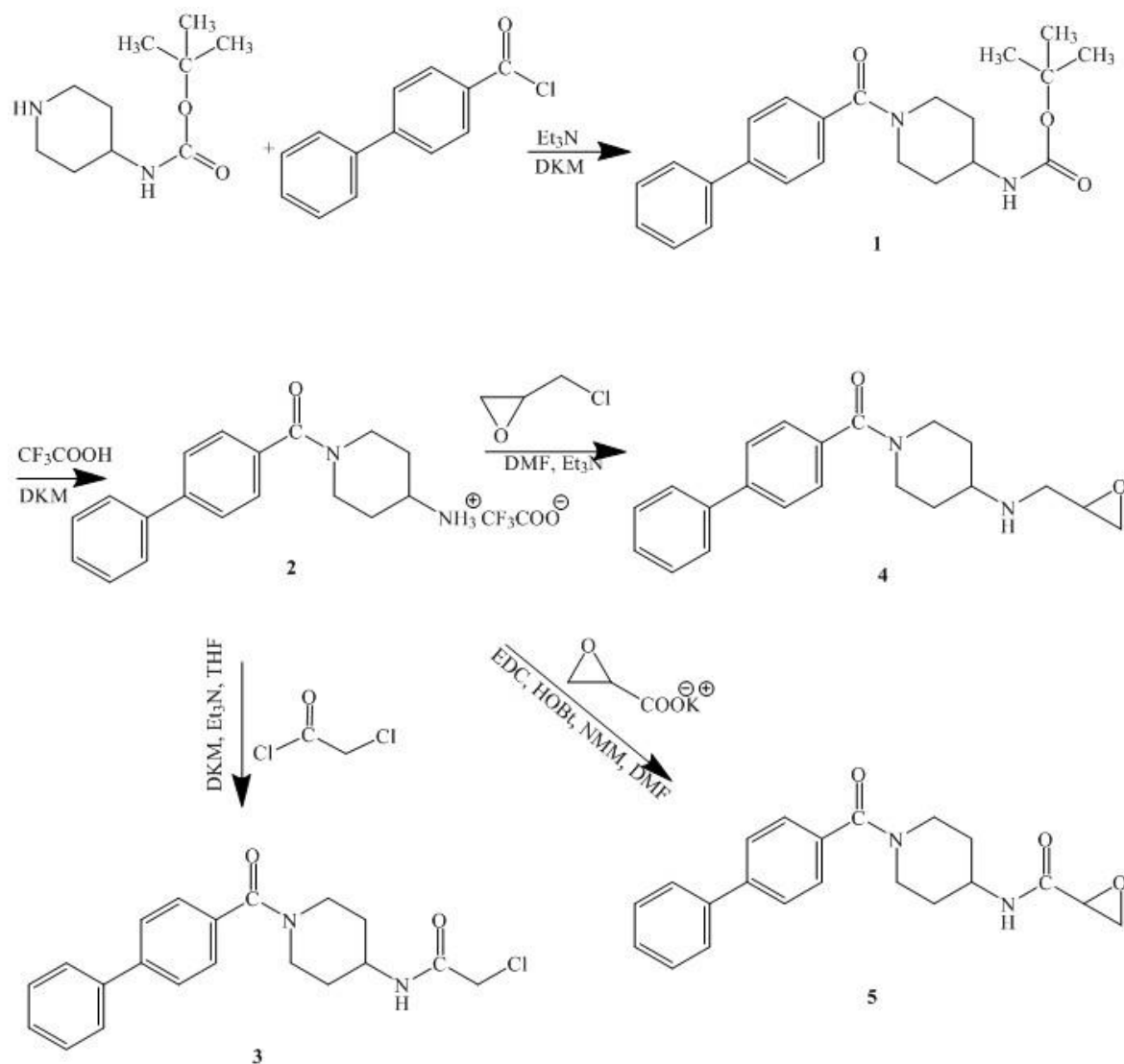
IR-spektre sintetiziranih spojin smo posneli na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo na spektrofotometru PerkinElmer Spectrum BX System FT-IR. Pri snemanju smo uporabili tehniko snemanja oslabiljene popolne odbojnosti (ATR).

3.2.3 Določanje temperature tališč

Temperaturne intervale tališč smo spojinam določali na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo. Uporabili smo Kofflerjev talilni mikroskop z ogrevalno mizo Leica. Vrednosti niso korigirane.

4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 Sinteza bifenil-4-acetamidnih derivatov



Slika 16: Reakcijska shema sinteze *N*-(1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-4-il)-2-kloroacetamida (**3**), [1,1'-bifenil]-4-il-4-((oksiran-2-ilmetil)amino)piperidin-1-il)metanona (**4**) in *N*-(1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-4-il)oksiran-2-karboksamida (**5**)

4.1.1 Sinteza *tert*-butil (1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-4-il)karbamata (**1**)

V 100-mililitrsko suho bučko smo zatehtali 1,974 g (9,87 mmol, 1,0 ekviv.) boc-zaščitenega 4-aminopiperidina in ga med mešanjem na ledeni kopeli raztopili v 50 mL diklorometana (DKM) ter dodali 3 mL (21,5 mmol, 2 ekviv.) trietilamina (Et₃N). Bučko smo med

raztapljanjem prepihovali z argonom. Ko se je celotna količina boc-zaščenega 4-aminopiperidina raztopila, smo dobili rahlo motno raztopino. Nato smo v bučko dodali 2,352 g (10,9 mmol, 1,1 ekviv.) [1,1'-bifenil]-4-karbonil klorida. Takoj po dodatku je v bučki nastala bistra raztopina blago rumene barve. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 24 ur na sobni temperaturi, pod argonovo atmosfero. Nato smo reakcijsko zmes prenesli v lij ločnik in dodali še 20 mL DKM. Reakcijsko zmes smo spirali s citronsko kislino (10-odstotna raztopina citronske kisline v vodi, 2×30 mL), z nasičeno raztopino NaHCO_3 (1×20 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1×20 mL). Po spiranju z nasičeno raztopino NaHCO_3 je v liju ločniku nastala bela oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem. Organsko fazo smo sušili z Na_2SO_4 , uparili topilo pod znižanim tlakom in dobili 2,91 g trdne zmesi bele barve. Surovi produkt smo prekrizalizirali iz etilacetata, nastalo oborino odfiltrirali s presesavanjem, matičnico pa dodatno očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc). Ugotovili smo, da sta oborina, dobljena s prekrizalizacijo, in produkt, dobljen iz matičnice ista spojina, zato smo ju združili.

Lastnosti spojine **1**:

Molekulska formula: $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_3$

Molekulska masa: 380,49

Izgled: bel prašek

Tališče: 137–141 °C

R_f: 0,4 (MF = EtOAc)

Izkoristek: 2,33 g, $\eta = 62\%$

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.34 (m, 2H, CH_2), 1.39 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.77 (s, 2H, CH_2), 2.95 (m, 1H, CH_2), 3.12 (m, 1H, CH_2), 3.61 (m, 2H, CH_2), 4.33 (m, 1H, CH), 6,91 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, NH), 7.40-7.51 (m, 5H, Ar-H), 7.72 (m, 4H, Ar-H)

^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 28.22 ($3 \times \text{C-CH}_3$), 31.45 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{CHNH}$), 32.29 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{CHNH}$), 39.89 ($2 \times \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{NCO}$), 46.01 (CHNH), 77.62 ($(\text{CH}_3)_3\text{CO}$), 126.67 ($2 \times \text{CH-Ar}$), 126.76 ($2 \times \text{CH-Ar}$), 127.39 ($2 \times \text{CH-Ar}$), 127.85 (CH-Ar), 129.01 (CH-Ar), 135.05 (C-Ar), 139.31 (C-Ar), 141.102 (C-Ar), 154.78 (NHCOO), 168.66 (CCON)

MS (ESI⁺): $m/z = 403,5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $m/z = 381,5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, izračunan $m/z = 380,21$

IR (ATR): ν [cm^{-1}] = 509, 539, 564, 593, 633, 694, 723, 741, 778, 847, 871, 918, 973, 1007, 1053, 1107, 1167, 1249, 1314, 1344, 1364, 1391, 1444, 1519, 1554, 1582, 1600, 1670, 1700, 2934, 2979, 3323

4.1.2 Sinteza [1,1'-bifenil]-4-il(4-aminopiperidin-1-il)metanona (**2**)

V 50-mililitrsko bučko smo zatehtali spojino **1** (2,225 g, 5,85 mmol, 1 ekviv.) in jo raztopili v 20 mL DKM. Nato smo postopoma dodali skupno 7 mL (91,48 mmol) trifluoroocetne kisline (TFA). V prvem koraku smo dodali 3 mL TFA, ker pa reakcija po dveh urah še ni potekla, smo dodali še 4 mL TFA in s tankoplastno kromatografijo (TLC) spremljali, kdaj je reakcija potekla. Reakcijsko zmes smo skupaj mešali 3 ure na sobni temperaturi, pod argonovo atmosfero. Ko je reakcija potekla, smo uparili topilo in TFA pod znižanim tlakom, preostanek raztopili v 30 mL DKM ter spirali v liju ločniku z 1M NaOH, da smo produkt pretvorili v prosto bazo. Znova smo uparili topilo pod znižanim tlakom in dodali 10 mL dietiletra (Et₂O). Vsebino bučke smo mešali na magnetnem mešalu 30 minut, nato pa za 24 ur postavili v hladilnik na 4 °C. Nastalo oborino smo odfiltrirali s presesavanjem in sušili pod znižanim tlakom.

Lastnosti spojine **2**:

Molekulska formula: C₁₈H₂₀N₂O

Molekulska masa: 281,16

Izgled: bela amorfna snov

Tališče: 185–187 °C

R_f: 0 (MF = DKM)

Izkoristek: 1,776 g, η = 77 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.47 (m, 2H, CH₂), 1.95 (m, 2H, CH₂), 2.88 – 2.92 (m, 1H, CH₂), 3.17 (m, 1H, CH₂), 3.71 (m, 1H, CH₂), 3.72 (m, 1H, CH₂), 4.47-4.50 (m, 1H, CH), 7.41-7.52 (m, 5H, Ar-H), 7.70-7.77 (m, 4H, Ar-H), 8.00 (s, 3H, NH₃⁺)

MS (ESI⁺): m/z = 281,3 [M+H]⁺, izračunan m/z = 280,16

IR (ATR): ν [cm⁻¹] = 518, 559, 584, 694, 721, 749, 779, 800, 834, 849, 933, 994, 1031, 1063, 1126, 1180, 1201, 1229, 1291, 1331, 1368, 1390, 1454, 1495, 1544, 1644, 2959, 3064, 3298

4.1.3 Sinteza N-(1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-4-il)-2-kloroacetamida (**3**)

V 25-mililitrsko suho bučko smo zatehtali 200,01 mg (0,71 mmol, 1 ekviv.) spojine **2** in ji dodali 5 mL tetrahidrofurana (THF). Reakcijsko zmes smo pod argonovo atmosfero mešali

na ledeni kopeli (0 °C). Zaradi slabe topnosti spojine **2** v tetrahidrofuranu smo v bučko dodali še 1 mL (7,17 mmol, 10 ekviv.) Et₃N in 10 mL DKM. Z injekcijsko brizgo smo zelo počasi, po kapljicah v bučko dodali 0,068 mL (0,86 mmol, 1,2 ekviv.) 2-kloroacetil klorida, ki smo ga predhodno raztopili v minimalni količini diklorometana. Po dodatku reagenta se je reakcijska zmes obarvala vijolično. Reakcija je potekala 24 ur na sobni temperaturi, pod argonovo atmosfero. Na dnu bučke je nastala zelo fina oborina, ki smo jo odfiltrirali s steklenim filtrom s presesavanjem. Matičnico smo prelili v lij ločnik in jo očistili z ekstrakcijo. Spirali smo s citronsko kislino (10-odstotna raztopina citronske kisline v vodi, 2 × 20 mL), NaHCO₃ (nasičena raztopina, 1 × 20 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (1 × 20 mL). Organsko fazo smo sušili z Na₂SO₄ in uparili topilo pri znižanem tlaku. Zaostanku organske faze smo dodali 3 mL EtOAc in pustili v hladilniku za 48 ur. V bučki je izpadla bela oborina (spojina **3**), ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem.

Lastnosti spojine **3**:

Molekulska formula: C₂₀H₂₁ClN₂O₂

Molekulska masa: 356,85

Izgled: belo-siv sipek prah

Tališče: 124–127 °C

Rf: 0,5 (MF = EtOAc)

Izkoristek: 49,0 mg, η = 19 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.38 (s, 2H, CH₂), 1.80 (s, 2H, CH₂), 3.00-3.17 (m, 2H, CH₂), 3.62 (s, 1H, CH), 3.86 (d, J = 7.60 Hz, 1H, CH₂), 4.03 (s, 2H, CH₂), 4.35 (m, 1H, CH₂), 7.38-7.42 (m, 1H, Ar-H), 7.46-7.51 (m, 4H, Ar-H), 7.73 (m, 4H, Ar-H), 8.24 (d, J = 7.60 Hz, 1H, NH)

¹³C NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 30.85 (CH₂), 31.59 (CH₂), 39.47 (CH₂), 42.68 (CH₂), 45.81 (OCC₂H₄Cl), 46.23 (NHCHCH₂CH₂), 126.69 (2 × CH-Ar), 126.77 (2 × CH-Ar), 127.41 (2 × CH-Ar), 127.87 (2 × CH-Ar), 129.02 (CH-Ar), 135.03 (OCC-Ar), 139.30 (C-Ar), 141.14 (C-Ar), 165.14 (HNC(=O)CH₂), 168.78 (NC(=O)C)

MS (ESI⁺): m/z = 379,7 [M+Na]⁺, m/z = 357,6 [M+H]⁺, izračunan m/z = 356.13

IR (ATR): ν [cm⁻¹] = 522, 559, 609, 633, 692, 746, 779, 852, 893, 942, 985, 1006, 1101, 1156, 1230, 1275, 1298, 1336, 1365, 1441, 1547, 1611, 1656, 2936, 3273

4.1.4 Sinteza [1,1'-bifenil]-4-il(4-((oksiran-2-ilmetil)amino)piperidin-1-il)metanona (**4**)

Spojino **2** (207,0 mg, 0,738 mmol, 1 ekviv.) smo zatehtali v 25-mililitrsko suho bučko in jo raztopili v 2 mL dimetilformamida (DMF). Dodali smo še 0,5 mL (3,59 mmol, 5 ekviv.) Et₃N in 100,0 µL (1,28 mmol, 1,7 ekviv.) epiklorhidrina. Epiklorhidrin smo v reakcijsko zmes dodali zelo počasi, po kapljicah. Reakcijo smo pustili mešati na oljni kopeli pri 40 °C, pod argonovo atmosfero. Nato smo uparili topili pri znižanem tlaku in dobili 0,274 g olja rumene barve. Rumeno olje smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = DKM : Et₃N = 100 : 1) in dobili spojino **4**.

Lastnosti spojine **4**:

Molekulska formula: C₂₁H₂₄N₂O₂

Molekulska masa: 336,44

Izgled: rumena oljasta snov

Rf: 0,4 (MF = DKM : Et₃N = 100 : 1)

Izkoristek: 60,0 mg, η = 24 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.25 (m, 2H, CH₂), 1.79-1.89 (m, 2H, CH₂), 2.60-2.70 (m, 4H, CHCH₂O, HNCH₂CH), 2.98-3.12 (m, 2H, (CH₂)₂CHO, (CH₂)₂CHNH), 3.53-3.72 (m, 4H, CH₂CH₂N), 4.28 (br, 1H, NH), 7.38-7.51 (m, 5H, Ar-H), 7.70-7.77 (m, 4H, Ar-H)

¹³C NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 45.98 (2 × CH₂), 47.31 (2 × CH₂CH₂N), 49.06 (2 × CH₂), 54.91 (OCHCH₂), 69.82 ((CH₂)₂CHNH), 127.17 (CH-Ar), 127.22 (2 × CH-Ar), 127.45 (2 × CH-Ar), 127.80 (2 × CH-Ar), 128.91 (2 × CH-Ar), 134.80 (OCC-Ar), 140.27 (C-Ar), 142.58 (C-Ar), 170.26 (NCOC)

MS (ESI+): m/z = 337.6 [M+H]⁺, izračunan m/z = 336,18

IR (ATR): ν [cm⁻¹] = 531, 575, 642, 697, 748, 778, 828, 892, 925, 986, 1068, 1097, 1114, 1198, 1231, 1275, 1327, 1369, 1434, 1539, 1608, 1676, 2852, 2941, 3294

4.1.5 Sinteza N-(1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-4-il)oksiran-2-karboksamida (5)

V 25-mililitrsko suho bučko smo zatehtali 0,135 g (1,07 mmol, 1 ekviv.) kalijevega oksiran-2-karboksilata, 0,205 g (1,07 mmol, 1 ekviv.) EDC in 0,164 g (1,07 mmol, 1 ekviv.) HOBt. Nato smo dodali 5 mL DMF in 0,24 mL (2,18 mmol, 2 ekviv.) *N*-metilmorfolina (NMM). Vse skupaj smo mešali na ledeni kopeli, pod argonovo atmosfero 30 minut, nastala je blago motna raztopina rumene barve. Potem smo v bučko dodali 0,300 g (1,07 mmol, 1 ekviv.) spojine 2 in 0,12 mL (1,07 mmol, 1 ekviv.) NMM. Po dodatku spojine 2 je nastala oborina. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 24 ur na sobni temperaturi, pod argonovo atmosfero. Nato smo uparili topilo pod znižanim tlakom in reakcijsko zmes raztopili v EtOAc ter jo prelili v lij ločnik. Organsko fazo smo spirali s citronsko kislino (10-odstotna raztopina citronske kisline v vodi, 2×20 mL), NaHCO_3 (nasičena raztopina, 1×20 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (1×20 mL). Organsko fazo smo sušili z Na_2SO_4 in uparili topilo pri znižanem tlaku. Preostanek smo prelili z dietiletrom (Et_2O) in za 24 ur pustili v hladilniku na 4°C . Naslednji dan smo Et_2O uparili pod znižanim tlakom in dobili 0,221 g rahlo rumene trdne snovi. Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = DKM : MeOH : Et_3N = 9 : 1 : 1 kapljica).

Lastnosti spojine 5:

Molekulska formula: $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$

Molekulska masa: 350,41

Izgled: blago rumeni kristali

Tališče: $85\text{--}88.5^\circ\text{C}$

Rf: 0,4 (MF = DKM : MeOH : Et_3N = 9 : 1 : 1 kapljica)

Izkoristek: 48,0 mg, $\eta = 13\%$

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.10 (m, 1H, CH_2), 1.42 (m, 2H, CH_2), 1.77 (br, 2H, CH_2), 2.75 (m, 1H, CH_2), 2.85 (m, 2H, CHCH_2O), 3.17 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, CO-CH-O-CH_2), 3.63 (m, 1H, CH_2), 3.87-3.92 (m, 1H, CH_2), 4.64 (s, 1H, $(\text{CH}_2)_2\text{CHNH}$), 7.41 (m, 1H, Ar-H), 7.42-7.51 (m, 4H, Ar-H), 7.70-7.76 (m, 4H, Ar-H), 8.15 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH)

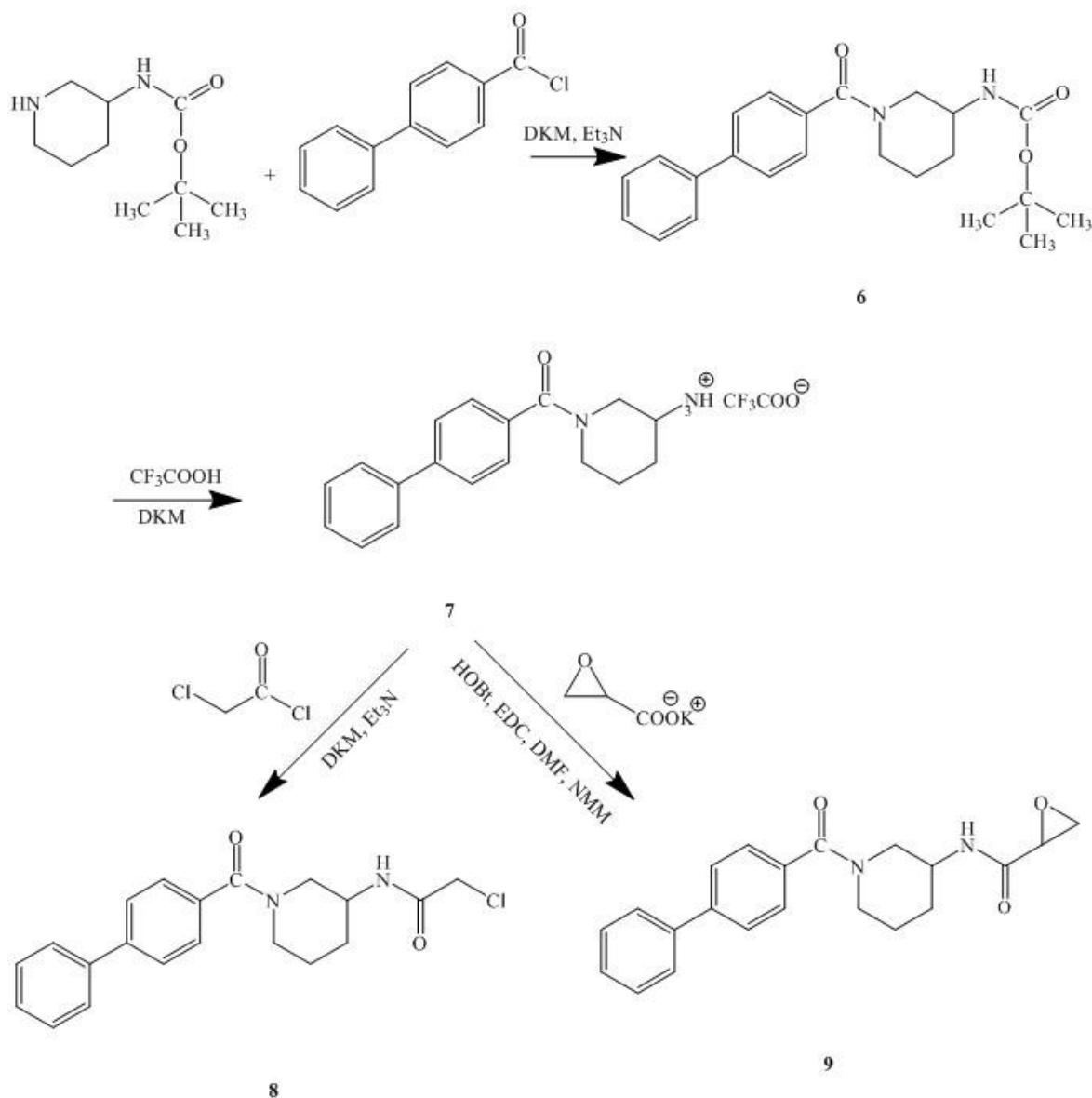
^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 31.73 (CH_2), 31.68 (CH_2), (32.58 (NCH_2CH_2), (32.65 (NCH_2CH_2), (46.20 (CHCH_2O), 47.70 ($(\text{CH}_2)_2\text{CHNH}$), 49.57 (OC-CHO), 127.17 ($2 \times \text{CH-Ar}$), 127.27 (CH-Ar), 127.48 (CH-Ar), 127.86 (CH-Ar), 127.92 ($2 \times \text{CH-Ar}$), 128.93

Nika Nusdorfer: Sinteza kovalentnih zaviralcev imunoproteasoma z amino-substituiranim piperidinskim obročem

($2 \times \underline{\text{CH-Ar}}$), 134.44 ($\text{Ar-C}\underline{\text{CO}}$), 140.18(C-Ar), 142.78 (C-Ar), 168.05 ($\text{HN}\underline{\text{COC}}$), 170.35 ($\text{N}\underline{\text{COC}}$)

MS (ESI+): $m/z = 351,1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, $m/z = 373,1$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $m/z = 414,0$ $[\text{M}+\text{CH}_3\text{CN}+\text{Na}]^+$, izračunan $m/z = 350,16$

MS (ESI-): $m/z = 349,0$ $[\text{M-H}]^-$



Slika 17: Reakcijska shema sintez končnih spojin *N*-(1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-3-il)-2-kloroacetamida (**8**) in *N*-(1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-3-il)oksiran-2-karboksamida (**9**)

4.1.6 Sinteza terc-butil (1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-3-il)karbamata (**6**)

Pri sintezi spojine **6** smo uporabili identičen postopek kot pri sintezi spojine **1**. Uporabili smo 0,750 g (3,75 mmol, 1 ekviv.) boc-zaščitene 3-aminopiperidina, 0,892 g (4,12 mmol, 1,1 ekviv.) [1,1'-bifenil]-4-karbonil klorida in ju raztopili v 30 mL DKM in 2 mL (14,4 mmol, 4 ekviv.) Et₃N. Spojino **6** smo izolirali in izvedli prekrizalizacijo iz EtOAc na enak način kot pri spojini **1**, vendar se potem nismo odločili za čiščenje s kolonsko kromatografijo. Spojino **6** smo očistili z dodatkom Et₂O ter bučko za 24 ur postavili v hladilnik na 4 °C. Nato smo odfiltrirali oborino in matičnico pod znižanim tlakom uparili do trdnega zaostanka.

Lastnosti spojine **6**:

Molekulska formula: C₂₃H₂₈N₂O₃

Molekulska masa: 380,49

Izgled: bel prah

Tališče: 125–127 °C

R_f: 0,8 (MF = EtOAc)

Izkoristek: 0,942 g, η = 66 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.07 (s, 2H, CH₂), 1.41 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.67-1.85 (m, 2H, CH₂), 3.00-3.13 (m, 1H, CH₂), 3.39 (s, 2H, CH₂), 3.92 (m, 1H, CH₂), 4.32 (m, 1H, CH), 6.97 – 7.01 (br, 1H, NH), 7.38-7.42 (m, 1H, Ar-H), 7.47-7.51 (m, 4H, Ar-H), 7.71 (m, 4H, Ar-H)

MS (ESI+): m/z = 381,2 [M+H]⁺, m/z = 403,1 [M+Na]⁺, m/z = 444,1 [M+CH₃CN+Na]⁺, izračunan m/z = 380,2

MS (ESI-): m/z = 379,1 [M-H]⁻

IR (ATR): ν [cm⁻¹] = 509, 539, 564, 593, 635, 693, 723, 741, 779, 847, 871, 918, 973, 1009, 1054, 1109, 1136, 1169, 1250, 1313, 1344, 1364, 1391, 1445, 1519, 1555, 1600, 1700, 2934, 3320

4.1.7 Sinteza (1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-3-amonijevega trifluoroacetata (**7**))

Za sintezo spojine **7** smo uporabili enak postopek kot pri sintezi spojine **2**. Pri sintezi smo uporabili 0,890 g (2,34 mmol, 1 ekviv.) spojine **2**, 15 mL DKM in 3 mL (39,2 mmol) TFA. Postopek se je razlikoval v tem, da je reakcija potekla po eni uri in nismo dodali dodatne količine TFA. Poleg tega za izolacijo nismo uporabili ekstrakcije, kot smo to storili pri spojini **2**. Po odstranitvi topila smo dodali 20 mL Et₂O in bučko postavili v hladilnik. Po 2 urah smo dietileter odlili in dodali novega. Postopek z dodajanjem dietiletra smo ponovili še 2-krat. V bučki je izpadla bela oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem in jo posušili na zraku.

Lastnosti spojine **7**:

Molekulska formula: C₁₈H₂₀N₂O⁺ + C₂F₃O₂⁻

Molekulska masa: 280,36 + 112,99 = 393,36

Izgled: bel prah

Tališče: 163–165 °C

Rf: 0 (MF = DKM)

Izkoristek: 0,550 g, η = 60 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.52-1.62 (m, 2H, CH₂), 1.75 (s, 1H, CH₂), 2.02 (m, 1H, CH₂), 3.20 (m, 3H, CH₂), 3.67 (s, 1H, CH₂), 4.30 (m, 1H, CH), 7.39-7.43 (m, 1H, Ar-H), 7.48-7.54 (m, 4H, Ar-H), 7.73 (m, 4H, Ar-H), 8.04-8.12 (m, 3H, NH₃)

MS (ESI⁺): m/z = 281,1 [M+H]⁺, izračunan m/z = 280,16 (izračunano za prosto bazo z molekulsko formulo C₁₈H₂₀N₂O), m/z = 303,1 [M+Na]⁺, m/z = 344,23 [M+CH₃CN+Na]⁺

IR (ATR): ν [cm⁻¹] = 565, 629, 695, 721, 745, 778, 795, 847, 870, 895, 918, 970, 1007, 1027, 1054, 1078, 1109, 1165, 1247, 1273, 1314, 1344, 1365, 1392, 1442, 1519, 1601, 1628, 1668, 1700, 2933, 3324

4.1.8 Sinteza N-(1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-3-il)-2-kloroacetamida (**8**)

Za sintezo spojine **8** smo uporabili enak sintezni protokol kot pri spojini **3**. V bučko smo zatehtali 0,100 g (0,36 mmol, 1 ekviv.) spojine **7**, 7 mL DKM, 60,0 μL (0,43 mmol, 1,2 ekviv.) Et₃N in na koncu še 34,0 μL (0,43 mmol, 1,2 ekviv.) 2-kloroacetil klorida. Po poteku reakcije smo reakcijsko zmes prelili v lij ločnik in ekstrahirali po enakem postopku kot pri

spojini **3**. Surovi produkt smo prekrystalizirali iz EtOAc, nastala je bela oborina, ki smo jo odfiltrirali z metodo presesavanja. Matičnico smo za 24 ur postavili v hladilnik na 4 °C in dodatno oborino prav tako odfiltrirali.

Lastnosti spojine **8**:

Molekulska formula: C₂₀H₂₁ClN₂O₂

Molekulska masa: 356,84

Izgled: bel puhast prah

Tališče: 149,2–151,5 °C

Rf: 0,5 (MF = EtOAc)

Izkoristek: 0,035 g, η = 25 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.53-1.88 (m, 4H, CH₂), 2.90 (m, 1H, CH₂), 3.10 (m, 1H, CH₂), 3.57 (m, 1H, CH₂), 3.74 (m, 1H, CH₂), 4.04 (m, 2H, OCCH₂Cl), 4.24 (s, 1H, CH), 7.38-7.42 (m, 1H, Ar-H), 7.50 (m, 4H, Ar-H), 7.72 (m, 4H, Ar-H), 8.27 (m, 1H, NH)

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 22.75 (CH₂), 29.65 (CH₂), 42.63 (OCCH₂Cl) 45.78 (2 × CH₂CH₂N), 46.33 (CH₂CH₂CHNH), 127.42 (CH-Ar), 127.46 (CH-Ar), 127.62 (CH-Ar), 127.78 (CH-Ar), 127.86 (CH-Ar), 128.05 (CH-Ar), 128.19 (CH-Ar), 128.91 (CH-Ar), 129.02 (CH-Ar), 134.03 (C-Ar), 140.17 (C-Ar), 142.97 (C-Ar), 165.60 (HNCOCH₂), 171.50 (NCOCH₂)

MS (ESI+): m/z = 357,1 [M+H]⁺, m/z = 379,0 [M+Na]⁺, izračunan m/z = 356,13

MS (ESI-): m/z = 355,0 [M-H]⁻

IR (ATR): ν [cm⁻¹] = 511, 539, 572, 594, 626, 694, 742, 776, 846, 863, 923, 991, 1006, 1040, 1110, 1138, 1185, 1243, 1265, 1295, 1322, 1349, 1432, 1542, 1581, 1623, 2869, 2959, 3016, 3291

4.1.9 Sinteza N-(1-([1,1'-bifenil]-4-karbonil)piperidin-3-il)oksiran-2-karboksamida (**9**)

Za sintezo spojine **9** smo uporabili enak postopek kot pri spojini **5**. Uporabili smo 0,200 g (0,71 mmol, 1 ekviv.) spojine **7**, 0,089 g (0,71 mmol, 1 ekviv.) reagenta kalijevega oksiran-2-karboksilata, EDC (0,137 g, 0,71 mmol, 1 ekviv.) in 0,109 g (0,71 mmol, 1 ekviv.) HOBt. Kot topilo smo uporabili 4 mL DMF in skupno 0,235 mL (2,14 mmol, 3 ekviv.) NMM. Tudi postopek izolacije in čiščenja spojine **9** je bil enak kot pri sintezi spojine **5**. Po ekstrakciji smo uparili organsko fazo pod znižanim tlakom in spojino očistili s kolonsko kromatografijo

Nika Nusdorfer: Sinteza kovalentnih zaviralcev imunoproteasoma z amino-substituiranim piperidinskim obročem

(MF = DKM : MeOH = 9 : 1). Izbrano frakcijo spojin (2–7) smo še enkrat očistili s kolonsko kromatografijo (MF = DKM : MeOH = 15 : 1) in dobili 0,073 g spojine **9**.

Lastnosti spojine **9**:

Molekulska formula: C₂₁H₂₂N₂O₃

Molekulska masa: 350,41

Izgled: blede rumenkasta oljnata spojina

Rf: 0,2 (MF = DKM : MeOH = 15 : 1)

Izkoristek: 0,073 g, η = 29 %

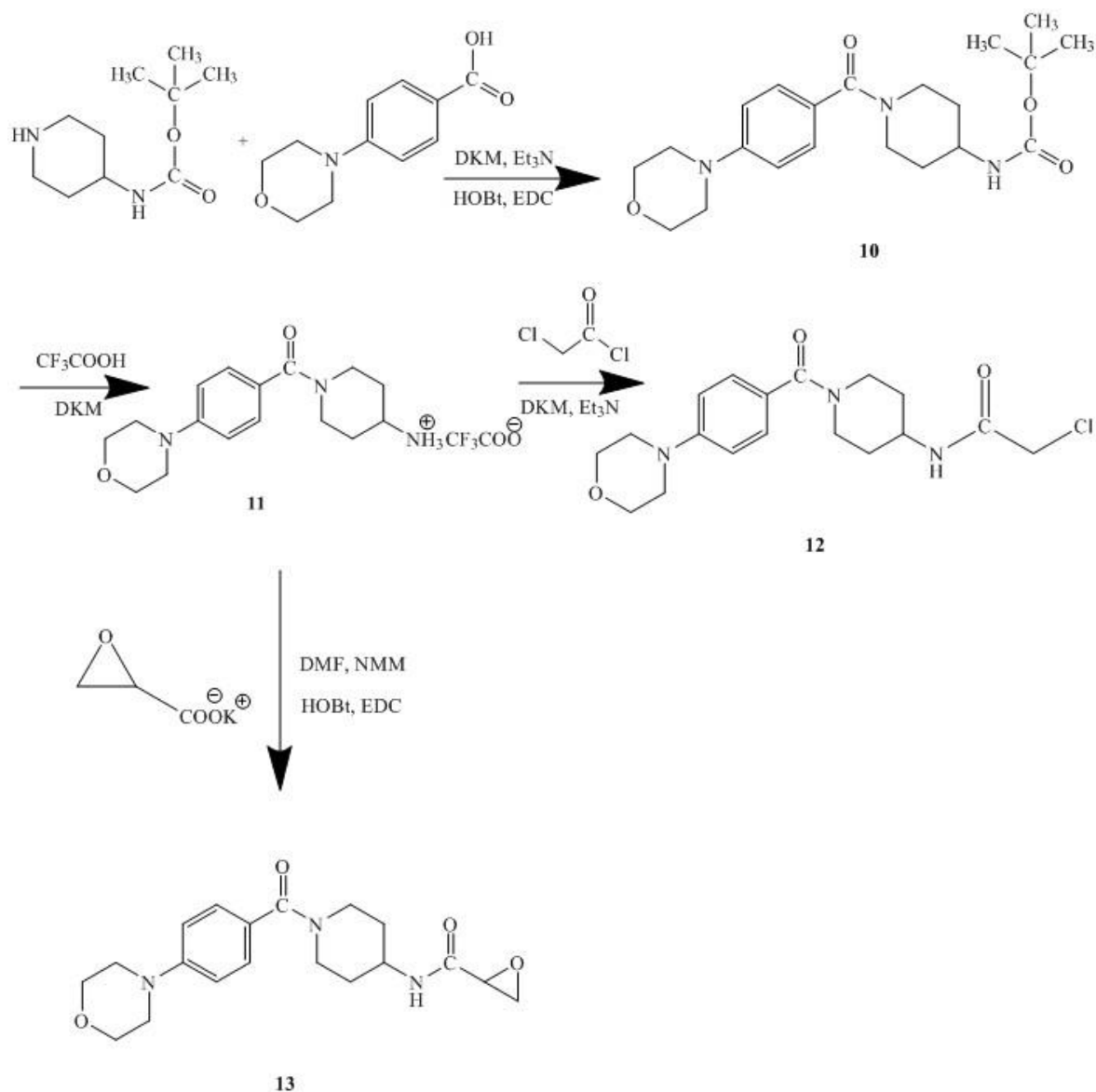
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.85 (m, 4H, CH₂), 2.85 (m, 2H, OCH₂CH), 2.89 (m, 2H, CH₂), 3.35 (m, 1H, CH₂), 3.54 (m, 1H, CH₂), 3.75-3.78 (m, 1H, OCHCH₂), 4.25 (m, 1H, (CH₂)₂CHNH), 7.39-7.52 (m, 5H, Ar-H), 7.71-7.74 (m, 4H, Ar-H), 8.24 (d, J = 7.60 Hz, 1H, NH)

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 22.9 (CH₂), 29.9 (CH₂), 36.55 (CH₂CH₂N), 45.30 (OCH₂CH), 47.68 (CHNH), 49.60 (CHCH₂N), 53.47 (CH₂CHO), 127.18 (CH-Ar), 127.24 (2 × CH-Ar), 127.72 (CH-Ar), 127.86 (2 × CH-Ar), 128.91 (2 × CH-Ar), 134.10 (C-Ar), 140.16 (C-Ar), 142.93 (C-Ar), 168.19 (2 × CO)

MS (ESI⁺): m/z = 351,1 [M+H]⁺, m/z = 373,1 [M+Na]⁺, m/z = 409,1 [M+CH₃CN+Na]⁺, m/z = 389,1 [M+K]⁺, izračunan m/z = 350,16

MS (ESI⁻): m/z = 349,1 [M-H]⁻, m/z = 385,0 [M+Cl]⁻

4.2 Sinteza 4-morfolinobenzoil-4-acetamidnih derivatov



Slika 18: Reakcijska shema sinteze 2-kloro-N-(1-(4-morfolinobenzoil)piperidin-4-il)acetamida (**12**) in N-(1-(4-morfolinobenzoil)piperidin-4-il)oksiran-2-karboksamida (**13**)

4.2.1 Sinteza terc-butil (1-(4-morfolinobenzoil)piperidin-4-il)karbamata (**10**)

V 50-mililitrsko suho bučko zatehtamo 0,724 g (3,49 mmol, 1 ekviv.) 4-morfolinobenzojske kisline, 0,669 g (3,49 mmol, 1 ekviv.) EDC in 0,535 g (3,49 mmol, 1 ekviv.) HOBt. Reagente smo raztopili v 25 mL DKM, dodali 2 mL (14,4 mmol, 4 ekviv.) Et₃N in pustili mešati 30 minut na ledeni kopeli pri 0 °C, pod argonovo atmosfero. Nato smo dodali 0,700 g (3,49 mmol, 1 ekviv.) boc-zaščitene 4-aminopiperidina in 1 mL (7,18 mmol, 2 ekviv.) Et₃N.

Reakcijsko zmes smo pustili mešati 24 ur na sobni temperaturi, pod argonovo atmosfero. Nato smo uparili topilo pri znižanem tlaku, nastalo oborino suspendirali v zmesi EtOAc in vode in jo odfiltrirali s presesavanjem. Preostanku organske faze smo uparili topilo pri znižanem tlaku do približno 10 mL in bučko s preostankom organske faze za 24 ur postavili v hladilnik. Nastalo oborino smo odfiltrirali.

Lastnosti spojine **10**:

Molekulska formula: C₂₁H₃₁N₃O₄

Molekulska masa: 389,50

Izgled: bel prah

Tališče: 122,5–125 °C

Rf: 0,7 (MF = EtOAc)

Izkoristek: 0,775 g, η = 57 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.27-1.33 (m, 2H, CH₂), 1.38 (s, 9H, boc), 1.73 (m, 2H, CH₂), 2.98 (m, 2H, CH₂CH₂N), 3.17 (m, 4H, CH₂CH₂N), 3.49-3.51 (m, 1H, CHNH), 3.91 (m, 4H, CH₂CH₂O), 4.00 (s, 2H, CH₂), 6.89 (d, J = 1.60 Hz, 1H, NH), 6.96 (m, 2H, Ar-H), 7.25 (m, 2H, Ar-H)

¹³C NMR (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 28.22 (3 × CCH₃), 31.93 (2 × CHCH₂CH₂), 38.85 (CH₂CH₂N), 39.06 (CH₂CH₂N), 40.10 (CHNH), 47.24 (OCH₂CH₂N), 47.57 (OCH₂CH₂N), 65.96 (2 × OCH₂CH₂), 77.59 (C(CH₃)₃), 113.78 (2 × CH-Ar), 125.62 (C-Ar), 128.43 (2 × CH-Ar), 151.73 (C-Ar), 154.77 (NHCOO), 169.18 (CCON)

MS (ESI+): m/z = 412,4 [M+Na]⁺, m/z = 390,5 [M+H]⁺, izračunan m/z = 389,23

IR (ATR): ν [cm⁻¹] = 516, 555, 610, 643, 697, 720, 748, 762, 778, 800, 835, 868, 894, 925, 967, 1032, 1053, 1119, 1138, 1174, 1239, 1284, 1315, 1342, 1367, 1392, 1426, 1443, 1518, 1607, 1623, 1666, 2962, 3325

4.2.2 Sinteza 1-(4-morfolinobenzoil)piperidin-4-amonijevega trifluoroacetata (**11**)

V 50-mililitrsko bučko smo zatehtali 0,745 g (1,91 mmol, 1 ekviv.) spojine **10** in jo raztopili v 20 mL DKM. Nato smo v bučko dodali 3 mL TFA in mešali pri sobni temperaturi. Po eni uri smo v reakcijsko zmes dodali še 1 mL TFA. DKM in TFA smo uparili pod znižanim tlakom, dodali 10 mL Et₂O in pustili v hladilniku. Po 2 urah smo dietileter odlili in dodali

Nika Nusdorfer: Sinteza kovalentnih zaviralcev imunoproteasoma z amino-substituiranim piperidinskim obročem

novega. Postopek z dodajanjem dietiletra smo ponovili še 2-krat. V bučki je izpadla bela oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem in jo posušili na zraku.

Lastnosti spojine **11**:

Molekulska formula: $C_{16}H_{23}N_3O_2^+ + C_2F_3O_2^-$

Molekulska masa: $289,37 + 112,99 = 402,36$

Izgled: umazano bel prah

Tališče: 150–154 °C

Rf: 0 (MF = EtOAc)

Izkoristek: 0,673 g, $\eta = 87\%$

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.39-1.44 (m, 2H, CH_2), 1.91 (m, 2H, CH_2), 2.99 (m, 2H, CH_2), 3.18 (m, 4H, CH_2), 3.30 (m, 1H, CH), 3.74 (m, 4H, CH_2), 4.09 (m, 2H, CH_2), 6.97 (m, 2H, Ar-H), 7.27 (d, $J = 8.80$ Hz, 2H, Ar-H), 7.95 (s, 3H, NH_2^+)

MS (ESI+): $m/z = 290,5$ $[M+H]^+$, izračunan $m/z = 289,18$ (izračunano za prosto bazo z molekulsko formulo $C_{16}H_{23}N_3O_2$)

IR (ATR): ν [cm^{-1}] = 515, 556, 610, 643, 697, 720, 747, 762, 778, 800, 836, 870, 894, 925, 967, 1008, 1032, 1053, 1118, 1138, 1174, 1240, 1283, 1315, 1343, 1366, 1392, 1427, 1443, 1520, 1607, 1623, 1666, 2962, 3320

4.2.3 Sinteza 2-kloro-*N*-(1-(4-morfolinobenzoil)piperidin-4-il)acetamida (**12**)

Pri sintezi spojine **12** smo uporabili enak postopek kot pri sintezi spojine **3**, razlikovala se je le izhodna spojina in metoda izolacije ter čiščenja. Uporabili smo 0,100 g (0,35 mmol, 1 ekviv.) spojine **11**, jo raztopili v zadostni količini DKM in dodali 0,5 mL (3,59 mmol, 10 ekviv.) Et_3N . Nato smo dodali še 32,9 μ L (0,41 mmol, 1,2 ekviv.) 2-kloracetilklorida. Reakcija je potekala 24 ur, pod argonovo atmosfero. Reakcijski zmesi smo uparili topilo pri znižanem tlaku in raztopili v minimalni količini DKM. Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc : Et_3N = 100 : 1).

Lastnosti spojine **12**:

Molekulska formula: $C_{18}H_{24}ClN_3O_3$

Molekulska masa: 365,85

Izgled: bel prah

Tališče: 157,5–160 °C

Rf: 0,3 (MF = EtOAc : Et₃N = 100 : 1)

Izkoristek: 0,040 g, η = 32 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.35 (m, 2H, CH₂), 1.77 (m, 2H, CH₂), 3.04 (br, 2H, CH₂), 3.17 (m, 4H, CH₂), 3.72-3.85 (m, 7H, CH₂), 4.03 (s, 2H, CH₂Cl), 6.96 (d, J = 8.80 Hz, 2H, Ar-H), 7.27 (m, 2H, Ar-H), 8.22 (d, J = 7.60 Hz, 1H, NH)

¹³C NMR (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 31.10 (CH₂CH₂CH), 31.27 (CH₂CH₂CH), 38.85 (CH₂CH₂N), 39.06 (CH₂CH₂N), 40.10 (OCCH₂Cl), 42.68 (CHNH), 46.33 (NCH₂CH₂O), 47.56 (NCH₂CH₂O), 65.96 (2 × OCH₂CH₂), 113.80 (2x CH-Ar), 125.56 (C-Ar), 128.45 (2 × CH-Ar), 151.76 (C-Ar), 165.11 (NHCOCH₂), 169.33 (CCON)

MS (ESI+): m/z = 366,2 [M+H]⁺, m/z = 388,1 [M+Na]⁺, m/z = 429,1 [M+CH₃CN+Na]⁺, izračunan m/z = 365,15

MS (ESI-): m/z = 364,1 [M-H]⁻

IR (ATR): ν [cm⁻¹] = 576, 643, 707, 762, 780, 828, 863, 893, 925, 986, 1027, 1052, 1068, 1098, 1114, 1199, 1232, 1265, 1327, 1369, 1434, 1539, 1610, 1636, 2852, 3294

4.2.4 Sinteza N-(1-(4-morfolinobenzoil)piperidin-4-il)oksiran-2-karboksamida (**13**)

Pri sintezi spojine **13** smo uporabili enak postopek kot pri sintezi spojine **5**. Uporabili smo 0,087 g (0,69 mmol, 1 ekviv.) kalijevega oksiran-2-karboksilata, 0,133 g (0,69 mmol, 1 ekviv.) EDC in 0,106 g (0,69 mmol, 1 ekviv.) HOBt. Poleg naštetih reagentov smo uporabili še skupno 0,228 mL (2,07 mmol, 3 ekviv.) NMM, 5,0 mL DMF ter 0,200 g (0,69, 1 ekviv.) spojine **11**. Po poteku reakcije smo reakcijski zmesi uparili topilo pri znižanem tlaku in spojino takoj očistili s kolonsko kromatografijo (MF = DKM : MeOH = 9 : 1). Dobili smo 0,067 g spojine **13**, vendar slednja ni bila popolnoma čista. Zato smo jo ponovno očistili s kolonsko kromatografijo, vendar smo zamenjali razmerje topil v mobilni fazi (MF = DKM : MeOH = 15 : 1).

Lastnosti spojine **13**:

Molekulska formula: C₁₉H₂₅N₃O₄

Molekulska masa: 359,4

Izgled: brezbarvna viskozna tekočina

Rf: 0,4 (MF = DKM : MeOH = 9 : 1)

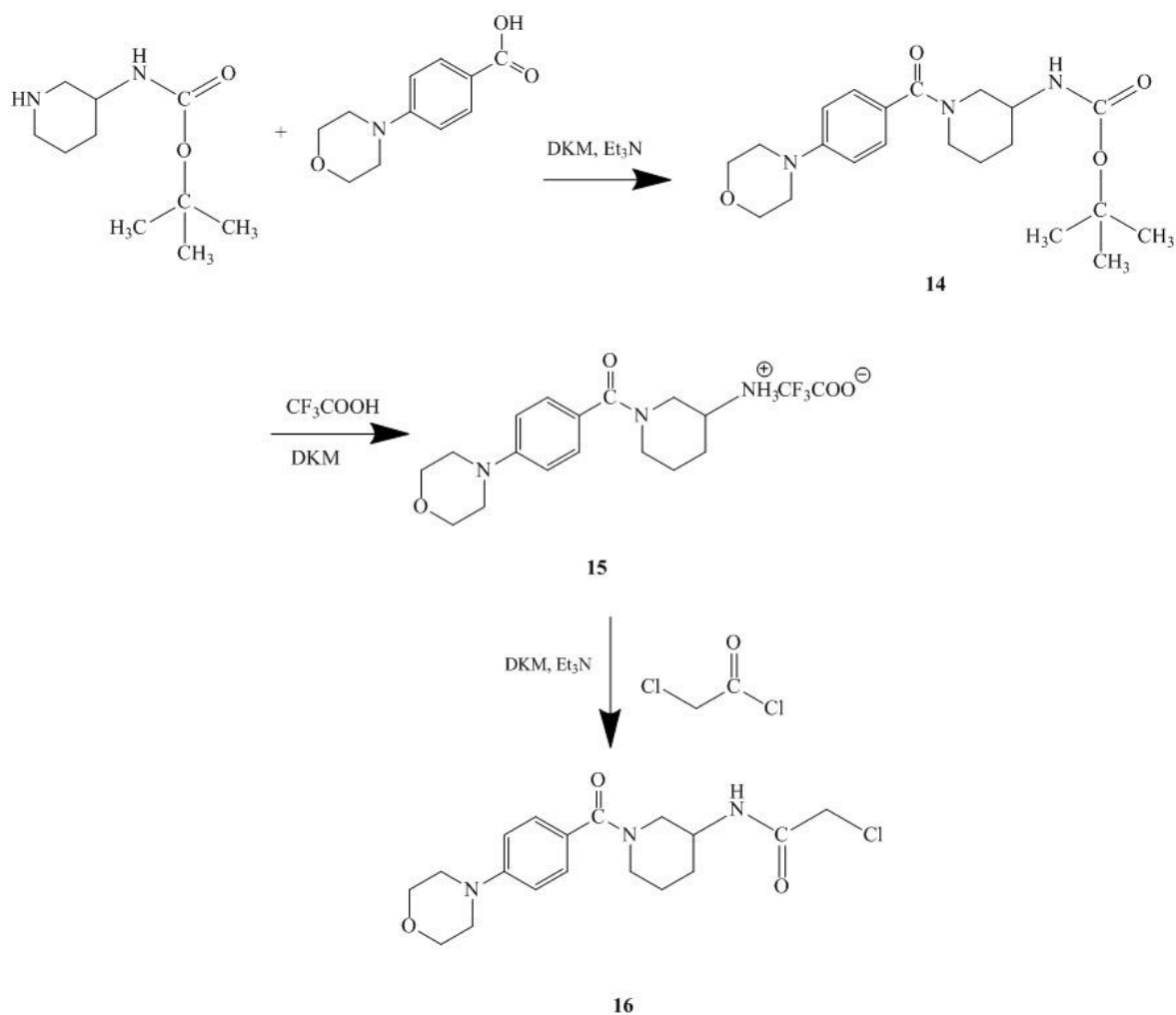
Izkoristek: 0,020 g, η = 8 %

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.38 (m, 2H, CH_2), 1.73 (m, 2H, CH_2), 2.73-2.76 (m, 1H, OCHCH_2), 2.88 (m, 2H, OCH_2CH), 3.01 (m, 2H, CH_2), 3.17 (m, 4H, CH_2), 3.34 (m, 1H, CHNH), 3.74 (m, 4H, CH_2), 3.85 (m, 2H, CH_2), 6.96 (m, 2H, Ar-H), 7.27 (m, 2H, Ar-H), 8.13 (d, $J = 8.00$ Hz, 1H, NH)

^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 31.26 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 31.35 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 38.57 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 38.83 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 45.46 (CHCH_2O), 45.86 (CH_2CHNH), 47.56 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 48.39 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 54.89 (OCCHO), 65.96 ($2 \times \text{CHCH}_2\text{O}$), 113.80 ($2 \times \text{CH-Ar}$), 125.57 (C-Ar), 128.42 ($2 \times \text{CH-Ar}$), 151.76 (C-Ar), 166.87 (NHCOCH_2), 169.30 (CCON)

MS (ESI $^+$): $m/z = 360,2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, $m/z = 382,1$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $m/z = 423,1$ $[\text{M}+\text{CH}_3\text{CN}+\text{Na}]^+$, izračunan $m/z = 359,18$

MS (ESI $^-$): $m/z = 358,1$ $[\text{M}-\text{H}]^-$



Slika 19: Reakcijska shema sinteze 2-kloro-N-(1-(4-morfolinobenzoil)piperidin-3-il)acetamida (**16**)

4.2.5 Sinteza terc-butil (1-(4-morfolinobenzoil)piperidin-3-il)karbamata (**14**)

Sintezo spojine **14** smo izvedli po enakem postopku kot pri spojini **10**, pri čemer smo uporabili 0,750 g (3,75 mmol, 1 ekviv.) boc-zaščitenega 3-aminopiperidina, 0,776 g (3,75 mmol, 1 ekviv.) 4-morfolinobenzojske kisline, 0,573 g (3,75 mmol, 1 ekviv.) HOBt in 0,717 g (3,75 mmol, 1 ekviv.) EDC. Poleg tega smo uporabili še skupno 3 mL (21,5 mmol, 5,8 ekviv.) Et₃N in 30 mL DKM. Dobili smo 1,281 g spojine **14**.

Lastnosti spojine **14**:

Molekulska formula: C₂₁H₃₁N₃O₄

Molekulska masa: 389,50

Izgled: bela oborina

Tališče: 137–139,7 °C

Rf: 0,7 (MF = EtOAc)

Izkoristek: 1,281 g, η = 89 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 1.23-1.37 (m, 9H, boc), 1.44 (m, 2H, CH₂), 1.69 (s, 1H, CH₂), 1.83 (s, 1H, CH₂), 2.78-2.97 (m, 2H, CH₂), 3.17 (m, 4H, CH₂), 3.34 (s, 3H, CH₂), 3.73 (m, 3H, CH₂), 3.75 (m, 1H, CH), 6.94 (d, J = 8.40 Hz, 3H, Ar-H), 7.28 (s, 1H, Ar-H), 7.30 (s, 1H, NH)

MS (ESI+): m/z = 391,2 [M+H]⁺, izračunan m/z = 389,23

MS (ESI-): m/z = 388,1[M-H]⁻

IR (ATR): ν [cm⁻¹] = 515, 537, 570, 589, 694, 743, 807, 833, 856, 893, 926, 957, 993, 1026, 1049, 1076, 1104, 1161, 1231, 1303, 1359, 1407, 1429, 1453, 1496, 1533, 1623, 1650, 2937, 3032, 3278

4.2.6 Sinteza 1-(4-morfolinobenzoil)piperidin-3-amonijevega trifluoroacetata (**15**)

Postopek priprave spojine **15** je bil enak kot pri sintezi spojine **11**. Uporabili smo 1,230 g (3,16 mmol, 1 ekviv.) spojine **14**, 5 TFA in 30 mL DKM. Po poteku reakcije smo uparili DKM in TFA, v bučko dodali Et₂O in jo za 24 ur postavili v hladilnik. Postopek z dodajanjem dietiletra smo ponovili še 2-krat. V bučki je izpadla bela oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem in jo posušili na zraku. Lastnosti spojine **15**:

Molekulska formula: $C_{16}H_{23}N_3O_2^+ + C_2F_3O_2^-$

Molekulska masa: $289,37 + 112,99 = 402,37$

Izgled: bela oborina

Rf: 0 (MF = EtOAc)

Izkoristek: 0,150 g, $\eta = 12\%$

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.46-1.59 (m, 2H, CH_2), 1.73 (m, 1H, CH_2), 2.01 (m, 1H, CH_2), 3.02 (m, 2H, CH_2), 3.18 (m, 4H, CH_2), 3.74 (m, 4H, CH_2), 4.14 (br, 1H, CH), 6.97 (m, 2H, Ar- H), 7.33 (m, 2H, Ar- H), 8.02 (s, 3H, NH_2^+)

MS (ESI+): $m/z = 291,0$ $[M+H]^+$, izračunan $m/z = 289,18$ (izračunano za prosto bazo z molekulsko formulo $C_{16}H_{23}N_3O_2$)

IR (ATR): $\nu [cm^{-1}] = 537, 599, 640, 717, 762, 831, 925, 968, 1004, 1029, 1050, 1068, 1114, 1172, 1196, 1230, 1275, 1380, 1434, 1517, 1603, 1671, 2854, 2929$

4.2.7 Sinteza 2-kloro-*N*-(1-(4-morfolinobenzoil)piperidin-3-il)acetamida (**16**)

Pri sintezi spojine **16** smo uporabili enak postopek kot pri spojini **3**. V bučko smo zatehtali 0,123 g (0,43 mmol, 1 ekviv.) spojine **15** ter 40,56 μ L (0,51 mmol, 1,2 ekviv.) 2-kloroacetilklorida. Dodali smo 71,09 μ L (0,51 mmol, 1,2 ekviv.) Et_3N in 20 mL DKM. Ko je reakcija potekla, se nismo odločili za postopek ekstrakcije, vendar smo reakcijski zmesi uparili topilo pri znižanem tlaku ter surovi produkt prekristalizirali iz EtOAc. Z 1H NMR smo dokazali, da produkt še ni povsem čist, zato smo ga dodatno očistili s kolonsko kromatografijo (MF = DKM : MeOH = 20 : 1).

Lastnosti spojine **16**:

Molekulska formula: $C_{18}H_{24}ClN_3O_3$

Molekulska masa: 365,85

Izgled: skoraj brezbarvna viskozna tekočina

Rf: 0,08 (MF = DKM : MeOH = 20 : 1)

Izkoristek: 0,077 g, $\eta = 50\%$

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.50 (m, 2H, CH_2), 1.72 (m, 1H, CH_2), 1.86 (m, 1H, CH_2), 2.89-2.94 (m, 1H, CH_2), 3.07-3.19 (m, 5H, CH_2), 3.33 (m, 2H, CH_2), 3.67-3.73 (m, 5H, CH_2), 3.75 (m, 1H, CH), 4.07 (m, 2H, CH_2Cl), 6.94 (d, $J = 8.80$ Hz, 2H, Ar- H), 7.29 (d, $J = 8.80$ Hz, 2H, Ar- H), 8.24 (d, $J = 7.60$ Hz, 1H, NH)

Nika Nusdorfer: Sinteza kovalentnih zaviralcev imunoproteasoma z amino-substituiranim piperidinskim obročem

^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 19.08 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 22.75 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 29.46 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 42.62 ($\text{OC}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Cl}$), 46.44 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 47.57 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 48.31 ($\underline{\text{C}}\text{H}\text{NH}$), 66.73 ($2 \times \text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{N}$), 76.53 ($\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{O}$), 77.36 ($\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{O}$), 114.33 ($\underline{\text{C}}\text{H}\text{-Ar}$), 114.45 ($\underline{\text{C}}\text{H}\text{-Ar}$), 125.47 ($\underline{\text{C}}\text{-Ar}$), 129.22 ($2 \times \underline{\text{C}}\text{H}\text{-Ar}$), 152.49 ($\underline{\text{C}}\text{-Ar}$), 165.59 ($\text{HNC}\underline{\text{O}}\text{CH}_2$), 171.86 ($\text{C}\underline{\text{C}}\text{ON}$)

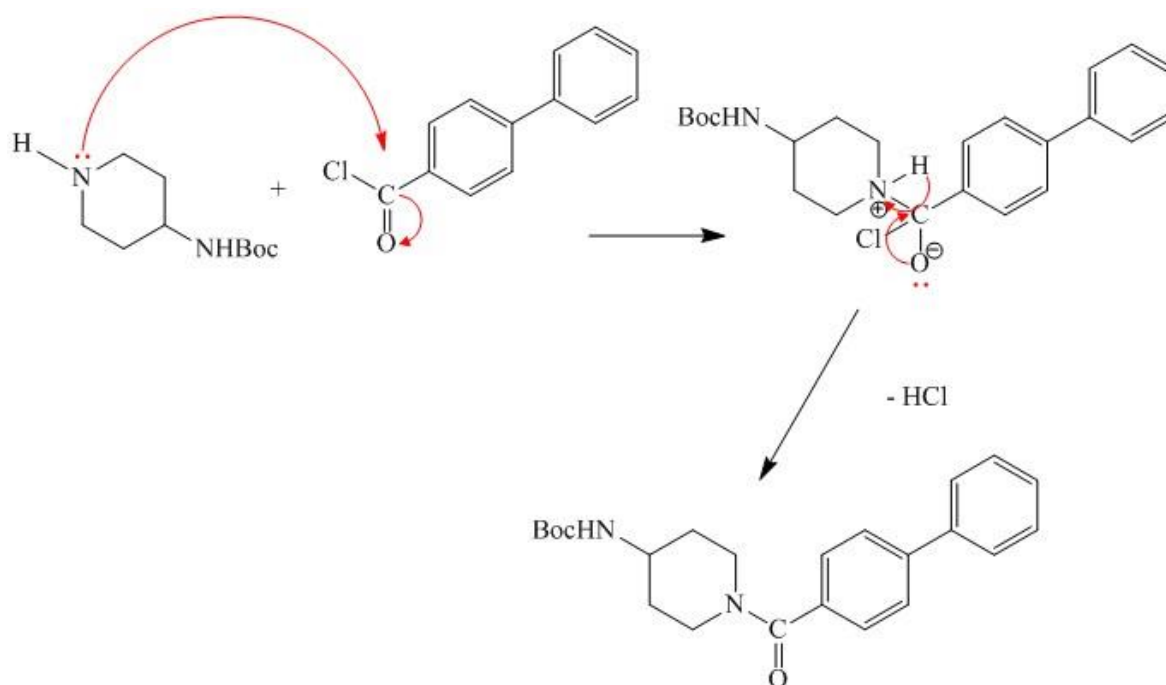
MS (ESI+): $m/z = 366,1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, izračunan $m/z = 365,15$

MS (ESI-): $m/z = 364,9$ $[\text{M}-\text{H}]^-$

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 Sinteza amidov z uporabo kislinskega klorida

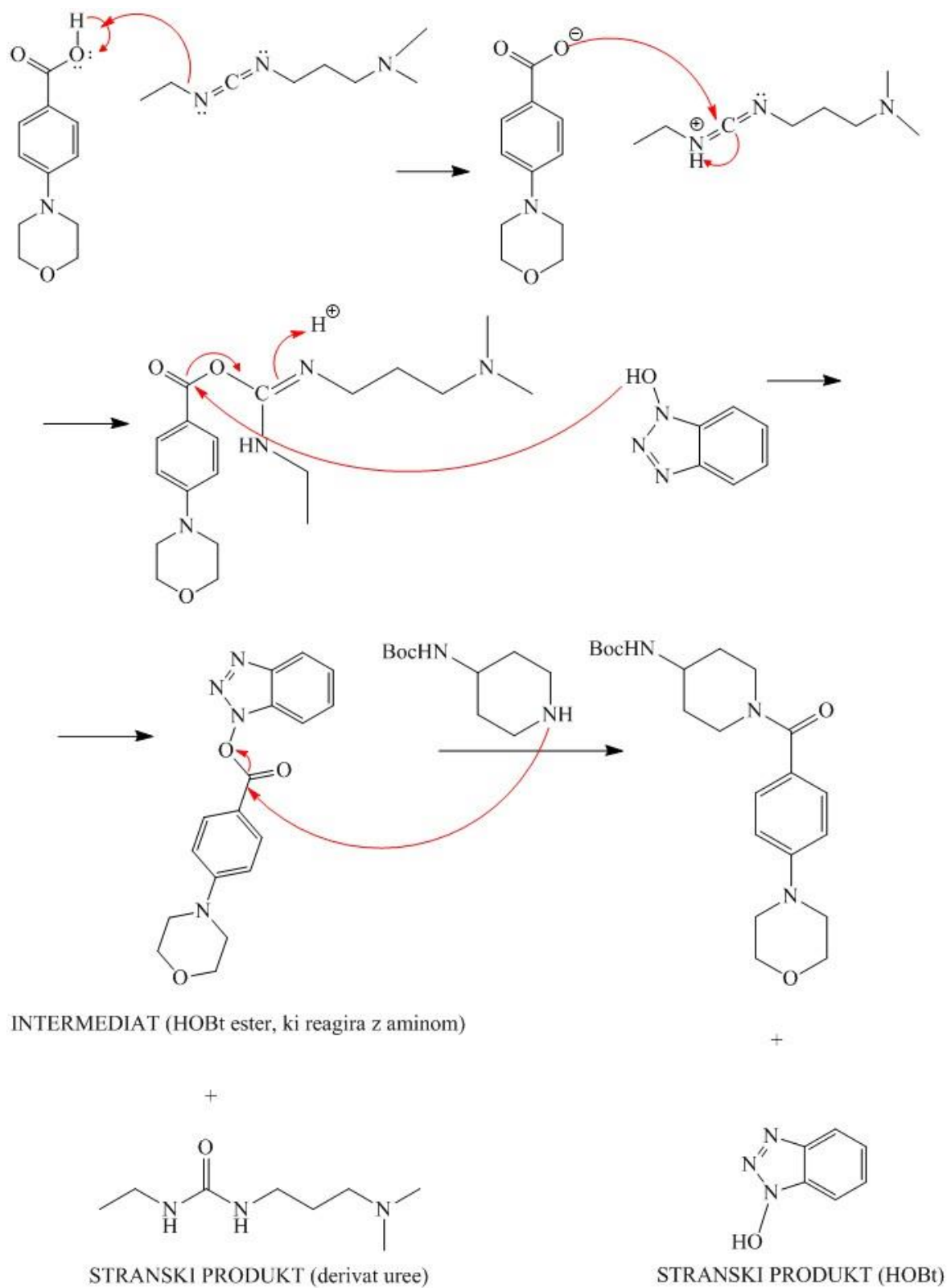
Prvi korak sinteze je bila nukleofilna substitucija na kislinskem kloridu z Boc-zaščitenim aminopiperidinom. Mehanizem reakcije je predstavljen na spodnji sliki (slika 20). V vlogi kislinskega klorida smo v vseh sintezah uporabili 4-bifenilkarbonil klorid. Prvi korak nukleofilne substitucije se začne z napadom nukleofilne aminske skupine piperidina na elektrofilni C-atom kislinskega klorida. Sledi eliminacija, kjer se tvori dvojna vez s kisikom in izstopi kloridni ion. Reakcijo smo izvedli v brezvodnem diklorometanu, dodali smo tudi bazični trietilamin. Slednjega smo dodali zato, da reagira z nastalim HCl do trietilamonijevega klorida. Reakcija je potekala na sobni temperaturi 24 ur, nato smo izvedli ekstrakcijo in spojino očistili s prekristalizacijo ter s kolonsko kromatografijo. Potek reakcije smo preverili s TLC, liso amida smo pričakovali višje, saj je bolj lipofilen od aminopiperidina. Izkoristka sintez spojin **1** in **6** sta bila dobra, vendar je bil izkoristek pri spojini **6** višji. Pri čiščenju spojine **6** smo uporabili prekristalizacijo iz EtOAc in suspendiranjem spojine v Et₂O (19, 20).



Slika 20: Mehanizem nukleofilne substitucije

5.2 Sinteza amidov iz karboksilne kisline (*N*-aciliranje)

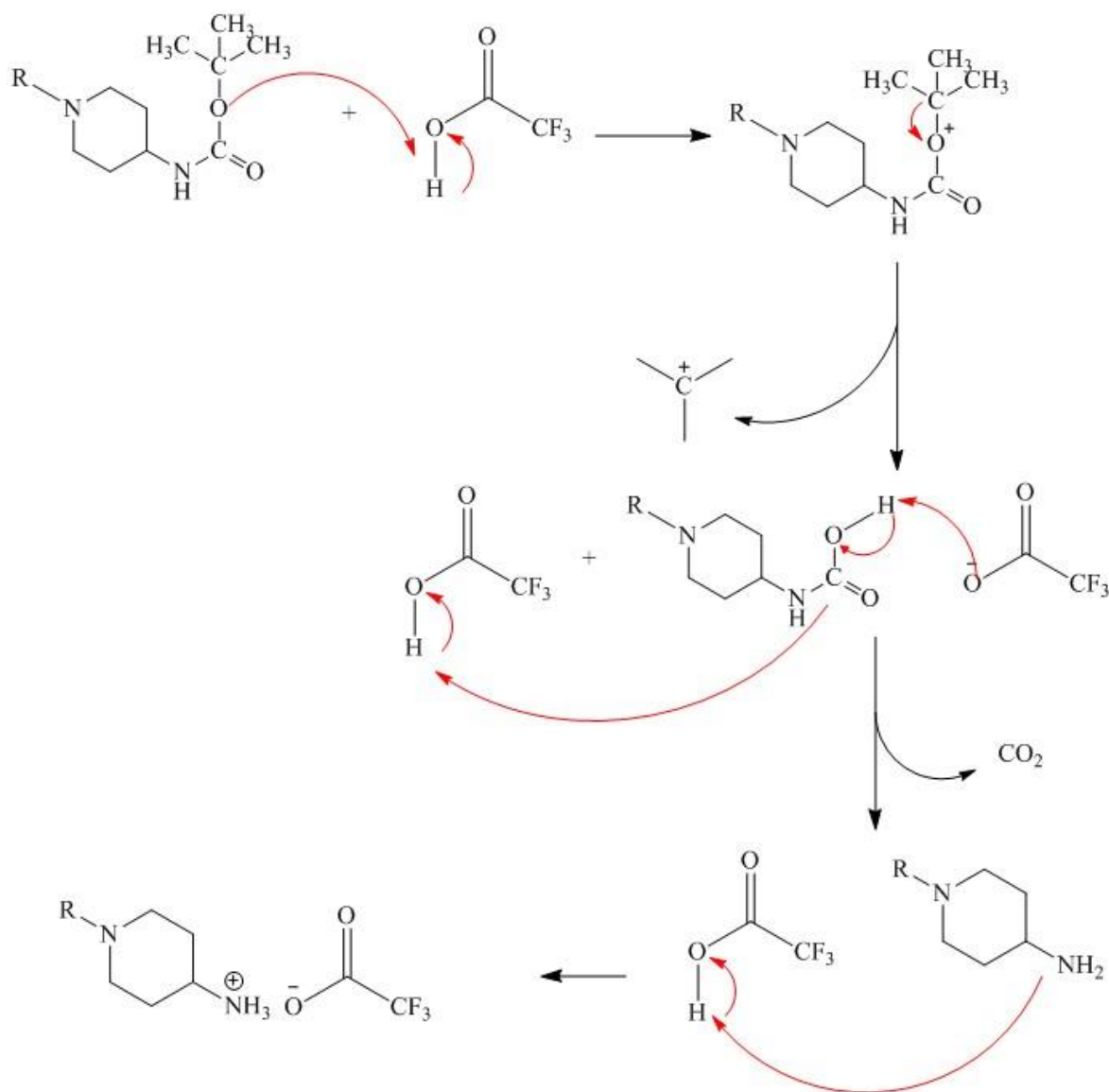
Amide smo sintetizirali z reakcijo nukleofilne substitucije med aktivirano obliko karboksilne kisline in aminopiperidinom. Direktna pretvorba karboksilne kisline v amid je problematična, saj imajo alifatski amini bazične lastnosti in lahko pretvorijo karboksilno kislino v nereaktiven karboksilatni ion. Zaradi tega in za povečanje elektrofilnosti karboksilnega ogljika smo uporabili sklopitvene reagente. Dodamo jih neposredno v raztopino zmesi karboksilne kisline in amina. Aktivirajo karboksilno kislino do intermediata z dobro izstopajočo skupino, ki nato reagira z aminom in z njim tvori amidno vez. Med najpogostejše uporabljenimi sklopitvenimi reagenti so karbodiimidi. V prvem koraku pride do deprotonacije karboksilne kisline do karboksilatnega iona, ki potem nukleofilno napade aktivirani ogljik v EDC, pri tem pride do tvorbe aktivnega derivata *O*-acilsečnine. Da se izognemo pretvorbi *O*-acilsečnine v derivat *N*-acilsečnine, dodamo v zmes še HOBt, ki prepreči racemizacijo, poleg tega pa deluje kot katalizator, saj poveča hitrost reakcije in omogoča boljše izkoristke. Amino skupina, ki ni zaščitena z Boc, je v vlogi nukleofila in napade karbonilni ogljikov atom na s HOBt aktiviranim estru ter tvori amidno vez med kislino in aminom (slika 21) (19, 21–24). Tak princip tvorbe amida smo uporabili pri sintezi spojin **10** in **14**. Uporabili smo 4-morfolinobenzojsko kislino, ki smo jo na ledeni kopeli aktivirali s sklopitvenim reagentom EDC ob dodatku HOBt. HOBt deluje kot selektivni nukleofil, ki reagira hitreje z *O*-acilsečnino in tvori ester, ki je še vedno dovolj reaktiven za tvorbo peptidne vezi z aminom. Sklopitveni reagent in 4-morfolinobenzojsko kislino smo raztopili v organskem topilu DKM in dodali še Et₃N v vlogi baze. Bazični milje je nujen za pretvorbo EDC v prosto obliko. Kot reagent je EDC v obliki soli z vodikovim kloridom in je v organskem topilu slabo topen, zato mu topnost povečamo s pretvorbo v prosto obliko. Boc-zaščiten 3- ali 4-aminopiperidin dodamo šele po 30 minutah mešanja reakcijske zmesi na ledeni kopeli, da je tvorba aktiviranega estra s HOBt končana in se tako izognemo stranskim reakcijam. Reakcija je potekala čez noč na sobni temperaturi. Reakcijski zmesi smo uparili topilo pri znižanem tlaku in zaradi bazičnih lastnosti spojin **10** in **14** raztopili v zmesi EtOAc in destilirani vodi, saj bi v primeru ekstrakcije z 10-odstotno citronsko kislino lahko tvegali izgubo produkta v citronsko kislino. Uparili smo organsko fazo in odfiltrirali izpadlo oborino. Izkoristki pri sintezi spojine **14** so bili zelo dobri (89%), medtem ko so bili pri sintezi spojine **10** bistveno slabši (57 %).



Slika 21: Mehanizem reakcije amina in karboksilne kisline s pomočjo sklopitvenih reagentov

5.3 Odstranitev Boc zaščitne skupine z acidolizo

Uporabljene izhodne spojine za nadaljnjo sintezo so imele zaščiteno amino skupino na mestu 3 oz. na mestu 4. Za zaščitne skupine je pomembno, da jih varno in enostavno pripnemo na funkcionalno skupino, da so stabilne v širokem območju reakcijskih pogojev in da se jih po potrebi enostavno odstrani. Po prvi stopnji sinteze smo se odločili odstraniti terc-butilkarbamatno zaščito. Boc-zaščitno skupino lahko odstranjujemo na več načinov, in sicer z uporabo močnih kislin, kot so trifluoroocetna kislina (TFA) v diklorometanu, trimetilsilil jodid, klorovodikova kislina (HCl) v metanolu ali v dioksanu, lahko pa uporabimo tudi acetyl klorid. Boc-zaščita je stabilna v bazičnem mediju, v prisotnosti nukleofilov in med postopkom katalitskega hidrogeniranja. Mi smo izbrali acidolizo s trifluoroocetno kislino v diklorometanu, reagentom, ki smo ga uporabili v velikem prebitku. V prvi stopnji se terc-butilkarbamat protonira, nato se odcepi stabilizirani terc-butilni karbokation. Po odcepu terc-butilnega karbokationa se tvori derivat karbamske kisline, ki pa ni stabilen in zato hitro razpade do prostega amina in ogljikovega dioksida. Reakcija poteka v kislih pogojih, zato se amin protonira in tvori sol trifluoroacetat (25, 26, 27). Celoten mehanizem reakcije je prikazan na shemi (slika 22). Reakcija je potekala pri sobni temperaturi približno 2 uri, nato smo uparili topilo pri znižanem tlaku in v enem primeru ekstrahirali surovi produkt z raztopino NaOH. Pri ekstrakciji z NaOH smo se znebili nastale soli in dobili bazično raztopino in posledično prosto bazo. V vseh drugih primerih smo po odstranitvi kisline in topila spojino suspendirali v Et₂O, da smo se znebili ostankov trifluoroocetne kisline in produkt izolirali v obliki trdnega trifluoroacetata.



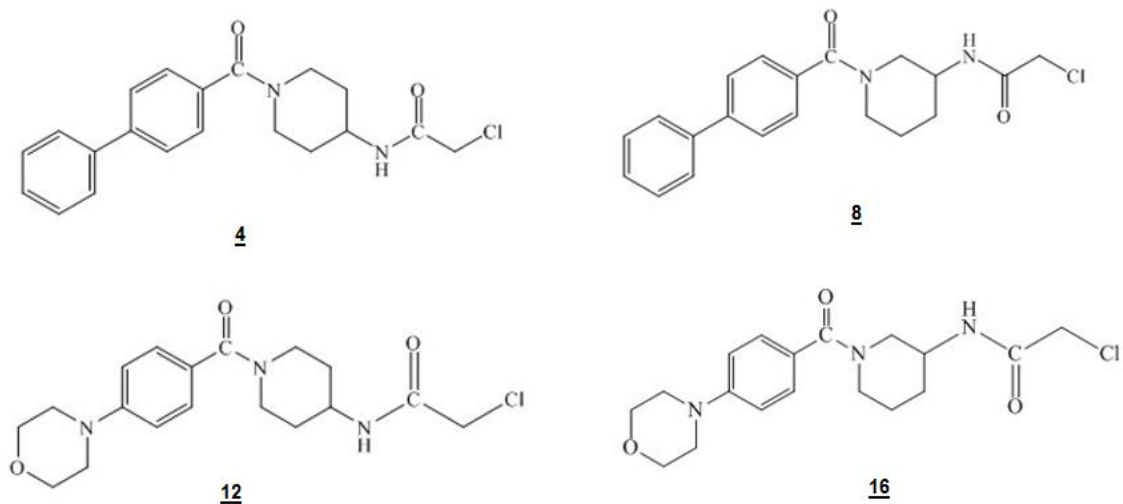
Slika 22: Mehanizem odstranitve Boc- zaščitne skupine z uporabo TFA

5.4 Uvedba elektrofilnega centra na aminopiperidinski skelet – uvedba kloroacetamidne »bojne glave«

Uspešno smo sintetizirali štiri spojine s kloroacetamidno bojno glavo, in sicer so to spojine **3**, **8**, **12** in **16** (slika 23). Vse reakcije so potekle z enakim kislinskim kloridom pod enakimi pogoji. Uporabili smo 2-kloroacetyl klorid, ki je v vlogi elektrofila, ki ga napade primarna aminska skupina, nastala po odstranitvi Boc-zaščitne skupine. Reakcija poteka po mehanizmu nukleofilne substitucije (slika 24). Pri sintezi spojin **3** in **8** smo ekstrahirali reakcijske zmesi z 10-odstotno citronsko kislino z namenom odstranitve bazičnih nečistot, te so ostanek Et₃N in nezreagiran izhodni amin. Ekstrahirali smo še z nasičeno raztopino

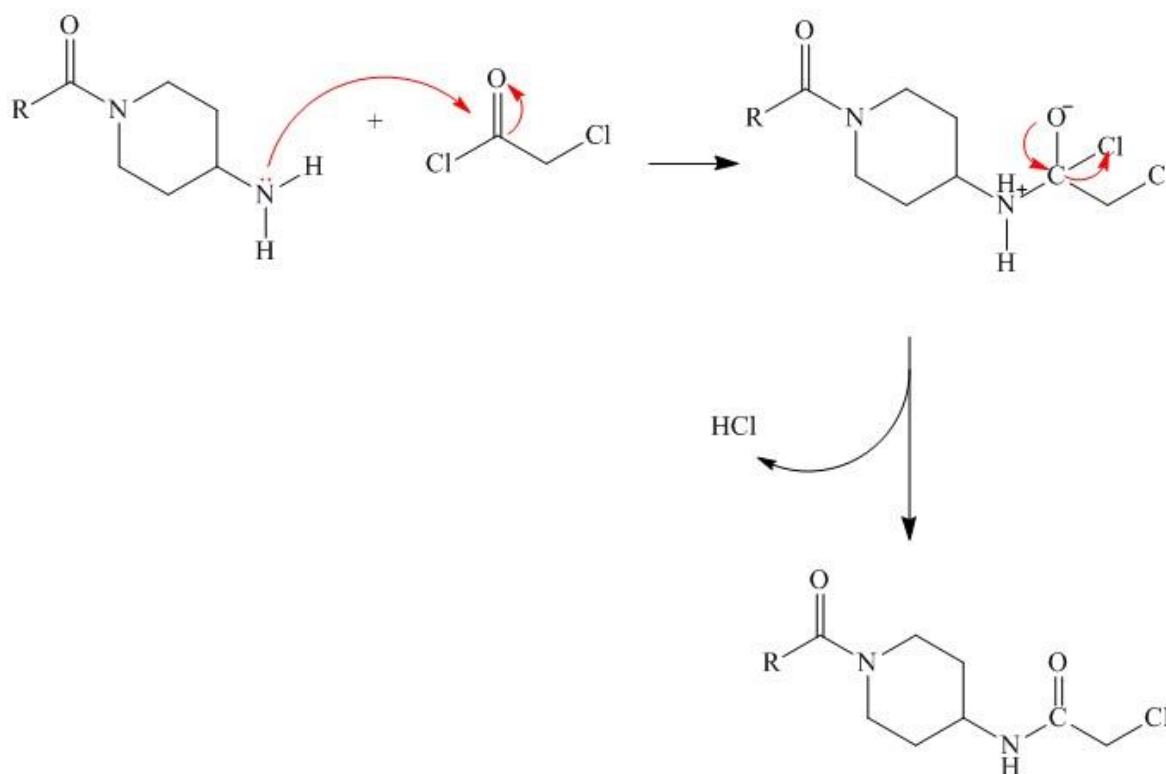
Nika Nusdorfer: Sinteza kovalentnih zaviralcev imunoproteasoma z amino-substituiranim piperidinskim obročem

NaHCO₃ in z nasičenim NaCl, da smo se znebili vode. Po dodatku sušilnega sredstva Na₂SO₄ smo uparili organsko fazo in nastalo oborino odfiltrirali. Preostanek smo suspendirali v EtOAc in pustili v hladilniku, da bi izpadlo še več čistega produkta.



Slika 23: Strukture končnih spojin pridobljenih po pripenjanju kloracetamidnega elektrofilnega centra

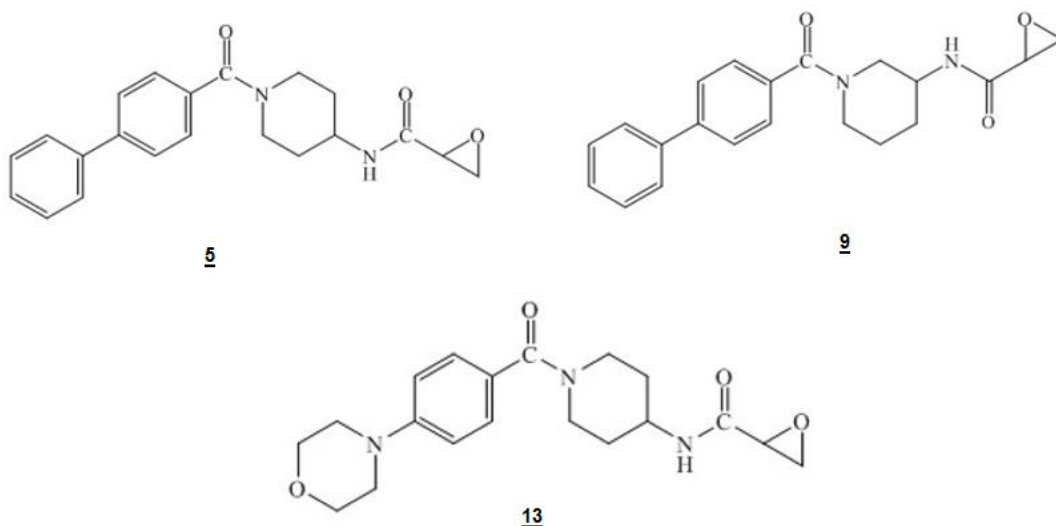
Pri sintezi spojin **12** in **16** reakcijske zmesi nismo ekstrahirali zaradi bazičnih lastnosti produkta, saj bi prehajal v kislo vodno raztopino. Po poteku reakcij smo uparili topilo in suspendirali surovi produkt v EtOAc, pri čemer je izpadla oborina. Spojine smo dodatno očistili s kolonsko kromatografijo. Izkoristek je bil najboljši pri spojinah **12** in **16**, zato sklepamo, da je bila ekstrakcija vzrok v izgubi spojin **3** in **8**. Izgube pri sintezi spojine **12** so se pojavile zaradi metode suhega nanosa vzorca na kolono.



Slika 24: Reakcija pripenjanja kloracetamidne bojne glave na aminopiperidin (prirejeno po 28)

5.5 Uvedba elektrofilnega centra na aminopiperidinski skelet – uvedba oksiran-2-karboksamidne (epoksiketonske) »bojne glave«

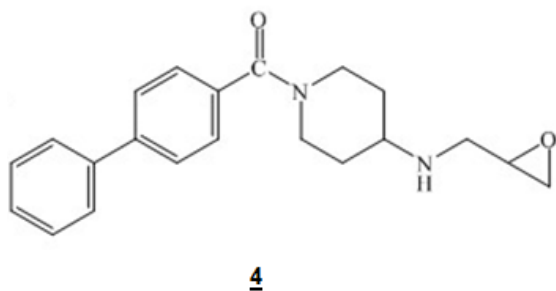
Spojnam **5**, **9** in **13** smo na aaminsko skupino uspešno pripeli elektrofilni center (slika 25). Sinteza je potekala po principu *N*-aciliranja s pomočjo sklopitvenih reagentov EDC in HOBt (slika 21). Uporabili smo reagent kalijev oksiran-2-karboksilat, ki smo mu na ledeni kopeli med mešanjem v DMF dodali sklopitvena reagentna EDC in HOBt, poleg tega smo dodali še bazo NMM, ki je poskrbela, da se je EDC nahajal v prosti obliki. Aminska skupina na aminopiperidinu je napadla karboksilni ogljikov atom reagenta, saj je slednji bolj elektrofilen kot oksiranski obroč, pripet na karboksilno kislino. Spojin **5** in **9** smo po poteku reakcije uparili DMF in ju raztopili v EtOAc ter ekstrahirali z 10-odstotno citrsko kislino, da smo odstranili nezreagirani amin in NMM. Po uparitvi topila pri spojin **9** je ob dodatku EtOAc nastala fina oborina, vendar je takoj po ekstrakciji z 10-odstotno citrsko kislino prešla v vodno fazo (sol organske baze). Ekstrahirali smo še z raztopino NaHCO_3 , da smo se znebili nezreagirane reagenta, in z raztopino NaCl , da smo odstranili zaostanek vode. Ker spojina po analizi z NMR ni bila čista, smo jo dodatno očistili s suspendiranjem v Et_2O in prekristalizacijo iz EtOAc. Z analizo TLC smo ugotovili, da spojine še vedno niso bile čiste, zato smo jih dokončno očistili s kolonsko kromatografijo.



Slika 25: Strukture končnih spojin pridobljenih s pripenjanjem epoksiketonske »bojne glave«

5.6 Uvedba elektrofilne metiloksiranske »bojne glave« na aminopiperidinski skelet

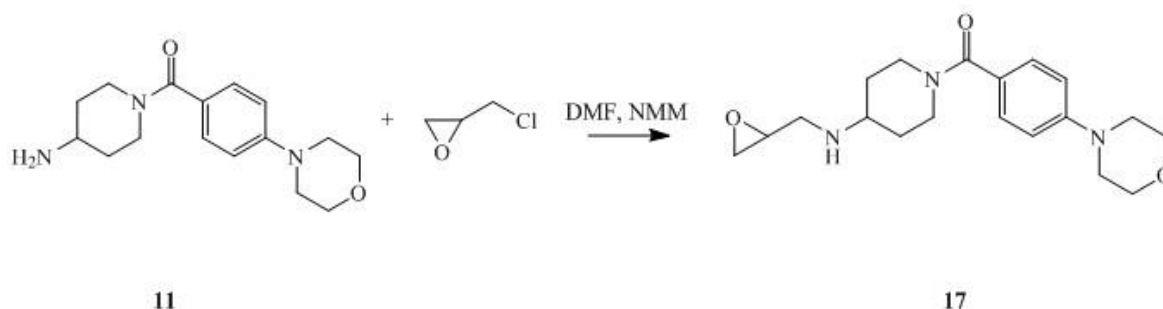
Na prosto amino skupino smo želeli pripeti metiloksiransko »bojno glavo«, vendar nam je to uspelo le pri spojini 4 (slika 26). Uporabili smo reagent epiklorohidrin, ki ima zanimive elektrofilne lastnosti, največji primanjkljaj elektronov je na ogljiku, na katerega je vezan klor. Nukleofilni amin na aminopiperidinskem skeletu napade najbolj elektrofilen ogljik na epiklorhidrinu, odcepi se kloridni ion. Sintezo smo sprva izvedli z 0,9 ekvivalenti epiklorhidrina pri sobni temperaturi. Izhodno spojino 2 smo raztopili v tetrahidrofuranu (THF) in DKM, dodali smo tudi 2 ekvivalenta bazičnega Et_3N . Baza je nevtralizirala sproščen HCl med reakcijo. Reakcijo smo pustili mešati 24 ur, vendar ni potekla, saj smo po ekstrakciji z EtOAc izolirali izhodno snov. Reakcijo smo ponovili, in sicer smo povečali množino epiklorhidrina na 1 ekvivalent, ostali pogoji reakcije so ostali enaki, vendar reakcija spet ni potekla. V tretjem poskusu smo sintezo izvedli z 1,7 ekvivalenti epiklorhidrina in 1 ekvivalentom izhodne spojine. Namesto THF in DKM smo v vlogi topila uporabili DMF, poleg tega smo dodali tudi večjo količino Et_3N (5 ekvivalentov). Reakcijo smo izvajali 24 ur pri povišani temperaturi (40 °C) na oljni kopeli. Reakcijski zmesi smo takoj uparili topilo in spojino očistili s kolonsko kromatografijo. Uspešno smo sintetizirali in očistili spojino 4.



Slika 26: Struktura končne spojine pridobljene s pripenjanjem metiloksiranskega elektrofilnega centra

5.7 Komentar neuspešnih sintez reakcij z epiklorhidrinom

Po enakem postopku, kot smo ga uporabili pri sintezi spojine **4**, smo poskusili sintetizirati spojino **17** (slika 27). V prvem poskusu smo uporabili 1 ekvivalent epiklorhidrina in reakcijo pustili mešati na oljni kopeli pri temperaturi 40 °C 48 ur. Nato smo odparili topilo pri znižanem tlaku in vzorec očistili s kolonsko kromatografijo. Po analizi z metodo NMR smo ugotovili, da smo dobili frakcijo izhodne spojine **11** in spojino, ki pa ni želeni produkt. Reakcijo smo ponovili, tako da smo povečali količino epiklorhidrina na 1,2 ekvivalenta, poleg tega je reakcija potekala 24 ur na 60 °C. Reakcijski zmesi smo odparili DMF pod znižanim tlakom in spojino raztopili v EtOAc ter jo očistili s kolonsko kromatografijo. NMR-spekter frakcije, izolirane s kolonsko kromatografijo, je nakazal nastanek neznane spojine, tako da spojine **17** nismo uspešno sintetizirali.

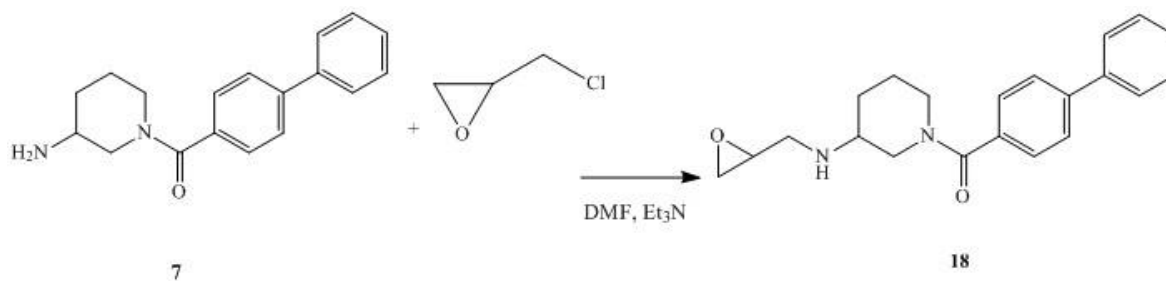


Slika 27: Shema neuspešne sinteze spojine 17

Spojino **18** smo poskušali sintetizirati po sinteznem postopku spojine **4**. Enake količine reagentov in izhodne spojine smo pustili mešati 24 ur na 40 °C, ker pa reakcija še ni potekla,

Nika Nusdorfer: Sinteza kovalentnih zaviralcev imunoproteasoma z amino-substituiranim piperidinskim obročem

smo temperaturo dvignili na 60 °C in pustili še 24 ur na oljni kopeli. Po 48 urah smo uparili topilo pri znižanem tlaku in vzorec raztopili v EtOAc ter ga očistili s kolonsko kromatografijo. Sinteza spojine **18** ni bila uspešna (slika 28).



Slika 28: Shema neuspešne sinteze spojine **18**

6 SKLEP

V okviru eksperimentalnega dela magistrske naloge smo načrtovali in sintetizirali osem novih kovalentnih zaviralcev treoninske proteaze v podenoti LMP-7 imunoproteasoma. Vsem sintetiziranim končnim spojinam je skupen aminopiperidinski skelet, ki smo mu na oba dušika pripeli različne lipofilne fragmente. Brez težav smo v prvem koraku tvorili amid s pomočjo kislinskega klorida oz. z aktiviranim derivatom morfolinobenzojske kisline. Izkoristki pri odstranitvi Boc-zaščitne skupine iz spojin so bili dobri, težave smo imeli le pri spojin 15, kjer sklepamo, da je nastala sol prešla v vodno fazo pri ekstrakciji z raztopino NaCl. Zaradi slabega izkoristka pri sintezi spojine 15 smo slednje imeli dovolj le za reakcijo pripenjanja kloroacetamidne elektrofilne glave, ostalih dveh elektrofilnih glav nismo pripeli. Uspešno smo sintetizirali štiri kovalentne zaviralce s kloroacetamidnim elektrofilnim centrom, tri z epoksiketonskim elektrofilnim centrom in enega z metiloksioranskim elektrofilnim centrom. Z biokemijskim vrednotenjem bomo preverili ali se sintetizirani kovalentni zaviralci imunoproteasoma dobro vežejo v aktivno mesto imunoproteasoma in posledično zavirajo njegovo delovanje.

Izkoristki sinteze končnih spojin s pripetimi elektrofilnimi »bojnimi glavami« so bili relativno nizki, v nekaterih primerih so nastali stranski produkti.

Vse končne spojine bodo na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo biokemijsko ovrednotili z določitvijo njihove zaviralne aktivnosti na podenoto LMP-7 imunoproteasoma.

7 VIRI

1. M. H. Glickman, A. Ciechanover: The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiol Rev* 2002; 82: 373–428.
2. D. Vilchez, I. Saez, A. Dillin: The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases. *Nature Communications* 2018.
3. W. Ding, X. Yin: Sorting, recognition and activation of the misfolded protein degradation pathways through macroautophagy and the proteasome. *Autophagy* 2008; 4: 2; 141–150.
4. J. Smalle, R. D. Vierstra: The Ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu. Rev. Plant Biol* 2004. 55: 555–90.
5. Paula C. A. da Fonseca, E. P. Morris: Structure of the Human 26S Proteasome. *Microsc Microanal* 2013; 19: 70–72.
6. N. Gallastegui, M. Groll: The 26S proteasome: assembly and function of a destructive machine. *Trends Biochem Sci* 2010; 35: 634–42.
7. K. Ferrell, C. R. M. Wilkinson, W. Dubiel, C. Gordon: Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 83–88.
8. S. H. Lecker, A. L. Goldberg, W. E. Mitch: Protein Degradation by the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Normal and Disease States. *J American Soc Nephrol* 2006; 17: 1807–1819.
9. E. M. Huber, M. Groll: Inhibitors for the Immuno- and Constitutive Proteasome: Current and Future Trends in Drug Development. *Ang Chem Int Ed*, 2012; 51: 8708–8720.
10. I. Livneh, V. Cohen-Kaplan, C. Cohen-Rosenzweig, N. Avni, A. Ciechanover: The life cycle of the 26S proteasome: from birth, through regulation and function, and onto its death. *Cell Res* 2016: 1–17.
11. D. A. Ferrington, D. S. Gregerson: Immunoproteasomes: Structure, Function, and Antigen Presentation. *Progress Mol Biol Translat Sci* 2012; 109: 75–112.
12. E. M. Huber, M. Basler, R. Schwab, W. Heinemeyer, C. J. Kirk, M. Groettrup, M. Groll: Immuno- and Constitutive Proteasome Crystal Structures Reveal Differences in Substrate and Inhibitor Specificity. *Cell* 2012; 148: 727–738.
13. M. Basler, S. Mundt, A. Bitzer, C. Schmidt, M. Groettrup: The immunoproteasome: a novel drug target for autoimmune diseases. *Clin Exp Rheumat* 2015; 33: 74–79.

14. M. Schmidt, D. Finley: Regulation of proteasome activity in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2013; 13–25.
15. G. A. Collins, A. L. Goldberg: The logic of the 26S Proteasome. *Cell* 2017; 169: 792–806.
16. Z. Miller, L. Ao, K. Bo Kim, W. Lee: Inhibitors of the Immunoproteasome: Current Status and Future Directions. *Curr Pharm Des* 2013; 19: 4140–4151.
17. P. M. Cromm, C. M. Crews: The Proteasome in Modern Drug Discovery: Second Life of a Highly Valuable Drug Target. *Am Chem Soc Publ* 2017; 3; 830–838.
18. A. V. Singh, M. Bandi, M. A. Aujay, C. J. Kirk, D. E. Hark, N. Raje, K. C. Anderson: PR-924, a selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP-7, blocks multiple myeloma cell growth both in vitro and in vivo. *Brit J Haematol* 2010; 152: 155–163
19. C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque: Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* 2005; 61: 10827–10852.
20. A. El-Faham, F. Albericio: Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Am Chem Soc Publ* 2011; 111: 6557–6602.
21. Y. Pu, R. K. Vaid, K. B. Sathish, R. W. Towsley, C. W. Doecke, D. Mitchell: A Practical Method for Functionalized Peptide or Amide Bond Formation in Aqueous-Ethanol Media with EDC as Activator. *Org Process Res Develop* 2009; 13: 310–314.
22. <https://www.peptide.com/coupling-reagents-i-414.html>, 14. 11. 2018
23. <https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/carbodiimide-crosslinker-chemistry.html>, 14. 11. 2018
24. <https://www.khanacademy.org/test-prep/mcat/chemical-processes/carboxylic-acids/a/carboxylic-acid-reactions-overview>, 14. 11. 2018
25. M. Raju, S. Mäeorg, O. Tšubrik, U. Mäeorg: Efficient solventless technique for Boc-protection of hydrazines and amines. *ARKIVOC* 2009; 6: 291–297.
26. A. Isidro-Llobet, M. Alvarez, F. Albericio: Amino Acid-Protecting Groups. *Chem Rev* 2009; 109: 2455–2504.
27. http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_TFA_Mech.htm, 14. 11. 2018
28. <https://www.chemguide.co.uk/mechanisms/addelim/amines.html>, 14. 11. 2018