

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TAMARA ŠULVIČ
MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TAMARA ŠULOVIĆ

**SINTEZA IN VREDNOTENJE ZAVIRALCEV MONOAMIN
OKSIDAZE A IN B Z N-PROPARGILPIROLIDINSKIM IN N-
PROPARGILPIPERIDINSKIM OSNOVNIM SKELETOM**

**SYNTHESIS AND EVALUATION OF INHIBITORS OF
MONOAMINE OXIDASE A AND B WITH N-
PROPARGYLPYRROLIDINE AND N-PROPARGYLPYPERIDINE
SCAFFOLD**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sove, mag. farm. Laboratorijski del magistrske naloge sem opravila na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sove, mag. farm. Meritve masne spektroskopije so bile izvedene v Centru za masno spektrometrijo Inštituta Jožef Stefan v Ljubljani.

ZAHVALA

Iskreno hvaležnost najprej dolgujem svojemu mentorju, doc. dr. Mateju Sovi, mag. farm., ki mi je s svojo strokovno pomočjo in nasveti omogočil izdelavo magistrske naloge in ker je vedno imel potrpežljivost in čas za moja številna vprašanja.

Posebej se zahvaljujem svoji celotni družini, ki me je vedno podpirala in verjela vame.

Zahvaljujem se tudi vsem svojim prijateljem, ki so bili vedno ob meni in brez katerih potek mojega študija ne bi bil tako lep in uspešen.

Veliki HVALA vsem, saj brez vas sedaj ne bi bila, kjer sem.

IZJAVA

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

Ljubljana, 2018

Tamara Šulović

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	PARKINSONOVA BOLEZEN	1
1.1.1	Definicija in etiologija Parkinsonove bolezni	1
1.1.2	Patofiziologija Parkinsonove bolezni	2
1.1.3	Patogeneza Parkinsonove bolezni	2
1.1.4	Zdravljenje Parkinsonove bolezni	3
1.2	DEPRESIJA	4
1.2.1	Definicija in etiologija depresije	4
1.2.2	Biološke teorije nastanka depresije	5
1.2.3	Zdravljenje depresije	6
1.3	MONOAMIN OKSIDAZA	7
1.3.1	Monoamin oksidaza A in B	7
1.3.2	Vloga MAO pri Parkinsonovi bolezni	8
1.3.3	Vloga MAO pri depresiji	8
1.3.4	Zaviralci MAO	9
1.3.5	Prihodnje raziskave na področju MAO	11
2	NAMEN DELA	12
3	MATERIALI IN METODE	13
3.1	MATERIALI	13
3.1.1	Reagenti	13
3.1.2	Topila	13
3.1.3	Aparature	13
3.1.4	Programska oprema	13
3.2	METODE	13
3.2.1	Kromatografske metode	13
3.2.2	Spektroskopske metode	14
3.2.3	Določanje tališča	15
3.2.4	Biološko testiranje	15
4	EKSPERIMENTALNI DEL	16
4.1	SINTEZA 1-(<i>TERC</i> -BUTOKSIKARBONIL)PIPERIDIN-4-KARBOKSILNE KISLINE (1)	16
4.2	SINTEZA <i>TERC</i> -BUTIL 4-(METOKSI(METIL)KARBAMOIL)PIPERIDIN-1-KARBOKSILATA (2)	17
4.3	SINTEZA <i>TERC</i> -BUTIL 3-(METOKSI(METIL)KARBAMOIL)PIROLIDIN-1-KARBOKSILATA (3)	18
4.4	SINTEZA TRIFENIL(4-FLUOROBENZIL)FOSFONIJEVEGA KLORIDA (4) IN (2-FLUOROBENZIL)TRIFENIL FOSFONIJEVEGA KLORIDA (5)	19
4.5	SINTEZA <i>TERC</i> -BUTIL 4-FORMILPIPERIDIN-1-KARBOKSILATA (6)	20

4.6	SINTEZA <i>TERC</i> -BUTIL 3-FORMILPIROLIDIN-1-KARBOKSILATA (7)	21
4.7	SINTEZA <i>TERC</i> -BUTIL (<i>E</i>)-4-(2-FLUOROSTIRIL)PIPERIDIN-1-KARBOKSILATA (8) IN <i>TERC</i> -BUTIL (<i>Z</i>)-4-(2-FLUOROSTIRIL)PIPERIDIN-1-KARBOKSILATA (9)	22
4.8	SINTEZA <i>TERC</i> -BUTIL (<i>E</i>)-4-(3-FLUOROSTIRIL)PIPERIDIN-1-KARBOKSILATA (10) IN <i>TERC</i> -BUTIL (<i>Z</i>)-4-(3-FLUOROSTIRIL)PIPERIDIN-1-KARBOKSILATA (11)	24
4.9	SINTEZA <i>TERC</i> -BUTIL (<i>E</i>)-4-(2-KLORO-4-FLUOROSTIRIL)PIPERIDIN-1-KARBOKSILATA (12) IN <i>TERC</i> -BUTIL (<i>Z</i>)-4-(2-KLORO-4-FLUOROSTIRIL)PIPERIDIN-1-KARBOKSILATA (13)	25
4.10	SINTEZA <i>TERC</i> -BUTIL (<i>E</i>)-3-(4-FLUOROSTIRIL)PIROLIDIN-1-KARBOKSILAT (14) IN <i>TERC</i> -BUTIL (<i>Z</i>)-3-(4-FLUOROSTIRIL)PIROLIDIN-1-KARBOKSILAT (15)	27
4.11	SINTEZA <i>TERC</i> -BUTIL 4-(2-FLUOROFENETIL)PIPERIDIN-1-KARBOKSILATA (16)	28
4.12	SINTEZA <i>TERC</i> -BUTIL 4-(3-FLUOROFENETIL)PIPERIDIN-1-KARBOKSILATA (17)	29
4.13	SINTEZA <i>TERC</i> -BUTIL 4-(2-KLORO-4-FLUOROFENETIL)PIPERIDIN-1-KARBOKSILATA (18)	30
4.14	SINTEZA <i>TERC</i> -BUTIL 3-(4-FLUOROFENETIL)PIROLIDIN-1-KARBOKSILATA (19)	30
4.15	SINTEZA (<i>E</i>)-4-(2-FLUOROSTIRIL)-1-(PROP-2-IN-1-IL)PIPERIDINA (20)	31
4.16	SINTEZA (<i>Z</i>)-4-(2-FLUOROSTIRIL)-1-(PROP-2-IN-1-IL)PIPERIDINA (21)	33
4.17	SINTEZA 1-(PROP-2-IN-1-IL)-4-(2-FLUOROFENETIL)PIPERIDINA (22)	34
4.18	SINTEZA (<i>E</i>)-4-(3-FLUOROSTIRIL)-1-(PROP-2-IN-1-IL)PIPERIDINA (23)	35
4.19	SINTEZA (<i>Z</i>)-4-(3-FLUOROSTIRIL)-1-(PROP-2-IN-1-IL)PIPERIDINA (24)	36
4.20	SINTEZA 1-(PROP-2-IN-1-IL)-4-(3-FLUOROFENETIL)PIPERIDINA (25)	37
4.21	SINTEZA (<i>E</i>)-4-(2-KLORO-4-FLUOROSTIRIL)-1-(PROP-2-IN-1-IL)PIPERIDINA (26)	39
4.22	SINTEZA (<i>Z</i>)-4-(2-KLORO-4-FLUOROSTIRIL)-1-(PROP-2-IN-1-IL)PIPERIDINA (27)	40
4.23	SINTEZA 1-(PROP-2-IN-1-IL)-4-(2-KLORO-4-FLUOROFENETIL)PIPERIDINA (28)	41
4.24	SINTEZA (<i>E</i>)-3-(4-FLUOROSTIRIL)-1-(PROP-2-IN-1-IL)PIROLIDINA (29)	41
4.25	SINTEZA (<i>Z</i>)-3-(4-FLUOROSTIRIL)-1-(PROP-2-IN-1-IL)PIROLIDINA (30)	42
4.26	SINTEZA 1-(PROP-2-IN-1-IL)-3-(4-FLUOROFENETIL)PIROLIDINA (31)	43
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	44
5.1	ZAŠČITA FUNKCIONALNE SKUPINE – I. STOPNJA	44
5.2	SINTEZA WEINREBOVIH AMIDOV – II. STOPNJA	44
5.3	REDUKCIJA DO ALDEHIDA – III. STOPNJA	45
5.4	PRIPRAVA WITTIGOVEGA REAGENTA IN WITTIGOVA REAKCIJA – VMESNA STOPNJA I IN IV. STOPNJA	45
5.5	KATALITSKO HIDROGENIRANJE – VMESNA STOPNJA II	46
5.6	ODŠČITA FUNKCIONALNE SKUPINE IN <i>N</i> -ALKILIRANJE – V. STOPNJA	47
5.7	ANALIZA Z NMR SPEKTROSKOPSKO METODO	48
5.8	REZULTATI IN KOMENTAR BIOLOŠKEGA TESTIRANJA	48
6	SKLEP	50
7	LITERATURA	51

KAZALO SLIK

SLIKA 1: PODROČJA DELOVANJA UČINKOVIN, KI SE UPORABLJAJO ZA ZDRAVLJENJE PARKINSONOVE BOLEZNI. 3-MDOPA, 3-METOKSIDOPA; 3-MT, 3-METOKSITIROZIN; COMT, KATEHOL-O-METIL TRANSFERAZA; DDC, DOPA DEKARBOKSILAZA; DOPAC, DIHIDROKSIFENILOCETNA KISLINA (PRIREJENO PO 6)	4
SLIKA 2: OKSIDATIVNA DEAMINACIJA AMINA KATALIZIRANA Z MAO IN KOFAKTORJEM FAD (PRIREJENO PO 9)	7
SLIKA 3: PREGLED ZAVIRALCEV MAO	10
SLIKA 4: SHEMA NAČRTOVANIH NOVIH POTENCIALNIH ZAVIRALCEV MAO NA OSNOVI 1-PROPARGIL-4-STIRIL PIPERIDINA	12
SLIKA 5: PRIKAZ REAKCIJE ENCIMA MAO-A/B OB PRISOTNOSTI BARVILA AMPLEX RED [®]	15
SLIKA 6: SHEMA SINTEZE SPOJINE 1	16
SLIKA 7: SHEMA SINTEZE SPOJINE 2	17
SLIKA 8: SHEMA SINTEZE SPOJINE 3	18
SLIKA 9: SHEMA SINTEZE SPOJINE 4	19
SLIKA 10: SHEMA SINTEZE SPOJINE 5	20
SLIKA 11: SHEMA SINTEZE SPOJINE 6	20
SLIKA 12: SHEMA SINTEZE SPOJINE 7	21
SLIKA 13: SHEMA SINTEZE SPOJIN 8 IN 9	22
SLIKA 14: SHEMA SINTEZE SPOJIN 10 IN 11	24
SLIKA 15: SHEMA SINTEZE SPOJIN 12 IN 13	25
SLIKA 16: SHEMA SINTEZE SPOJIN 14 IN 15	27
SLIKA 17: SHEMA SINTEZ SPOJIN 16, 17 IN 18	28
SLIKA 18: ANALIZNI PODATKI SPOJINE 18	30
SLIKA 19: SHEMA SINTEZE SPOJINE 20	31
SLIKA 20: SHEMA SINTEZE SPOJINE 21	33
SLIKA 21: SHEMA SINTEZE SPOJINE 22	34
SLIKA 22: SHEMA SINTEZE SPOJINE 23	35
SLIKA 23: SHEMA SINTEZE SPOJINE 24	36
SLIKA 24: SHEMA SINTEZE SPOJINE 25	37
SLIKA 25: SHEMA SINTEZE SPOJINE 26	39
SLIKA 26: SHEMA SINTEZE SPOJINE 27	40
SLIKA 27: SHEMA SINTEZE SPOJINE 29	41
SLIKA 28: SHEMA SINTEZE SPOJINE 30	42
SLIKA 29: MEHANIZEM ZAŠČITE AMINA Z UVEDBO BOC ₂ O (PRIREJENO PO 24)	44
SLIKA 30: SINTEZA WEINREBOVEGA AMIDA (PRIREJENO PO 26)	45
SLIKA 31: MEHANIZEM TVORBE FOSFONIJEVE SOLI IN WITTIGOVE REAKCIJE DO NASTANKA CIS IN TRANS ALKENOV (PRIREJENO PO 28)	46
SLIKA 32: SHEMATSKI PRIKAZ KATALITSKEGA HIDROGENIRANJA (PRIREJENO PO 30)	47

KAZALO TABEL

TABELA 1: ANALIZNI PODATKI SPOJINE 1	16
TABELA 2: ZATEHTE REAGENTOV PRI SINTEZI REAGENTOV PRI SINTEZI SPOJINE 2	17
TABELA 3: ANALIZNI PODATKI SPOJINE 2	18
TABELA 4: ZATEHTE REAGENTOV PRI SINTEZI REAGENTOV PRI SINTEZI SPOJINE 3	18
TABELA 5: ANALIZNI PODATKI SPOJINE 3	19
TABELA 6: ZATEHTE REAGENTOV PRI SINTEZI SPOJINE 4	20
TABELA 7: ANALIZNI PODATKI SPOJINE 4	20
TABELA 8: ZATEHTE REAGENTOV PRI SINTEZI SPOJINE 5	20
TABELA 9: ANALIZNI PODATKI SPOJINE 5	20
TABELA 10: ZATEHTE REAGENTOV PRI SINTEZI SPOJINE 6	21
TABELA 11: ANALIZNI PODATKI SPOJINE 6	21
TABELA 12: ZATEHTE REAGENTOV PRI SINTEZI SPOJINE 7	22
TABELA 13: ANALIZNI PODATKI SPOJINE 7	22
TABELA 14: ZATEHTE REAGENTOV PRI SINTEZI SPOJIN 8 IN 9 IN IZKORISTEK	23
TABELA 15: ANALIZNI PODATKI SPOJINE 8	23
TABELA 16: ANALIZNI PODATKI SPOJINE 9	23
TABELA 17: ZATEHTE REAGENTOV PRI SINTEZI SPOJIN 10 IN 11 IN IZKORISTEK	24
TABELA 18: ANALIZNI PODATKI SPOJINE 10	24
TABELA 19: ANALIZNI PODATKI SPOJINE 11	25
TABELA 20: ZATEHTE REAGENTOV PRI SINTEZI SPOJIN 12 IN 13 IN IZKORISTEK	25
TABELA 21: ANALIZNI PODATKI SPOJINE 12	26
TABELA 22: ANALIZNI PODATKI SPOJINE 13	26
TABELA 23: ZATEHTE REAGENTOV PRI SINTEZI SPOJIN 14 IN 15 IN IZKORISTEK	27
TABELA 24: ANALIZNI PODATKI SPOJINE 14	27
TABELA 25: ANALIZNI PODATKI SPOJINE 15	28
TABELA 26: ZATEHTE REAGENTOV PRI SINTEZI SPOJINE 16	29
TABELA 27: ANALIZNI PODATKI SPOJINE 16	29
TABELA 28: ZATEHTE REAGENTOV PRI SINTEZI SPOJINE 17	29
TABELA 29: ANALIZNI PODATKI SPOJINE 17	29
TABELA 30: ZATEHTE REAGENTOV PRI SINTEZI SPOJINE 18	30
TABELA 31: ANALIZNI PODATKI SPOJINE 18	30
TABELA 32: ZATEHTE REAGENTOV PRI SINTEZI SPOJINE 19	31
TABELA 33: ANALIZNI PODATKI SPOJINE 19	31
TABELA 34: ZATEHTE REAGENTOV PRI SINTEZI SPOJINE 20	32
TABELA 35: ANALIZNI PODATKI SPOJINE 20	32
TABELA 36: ZATEHTE REAGENTOV PRI SINTEZI SPOJINE 21	33
TABELA 37: ANALIZNI PODATKI SPOJINE 21	33
TABELA 38: ZATEHTE REAGENTOV PRI SINTEZI SPOJINE 22	34

TABELA 39: ANALIZNI PODATKI SPOJINE 22	34
TABELA 40: ZATEHTE REAGENTOV PRI SINTEZI SPOJINE 23	35
TABELA 41: ANALIZNI PODATKI SPOJINE 23	35
TABELA 42: ZATEHTE REAGENTOV PRI SINTEZI SPOJINE 24	36
TABELA 43: ANALIZNI PODATKI SPOJINE 24	37
TABELA 44: ZATEHTE REAGENTOV PRI SINTEZI SPOJINE 25	38
TABELA 45: ANALIZNI PODATKI SPOJINE 25	38
TABELA 46: ZATEHTE REAGENTOV PRI SINTEZI SPOJINE 26	39
TABELA 47: ANALIZNI PODATKI SPOJINE 26	39
TABELA 48: ZATEHTE REAGENTOV PRI SINTEZI SPOJINE 27	40
TABELA 49: ANALIZNI PODATKI SPOJINE 27	40
TABELA 50: ZATEHTE REAGENTOV PRI SINTEZI SPOJINE 29	41
TABELA 51: ANALIZNI PODATKI SPOJINE 29	42
TABELA 52: ZATEHTE REAGENTOV PRI SINTEZI SPOJINE 30	43
TABELA 53: ANALIZNI PODATKI SPOJINE 30	43
TABELA 54: REZULTATI BIOLOŠKEGA TESTIRANJA SPOJIN, PODANI V OBLIKI RA ENCIMA PRI 100 μ M ALI KOT VREDNOSTI IC50 (KREPKO TISKANE) ZA SPOJINE, PRI KATERIH SMO DOBILI RA<50%	48

POVZETEK

Zaviralci monoamin oksidaze (MAO) imajo kot zdravila za zdravljenje depresije dolgo zgodovino uporabe. Na samem začetku so bili v uporabi neselektivni ireverzibilni zaviralci MAO, ki pa so zaradi resnih neželenih učinkov veljali kot zdravila zadnje izbire. Sčasoma, ko so znanstveniki odkrili, da obstajata dva različna tipa encima (MAO-A in MAO-B), so razvili selektivne zaviralce MAO-B, s katerimi so zmanjšali neželene učinke in resne interakcije. Selektivni zaviralci MAO-B se uporabljajo pri zdravljenju Parkinsonove bolezni in to v začetni fazi kot monoterapija ali kot adjuvantna terapija pri bolnikih z razvitimi simptomi bolezni. Raziskovalne študije so potrdile učinkovitost in nevroprotektivne lastnosti zaviralcev MAO, hkrati pa tudi potrebe po novih zaviralcih MAO-B.

Na podlagi teh raziskav smo se odločili sintetizirati nove zaviralce MAO, ki smo jih načrtovali na osnovi znanega zaviralca MAO-B (*E*)-4-(4-fluorostiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina. Sintetizirani derivati vsebujejo propargilno skupino, ki je ključna za zaviralno delovanje na MAO-B. Pri sintezah smo uvajali različno substituiran fenilni obroč, pri določenih derivatih pa smo piperidinski obroč zamenjali s pirolidinskim. Celotni sintezni postopek je sestavljen iz 7 stopenj. Pomembna sintezna stopnja je Wittigova reakcija, s katero smo dobili *cis* (*E*) in *trans* (*Z*) spojine ter tako zagotovili selektivnost na MAO-A/B. Sintetizirali smo 10 končnih spojin, katerim smo z biokemičnim testom ovrednotili zaviralno delovanje na encim MAO-A in MAO-B. Spojina 24, *cis* izomer 4-(3-fluorostiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina, se je z vrednostjo IC_{50} 0,068 μ M izkazala kot najmočnejši zaviralec MAO-A. Najmočnejši zaviralec MAO-B pa je spojina 26, *trans* izomer 3-(2-kloro-4-fluorostiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina, z vrednostjo IC_{50} 0,42 μ M. Omenjeni spojini predstavljata odlično izhodišče za nadaljni razvoj novih zaviralcev MAO.

Ključne besede: zaviralci, monoamin oksidaza, depresija, Parkinsonova bolezen, propargilna skupina, Wittigova reakcija

ABSTRACT

Monoamine oxidase (MAO) inhibitors have a long history of use for treating depression. In the beginning, non-selective irreversible MAO inhibitors were used, however, due to serious side effects they were considered as the drugs of last resort. Over time, when scientists discovered that there are two different types of enzyme (MAO-A and MAO-B), they have developed selective MAO-B inhibitors that have reduced side effects and serious interactions. Selective MAO-B inhibitors have been used for the treatment of Parkinson's disease, in the initial phase as monotherapy or as an adjuvant therapy in patients with advanced symptoms of the disease. Research studies confirmed the efficacy and neuroprotective properties of MAO inhibitors and furthermore, the need for additional novel MAO-B inhibitors.

Based on these studies we decided to synthesize novel MAO inhibitors, which were designed from a known MAO-B inhibitor (*E*)-4-(4-fluorostyryl)-1-(prop-2-yn-1-yl)piperidine. Synthesized derivatives contain a propargyl group which is essential for MAO-B inhibitory activity. During the synthesis we introduced differently substituted phenyl rings and for the certain derivatives a piperidine ring was replaced by a pyrrolidine. The entire synthetic procedure consists of 7 steps. An important synthetic step is the Wittig reaction which gives *cis* (*E*) and *trans* (*Z*) compounds, thus providing the selectivity to MAO-A/B. We synthesized 10 final compounds which were further evaluated for their inhibitory activity on the MAO-A and MAO-B enzyme in a biochemical assay. Compound 24, *cis* isomer of 4-(3-fluorostyryl)-1-(prop-2-yn-1-yl)piperidine, with an IC₅₀ value of 0,068 μM proved to be the most potent MAO-A inhibitor. Compound 26, *trans* isomer of 3-(2-chloro-4-fluorostyryl)-1-(prop-2-yn-1-yl)piperidine, with the IC₅₀ value of 0,42 μM is the most potent MAO-B inhibitor. These two compounds represent the important starting point for further development of novel MAO inhibitors.

Keywords: inhibitors, monoamine oxidase, depression, Parkinson's disease, propargyl group, Wittig reaction

SEZNAM OKRAJŠAV

AB	Alzheimerjeva bolezen
Ach	acetilholin
AO	amin oksidaza
Boc₂O	di- <i>terc</i> -butil dikarbonat
CŽS	centralni živčni sistem
D	dopamin
DMAP	4-dimetilaminopiridin
DMSO	dimetilsulfoksid
FAD	flavin adenin dinukleotid, oksidirana oblika
FADH₂	1,5-dihidro flavin adenin dinukleotid, reducirana oblika
GABA	γ-aminobutanojska kislina oz. γ-aminomaslena kislina
HB	Huntingtonova bolezen
HOBt	N-hidroksibenzotriazol
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (<i>angl. high performance liquid chromatography</i>)
HRP	hrenova peroksidaza (<i>angl. horseradish peroxidase</i>)
IC₅₀	koncentracija zaviralca, pri kateri pride 50% zaviranja delovanja encima (<i>angl. half maximal inhibitory concentration</i>)
KHMDS	kalijev bis(trimetilsilil)amid
MAO-A	monoamin oksidaza A
MAO-B	monoamin oksidaza B
MAOI	zaviralci MAO
MAOI-A	zaviralci MAO-A
MAOI-B	zaviralci MAO-B
MF	mobilna faza
PB	paladij na aktivnem ogljiku
Pd/C	rezidualna aktivnost
RA	retencijski faktor
Rf	Parkinsonova bolezen
TBTU	<i>O</i> -(benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametilamonijev tetrafluoroborat
THF	tetrahidrofuran
TLC	
TMS	
NA	

SSRI tankoplastna kromatografija (*angl. thin layer chromatography*)
STN tetrametilsilan
5-HT noradrenalin
selektivni zaviralec ponovnega privzema serotonin
subtalamično jedro
serotonin (5-hidroksitriptamin)

1 UVOD

Nevrodegenerativne bolezni, med katere spadajo Parkinsonova bolezen (PB), Alzheimerjeva bolezen (AB), multipla skleroza in Huntingtonova bolezen (HB), so neozdravljive bolezni živčnega sistema. Te bolezni napadajo živčne sisteme, ovirajo in omejujejo njihovo delovanje ter močno vplivajo na kakovost življenja. V današnjem času so pogoste, med drugim tudi zato, ker se je življenska doba človeka podaljšala (tako je npr. pri Parkinsonovi bolezni). (1) Vzroki so številni in še niso dovolj pojasnjeni – od priona, vnetja, travme, neravnovesja živčnih prenašalcev, avtoimunskih napak, genetske predispozicije, do onesnaženosti okolja in akumulirane oksidativne škode. Zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni je zapleteno, saj za razliko od večine drugih celic nevronov ni mogoče deliti in ni mogoče ustvariti novih nevronov, s katerimi bi nadomestili poškodovane. Zdravilo za te bolezni ne obstaja, mogoče je le upočasniti njihov nadaljnji razvoj.

Zaviralci MAO se v redni praksi uporabljajo za zdravljenje PB, večinoma v zgodnji fazi bolezni. Nekatere študije potrjujejo tudi potencial zdravljenja AB in HB z zaviralci MAO. (2, 3) Zaviralci MAO so se začeli uporabljati predvsem za zdravljenje depresije. Zanimivo je, da 50% bolnikov s PB zbolijo tudi za depresijo. (4) Depresijo in PB ter zaviralce MAO in njihovo vlogo v zdravljenju bomo podrobneje razložili v nadaljevanju.

1.1 PARKINSONOVA BOLEZEN

1.1.1 Definicija in etiologija Parkinsonove bolezni

Parkinsonova bolezen je kronično napredujoča nevrodegenerativna bolezen, ki vpliva predvsem na motoriko. Razvoj PB je posledica napredujočega propadanja dopaminskih nigro-striatnih nevronov, kar vodi do pomanjkanja dopamina v subkortikalnem možganskem jedru. Med glavne simptome prištevamo parkinsonski tremor, mišično rigidnost ter upočasnjenost ali nezmožnost izvajanja gibov; pridružijo pa se lahko, še drugi simptomi, kot so na primer depresija, demenca, vegetativne motnje in motnje spanja. Ločimo tri oblike PB: primarna idiopatska oblika, ki je najpogostejša oblika; juvenilna oblika, ki je redkejša in se pojavi pred 40. letom ter ima hujše posledice in pa tretja oblika, ki je poznana kot sekundarni parkinsonizem. (1)

Etiologija PB ni popolnoma raziskana in pojasnjena. Domneva se, da lahko nastanek bolezni sproži (eden ali) več dejavnikov. Predpostavlja se, da gre za interakcijo genetskih in okoljskih dejavnikov, ki pripelje do motnje funkcije mitohondrijev s posledičnem nastankom radikalov, ter oksidativnega stresa, kar pripelje do nevrodegeneracije. PB se redko pojavlja dedno, bolj sporadično. (5) Odkritih je pet genov, za katere se domneva, da so povezani s PB: SNCA (PARK1), PARK2, PINK 1 (PARK6), PARK7 in LRRK2 (PARK8). (4, 5) Z gotovostjo pa je potrjena verjetnost povezave med tvorbo PB in pesticidi ter kajenjem. (4)

1.1.2 Patofiziologija Parkinsonove bolezni

Patološki proces PB se začne v bazalnih ganglijih. (5) Ekstrapiramidni motorični sistem, povezava možganska skorja-bazalni gangliji-talamus-možganska skorja, ima za glavno funkcijo kontrolo in regulacijo gibov. (1) V možganih je pomembno ravnotežje med živčnimi prenašalci, ker predstavljajo poti v striatumu. Dopamin v ekstrapiramidnem sistemu deluje po dveh poteh, ki se razlikujeta po načinu povezovanja striatuma in globus palidus internusa. Direktna pot (monosinaptična) izhaja v striatumu in vodi do substance nigre retikulate in globus palidus internusa. Indirektna pot (polisinaptična) vključuje še globus palidus eksternus in subtalamično jedro (STN). Dopamin iz nigrostriatnih nevronov v striatumu preko dopaminskih receptorjev D₁ spodbuja nevrone direktne poti, preko dopaminskih receptorjev D₂ pa zavira nevrone indirektno poti. (1, 4) Z izgubo dopamina je direktna pot manj sposobna funkcionirati in začeti premike, indirektna pot pa je preveč aktivna, kar povzroči preveč blokad gibanja. (4)

1.1.3 Patogeneza Parkinsonove bolezni

Pri tipičnih nevropatoloških izvidih osebe s PB najdemo Lewyjeva telesca, ki so sferični agregati beljakovin (večinoma alfa-sinuklein) znotraj živčnih celic. Najdemo jih pri idiopatskem tipu, ne pa pri sekundarnem parkinsonizmu. Bolezen se manifestira, ko je pomanjkanje dopaminergičnih nevronov STN 60-80%.

Študija Braaka in sodelavcev je potrdila, da gre za multisistemsko degeneracijo, ki poteka skozi šest stopenj. V prvi stopnji nastajajo Lewyjeva telesca in propad nevronov v jedru olfaktornega bulbosa (hiposomija). Druga stopnja zajema spremembe v locusu ceruleusu, meduli oblongati in ponsu (motnje spanja). Pri tretji in četrti stopnji se nevrodegeneracija širi v STN, jedro pedunculo-pontina, jedro dorzalne rafe in hipotalamus. Peta in šesta

stopnja vključujeta neokortikalne regije možganov in v tej fazi bolniki lahko razvijejo demenco. Bolezen se klinično manifestira z motoričnimi simptomi v tretji stopnji. Ko bolezen napreduje v več regij CŽS, se pojavijo motnje tudi v drugih nevrottransmiterskih sistemih – acetilholinskem, noradrenalinskem in serotoninemskem sistemu. (4, 5)

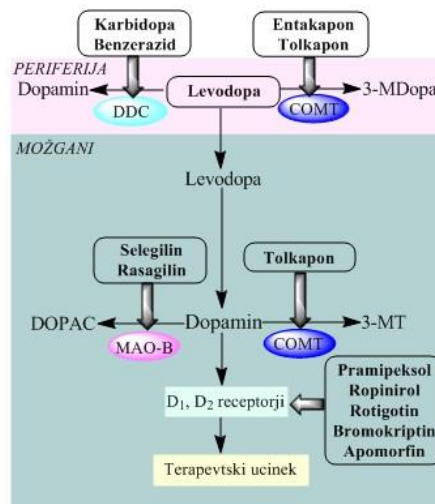
1.1.4 Zdravljenje Parkinsonove bolezni

Zdravljenje PB je simptomatsko in nevroprotektivno, usmerjeno na kontrolo motoričnih simptomov ter izboljšanje kvalitete življenja.

Zdravila, ki se uporabljajo:

- Levodopa: dopaminski prekurzor, pogosto v kombinaciji z karbidopa (periferni zaviralec dekarboksilaze) in entakapon (zaviralec katehol O-metiltransferaze);
- Agonisti dopamina: pramipeksol, ropinirol, bromokriptin;
- Apomorfin: neergotaminski agonist dopamina, predpisuje se skupaj z antiemetikom;
- Selektivni zaviralci encima MAO-B: selegilin, razagilin;
- Amantadin: šibek dopaminski agonist, ki stimulira sproščanje dopamina, šibek antagonist NMDA receptorjev, ima tudi antiholinergično delovanje;
- Antiholinergiki: antagonisti muskarinskih receptorjev: biperiden, orfenadrin, prociklidin, triheksifenidil;
- Benzodiazepini: alprazolam, kolansepam;
- Atipični nevroleptiki: kvetiapin, klozapin.

Ob medikamentnem zdravljenju PB se vedno priporoča še nevrorehabilitacija, in sicer od prvega dneva diagnoze. Mogoče so še nevralna transplatacija, genska terapija in stimulacija možganov. (5, 6)



Slika 1: Področja delovanja učinkovin, ki se uporabljajo za zdravljenje Parkinsonove bolezni. 3-MDopa, 3-metoksidopa; 3-MT, 3-metoksitirozin; COMT, katehol-O-metil transferaza; DDC, dopa dekarboksilaza; DOPAC, dihidroksifenilacetna kislina (prirejeno po 6)

1.2 DEPRESIJA

1.2.1 Definicija in etiologija depresije

Termin depresija je v sindromskem pomenu opredeljen kot naziv za skupino psihičnih, psihomotornih in somatskih simptomov, ki jim je vsem skupna ena določena lastnost – patološke motnje razpoloženja (afektivne motnje). (7) Izredno pogosto je psihiatrično stanje, ki se lahko giblje od zelo blagega stanja (meji na normalno stanje) do hude (psihotične) depresije, ki jo spremljajo halucinacije in blodnje. Pogosto je povezana z drugimi psihiatričnimi stanji, vključno z anksioznostjo, motnjami prehranjevanja in odvisnostjo od drog. (6) Simptome depresije delimo na čustvene (slabo razpoloženje, nizka samozavest, apatija, anhedonija), kognitivne (pesimizem, zmanjšana koncentracija in pozornost, samomorilne misli) in biološke (utrujenost in padec energije, izguba libida, motnje spanja in izguba apetita). (8) Glede na to, da se razpoloženje spreminja v dveh smereh, in sicer bodisi v pozitivni (hipomanija, manija) ali negativni smeri (depresija), je mogoča bodisi unipolarna bodisi bipolarna depresija. Pri unipolarni depresiji (približno 75% primerov) so spremembe razpoloženja vedno v isti smeri, pri bipolarni motnji pa se depresija izmenjuje z manijo. Manija je ravno nasprotna depresiji, gre za prekomerno veselost, navdušenost in samozavest, ki jo spremljajo impulzivna dejanja, kar je pogosto povezano z razdražljivostjo, nestrpnostjo, agresijo ter včasih z velikimi deluzijami (oseba npr. misli, da je Napoleon). Obstajajo še nekatere druge delitve depresije, kot je recimo

delitev na primarno, ki se razvije brez drugih predhodnih psihiatričnih motenj, in sekundarno depresijo, ki je posledica drugega zdravstvenega stanja. (6, 7) Povprečna starost pacienta, ki je zbolel za depresijo, je bila med pacienti, starimi od 18 do 64 let, 27 let. Prevalenca depresije je nekoliko višja pri ženskah kot pri moških. Predvideva se, da so razlogi za to hormonsko stanje, porod in dojenje. (8)

Etiologija depresije še vedno ni znana. Jasno je, da so biološki in psihosocialni dejavniki medsebojno prepleteni in povezani s patogenezo depresivne motnje. Znanstveniki so razvili več teorij nastanka depresije, ki jih lahko razdelimo na biološke, psihološke in socialne teorije. Mi se bomo osredotočili na biološke teorije. (7)

1.2.2 Biološke teorije nastanka depresije

Včasih se je kot vir impulza nagonsko-afektivne narave upošteval izključno diencefalon, še posebej hipotalamus, danes pa se v procesu usklajevanja afektivnega življenja (zlasti čustvenega) pripisuje izredno pomembna vloga rinencefalonu oziroma limbičnem sistemu. Zaradi tega se visceralni možgani imenujejo tudi afektivni možgani. Poškodbe teh struktur kakršnekoli narave (travmatske, toksične ali druge) pripeljejo do različnih sprememb v nagonsko afektivnem življenju (nevroanatomija depresije). Domneva se, da tudi endokrini dejavniki, kot so hormoni ščitnice, hipofize, nadledvične žleze in gonad (nevroendokrinološka hipoteza), vplivajo na nastanek depresije. Pomemben vpliv na nastanek depresije imajo zagotovo genetski dejavniki. (7) Družinske raziskave kažejo, da je relativno tveganje za nastanek depresije 2 do 3-krat večje za biološko potomstvo v prvem kolenu. Raziskave na enojajčnih in dvojajčnih dvojčkih kažejo, da se depresija podeduje v 33% do 70% ne glede na spol. Danes se najbolj raziskujejo polimorfizmi, kot je polimorfizem gena BDNF Val66Met (*angl. brain-derived neurotrophic factor*) in polimorfizem serotoninskega transporterja 5-HTTLPR (*angl. serotonin-transporter-linked polymorphic region*). (8) Ena od teorij, ki se ji v zadnjem času nameni veliko pozornosti, je monoaminska (kateholaminska) hipoteza afektivne motnje. Monoaminska teorija depresije, ki jo je 1965 leta predlagal Schildkraut, navaja, da je depresija posledica funkcionalnega primanjkljaja monoaminskih prenašalcev noradrenalina (NA) in serotonina (5-HT) na določenih mestih v možganih, medtem ko manija izhaja iz funkcionalnega presežka; (6) vendar številne študije depresivnih bolnikov niso potrdile sprememb v delu ali ravni monoaminov, kar je eden od primanjkljajev monoaminske hipoteze. Ostale poznane hipoteze so nevrotrofna hipoteza (povezuje monoamine, učinke antidepressivov in

nevroendokrinološko teorijo), glutamatna hipoteza, motnje biološkega ritma in citokinska hipoteza. (8)

1.2.3 Zdravljenje depresije

Antidepresivni psihofarmaki so bili odkriti leta 1957, ko je bilo ugotovljeno antidepresivno delovanje dveh kemijsko različnih zdravil, imipramina in iproniazida. Od takrat imamo v praktični uporabi številne druge psihofarmake. Glede na kemično sestavo jih delimo na ciklične in zaviralce MAO. Triciklični antidepresivi pripadajo prvi generaciji, druga generacija pa so mono-, bi- in tetra- ciklični antidepresivi. Z biološkim raziskovanjem depresije so se razvili antidepresivi tretje generacije, prekursorji in selektivni zaviralci ponovnega privzema. V širši koncept antidepresivov spadajo še nevroleptiki in anksiolitiki z antidepresivnim delovanjem, pa tudi soli litija, ki delujejo antimanično in tudi preventivno. (7)

Pregledna delitev antidepresivov:

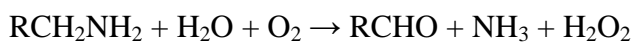
- **Zaviralci privzema monoaminov:**
 - selektivni zaviralci ponovnega privzema 5-HT (SSRI) - fluoksetin, fluvoksamin, paroksetin, sertralin, citalopram, escitalopram, vilazodon;
 - klasični triciklični antidepresivi (TCA) - razlikujejo se glede na njihovo jakost in selektivnost zaviranja ponovnega privzema NA in 5-HT: imipramin, desipramin, amitriptilin, nortriptilin, klomipramin;
 - kombinacija zaviralcev ponovnega privzema NA in 5-HT – venlafaksin, desvenlafaksin, duloksetin;
 - zaviralci ponovnega prevzema NA - bupropion, reboksetin, atomoksetin;
 - zeliščni pripravki šentjanževke, katere glavna zdravilna učinkovina je hiperforin.
- **Antagonisti receptorjev za monoamine** – neselektivni, antagonistični učinek na α_2 adrenergičnih in 5-HT₂ receptorjih. Lahko imajo tudi šibke učinke na privzem monoamina: mirtazapin, trazodon, mianserin.
- **Zaviralci monoamin oksidaz:**
 - ireverzibilni nekompetitivni zaviralci – neselektivni: fenelzin, tranilcipromin;
 - reverzibilni MAO-A selektivni zaviralci – moklobemid.

- **Agonist receptorjev za melatonin** – agomelatin, agonist pri MT₁ in MT₂ melatoninskih receptorjih in šibek antagonist 5-HT_{2C}. (6)

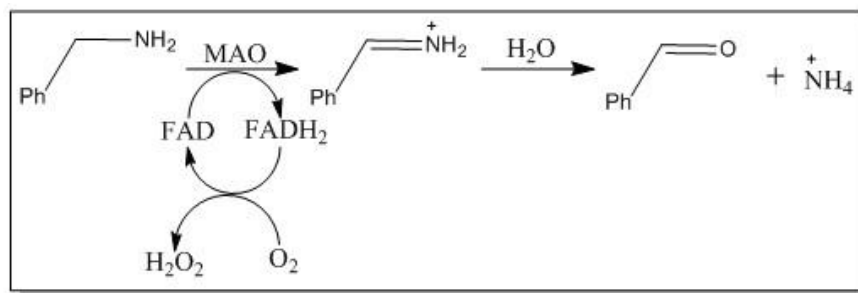
1.3 MONOAMIN OKSIDAZA

1.3.1 Monoamin oksidaza A in B

Amin oksidaze so encimi, ki katalizirajo oksidacijo aminov do aldehydov in amoniaka (deaminacija) in se glede na vsebujoče kofaktorje, baker in flavin adenin dinukleotid (FAD) delijo v dva razreda, pri čemer encimi MAO pripadajo drugemu razredu (vsebujejo FAD).



Mehanizem MAO pri katalizi deaminacije se začne z oksidativno cepitvijo α -CH vezi substrata do iminov. Pri tem ima FAD ključno vlogo, ker sprejme protone iz amina, kar pomeni, da FAD preide v reducirano obliko FADH₂. Nadalje se intermediat imin ob prisotnosti vode hidrolizira v aldehyd in amoniak. Sočasno se kisik reducira v peroksid ob reakciji s FADH₂, ki potem preide nazaj v svojo oksidirano obliko. (9) V primeru, da se peroksid ne metabolizira s superoksid-dismutazo, katalazo ali glutation peroksidazo, lahko podleže Fentonovi reakciji, s čimer nastanejo hidroksilni radikali, ki lahko sprožijo peroksidacijo lipidov in celično smrt, kar vodi do nevroloških motenj. (10)



Slika 2: Oksidativna deaminacija amina katalizirana z MAO in kofaktorjem FAD (prirejeno po 9)

Encimi MAO se nahajajo na zunanji mitohondrijski membrani. Obstajata dve izoobliki MAO-A in MAO-B, ki sta kodirani z ločenimi geni, ki se nahajajo na kratki roki X kromosoma. Izooblike se razlikujejo v tridimenzionalni strukturi ter imajo podobno (73%) aminokislinsko zaporedje. (3, 10) MAO-A se med razvojem pojavi prej, vendar se raven MAO-B po rojstvu povečuje v možganih, kjer njegova aktivnost tudi prevladuje. Na

splošno se razporeditev encimov MAO razlikuje po tkivih, največjo koncentracijo ima v jetrih. (10, 11, 12) Obe izoobliki enako vežeta dopamin in tiramin, vendar ima MAO-A večjo afiniteto do večjih hidroksiliranih aminov, kot so serotonin, epinefrin, noradrenalin, normetanepirin, oktopamin, MAO-B pa do manjših nehidroksiliranih aminov, kot so benzilamin, fenetilamin in *N*-metilhistamin. (13, 14) Razlog različnih interakcij obeh izoencimov s substrati in zaviralci lahko najdemo v njihovih kristalnih strukturah. V kristalni obliki se MAO-A nahaja kot monomer, MAO-B pa kot dimer. Aktivno mesto MAO-A je sestavljeno iz ene votline blizu površine membrane, medtem ko je aktivno mesto MAO-B sestavljeno iz dveh ločenih votlin. Votline so definirane kot „vhodna votlina“ s prostornino 290 Å³ in „substratna votlina“ s prostornino 420 Å³. Ločuje jih stranska veriga Ile 199, ki služi kot „vratar“ ter obstaja bodisi v „odprti“ ali „zaprti“ konformaciji. Vendar lahko Ile 199 ob vezavi večjih ligandov zavzame alternativno konformacijo, ki omogoča zlitje obeh votlin. (9, 15, 16) Manjše aktivno mesto MAO-B omogoča vezavo manjših hidrofobnih molekul, tako da je dostop večjih hidroksiliranih aminov, kot je 5-HT, omejen. Pri MAO-A je to mogoče, ker ima široko aktivno mesto, ki omogoča vezavo večjih MAO-A selektivnih substratov. (10)

1.3.2 Vloga MAO pri Parkinsonovi bolezni

Za PB je značilna progresivna izguba dopaminergičnih nevronov v substanci nigri, izčrpanost DA v striatumu, abnormalne mitohondrijske in proteasomske funkcije ter kopičenje α -sinukleina. Znanstveniki domnevajo, da je povečanje koncentracije DA in dopaminergična nevrodegeneracija povezana z oksidativnim stresom, ki izhaja iz povečane proizvodnje H₂O₂, ki nastane med oksidativno deaminacijo DA z MAO. Raziskave so tudi potrdile, da aktiviran MAO povzroča agregacijo α -sinukleina, kar je lahko vzrok za zgodnji parkinsonizem. Zaviranje MAO ali kelacija železa povzroča neuroprotektivne učinke. Dopaminergična celična smrt v substanci nigri je povezana z izrazitim znižanjem glutaciona in disfunkcijo mitohondrijev. Ta dejstva kažejo, da je MAO vpleten v nevrodegenerativno patogenezo PB, ki se kaže kot povečan oksidativni stres in glavno poslabšanje poti glutaciona. (2)

1.3.3 Vloga MAO pri depresiji

Z odkritjem antidepresivnega učinka zaviralcev MAO so se znanstveniki osredotočili na možnost, da bi lahko spremenjene vrednosti izražanja encimov MAO povzročile nekatere oblike depresivnih motenj. Polimorfizmi gena MAO-A so povezani s številnimi

vedenjskimi lastnostmi. Zmanjšana encimska aktivnost je povezana z nasilnim vedenjem in agresijo, medtem ko je prekomerna ekspresija lahko povezana z depresijo. Ta dejstva skupaj s hipotezo biogenih aminov (kateholaminska h.) zagotavljajo teoretično podlago za uporabo zaviralcev MAO za zdravljenje afektivnih motenj. Vrednosti ravni izražanja MAO-A, ki so jih določili z raziskovalno študijo pri bolnikih z mejno motnjo osebnosti, so bile v korelaciji z resnostjo simptomov. Zanimivo je, da se je celotna ekspresija MAO-A v prefrontalni skorji in prednjem cingularnem korteksu pri bolnikih s hudo mejno motnjo osebnosti v primerjavi s kontrolno skupino povečala za 43% oziroma 42%. (14) Takšno zvišanje aktivnosti MAO bi lahko privedlo do zmanjšanja sinaptičnih ravni DA, NA in 5-HT. Starim podganam se aktivnost MAO-A eksperimentalno zviša z dajanjem glukokortikoidov, kar podpira idejo, da stres, ki poveča izločanje glukokortikoidov, lahko povzroči povečanje MAO-A pri ljudeh in v skladu s kateholaminsko hipotezo depresije posledično zmanjša sinaptične ravni monoaminskih živčnih prenašalcev. (10)

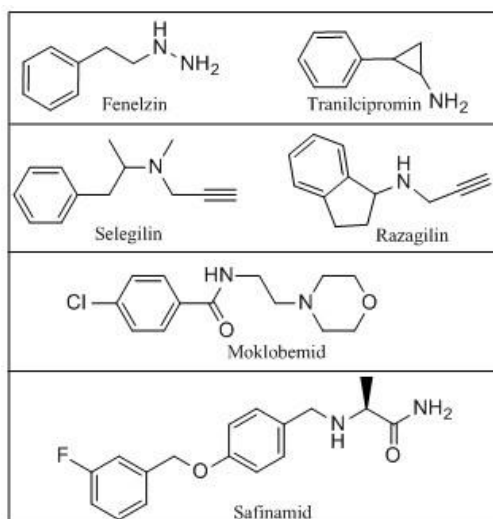
1.3.4 Zaviralci MAO

Zaviralce MAO, ki so v klinični praksi, lahko razdelimo v tri skupine:

- Ireverzibilne neselektivne MAOI – fenelzin, tranilcipromin
- Ireverzibilni selektivni MAOI-B – selegilin, razagilin
- Reverzibilni selektivni MAOI-A – moklobemid (17)

Čeprav ireverzibilni zaviralci kažejo visoko učinkovitost, manjšo farmakokinetično občutljivost, ter daljše trajanje delovanja, imajo reverzibilni zaviralci varnejši profil. (18) Zdravniki se zaradi neželenih učinkov izogibajo predpisovanju MAOI. Resni neželeni učinki pri MAOI so izredno redki, tiste, ki so pogosti, neugodni in življenjsko neogrožujoči pa se lažje prenaša. (12, 13) Toksičnosti, ki do povezane z zaviralci MAO, so predvsem serotoninški sindrom in „efekt sira“. Serotoninški sindrom je rezultat kombinacije MAOI-A in zdravila, kot je fluoksetin (SSRI), ali tricikličnih antidepresivov (neselektivni zaviralci ponovnega privzema serotonina). Značilni simptomi so zmedenost in vznemirjenost, nevromuskularna in avtonomna hiperaktivnost, vključno s hiperpireksijo. Hipertenzivna reakcija, ki je poimenovana kot „efekt sira“, nastane zaradi tiramina (nahaja se v siru, ter fermentiranih in prezrelih živilih), ki se ne metabolizira zaradi zaviranja MAO. Tiramin nato kroži v perifernem tkivu, kjer lahko deluje na povečano sproščanje norepinefrina, kar povzroči nenadno povišanje krvnega pritiska. V primeru upoštevanja omejitev pri prehrani

in zdravilih najverjetneje ne bi prišlo do takšnih reakcij. Nekateri MAOI povzročajo znatno povečanje telesne mase, kar mnoge paciente odvrača od njihove uporabe. V povprečju se bolj pojavlja pri uporabi fenelzina kot tranilcipromina, vendar je težko oceniti dejavnike, ki vplivajo na povečanje telesne mase pri depresivnih bolnikih. (10, 13) Selegilin, ki se redno uporablja v terapiji PB, ima za metabolite L-amfetamin in L-metamfetamin, ki so manj psihoaktivni kot njihovi D-enantiomeri, vendar lahko povzročijo kardiovaskularne težave in v večjih koncentracijah povečajo stopnjo apoptoze. V primerjavi s selegilinom, je razagilin močnejši in bolj selektiven MAOI-B ter nima amfetaminu podobnih metabolitov. Študije so tudi pokazale, da razagalin zaradi propargilaminske skupine deluje neuroprotektivno. (19) Glede reverzibilnih MAOI-A se pojavlja vprašanje, če imajo antidepresivni učinek tudi pri odmerkih, ki ne povzročajo „efekta sira“. V študijah je moklobemid pokazal antidepresiven učinek podoben tricikličnim antidepresivom in boljše prenašanje v primerjavi s tricikličnimi antidepresivi in SSRI, vendar v primerjavi z neselektivnimi MAOI je manj učinkovit. (10) Edini reverzibilni MAOI-B, ki je bil 2014 v kliničnem preizkušanju ter ga je 2015 odobrila Evropska agencija za zdravila (EMA), je safinamid. (20) Safinamid ima linearno strukturo, ki omogoča, da se prilega v obe votlini (vhodno in substratno) encima MAO-B, kar omogoča visoko stopnjo selektivnosti in afiniteto za MAO-B. Poleg zaviranja MAO ima spojina tudi dodatne farmakološke lastnosti, kot so zaviranje napetostno odvisnih natrijevih in kalcijevih kanalčkov ter zaviranje glutamatergičnega prenosa, kar omogoča neuroprotektivne lastnosti. (10, 14)



Slika 3: Pregled zaviralcev MAO

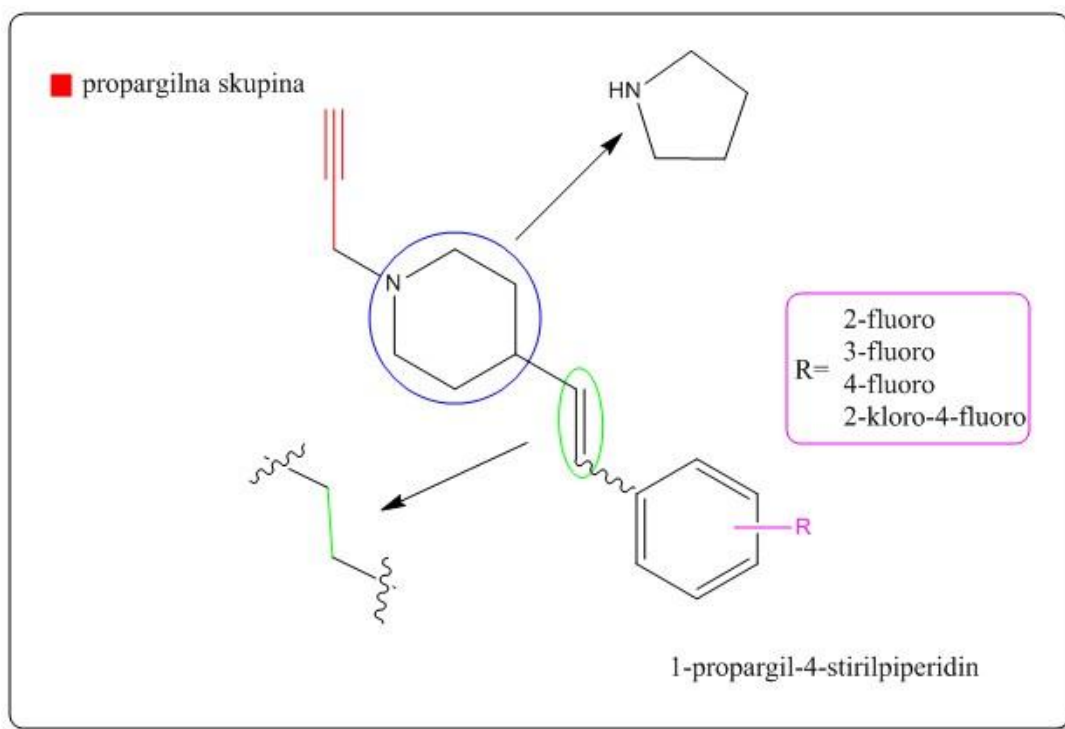
1.3.5 Prihodnje raziskave na področju MAO

Zaviralci MAO-A in MAO-B imajo širok spekter terapevtskih možnosti. Nekateri se kažejo kot koristni za zdravljenje specifičnih nevrodegenerativnih motenj, kapi in zlorabe drog v samostojni obliki ali v kombinaciji z drugimi zdravili. Pravzaprav je njihova večplastna narava lahko prednost, ki jih dela primerne za zdravljenje večih motenj. Nove administrativne poti ter predzdravila odpirajo obetavne poti za razvoj selektivnih MAOI, ki ne bodo povzročali „efekta sira“. Razvoj zdravil, ki združujejo več vrst aktivnega delovanja in so morda učinkoviti za več kot eno bolezen, je lahko koristen pri zdravljenju nevropsihiatričnih in nevroloških motenj; kombinacije zdravil na podlagi mehanizmov pa lahko izboljšajo učinkovitost pri PB in drugih boleznih. Dosedanje raziskave so pokazale, da je nevroprotektivno delovanje MAOI kompleksno in v nekaterih primerih neodvisno od zaviranja MAO. MAOI so prispevali k razumevanju mehanizmov, ki so povezani z nevroprotekcijo, in so zagotovili nadaljnji razvoj nevroprotektivnih zdravil. (10, 21)

2 NAMEN DELA

Veliko študij potrjuje potrebe po novih zaviralcih MAO, predvsem zaradi nevroprotektivnih lastnosti. Trenutno je velik interes po selektivnih zaviralcih MAO-B kot potencialnih zdravilih za zdravljenje nevroloških motenj.

Ravno iz teh razlogov se bomo v magistrskem delu osredotočili na sintezo novih spojin, ki bi selektivno zavirale MAO-A in MAO-B. Spojine, ki bodo predmet sinteze, so bile načrtovane na osnovi zaviralca MAO-B (*E*)-4-(4-fluorostiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina. Kot osnovni del strukture nam bo služil 1-propargil-4-stirilpiperidin, pri katerem pa bomo piperidinski obroč zamenjali s pirolidinskim (slika 4). Obdržali bomo propargilni fragment, ki je pomemben za zaviralno delovanje spojin na encim MAO. Ob prisotnosti dvojne vezi v strukturi je možna *cis* in *trans* konfiguracija, ki vpliva na selektivnost MAO-A/B. Pripravili bomo *cis*, *trans* in tudi reducirane derivate s piperidinskim in pirolidinskim obročem in primerjali jakost delovanja in selektivnost MAO-A/B. Na aromatski obroč bomo uvajali tudi različne substituentne na različnih pozicijah (slika 4). Končne sintetizirane spojine bomo ovrednotili in testirali njihovo zaviralno delovanje na MAO-A in MAO-B.



Slika 4: Shema načrtovanih novih potencialnih zaviralcev MAO na osnovi 1-propargil-4-stiril piperidina

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

Topila, reagente, sušilna sredstva in pline, ki smo jih uporabljali pri eksperimentalnem delu, smo pridobili od proizvajalcev Acros Organics (Belgija), Carlo Erba (Italija), Gram-Mol in Kemika (Hrvaška), Merck (Nemčija), Sigma-Aldrich (ZDA).

3.1.1 Reagenti

Boc₂O, piperidin-3-karboksilna kislina, TBTU, HOBt, *N,O*-dimetilhidroksilamin hidroklorid, trietilamin, 4-fluorobenzilklorid, trifenilfosfin, LiAlH₄, NaHCO₃, KHMDS, Pd/C, K₂CO₃, propargilbromid.

3.1.2 Topila

Dioksan, 1M NaOH, dietileter, etilacetat, diklormetan, brezvodni THF, heksan, eter, petroleter, metanol.

3.1.3 Aparature

Analitska tehnica Mettler Toledo PB403-S, žarilna pištola Einhell TC-HA 2000/1, magnetno mešalo z grelnikom IKA® RCT basic IKAMAG™, rotavapor Büchi Waterbath B-480, UV detektor CAMAG UV-Cabinet II, steklovina.

3.1.4 Programska oprema

Kemijske strukture in reakcijske sheme so izdelane v programu ChemDraw Professional verzija 16.0.1.4 (77) podjetja CambridgeSoft.

3.2 Metode

3.2.1 Kromatografske metode

Tankoplastna kromatografija (TLC)

Tankoplastna kromatografija je metoda, ki ločuje komponente iz zmesi na osnovi njihove različne polarnosti. Uporabljali smo jo z namenom, da bi lahko spremljali potek reakcije in določali čistost spojin. Za stacionarno fazo smo uporabili silikagel v nanosu debeline 0,20 mm na aluminijskem nosilcu ploščice znamke Merck TLC Silica gel 60 F₂₅₄. Različne mobilne faze: etilacetat, heksan, eter in petroleter smo uporabljali v različnih razmerjih. Vsaka posamezna sinteza v nadaljevanju ima navedeno svojo MF. S pomočjo UV svetilke

valovne dolžine 254 nm in 366 nm smo detektirali spojine, katere smo tudi orosili z ninhidrinom ali 2,4-dinitrofenilhidrazinom. Z ninhidrinom smo detektirali amine in karbamate, z 2,4-dinitrofenilhidrazinom pa aldehide.

Kolonska kromatografija

Končne spojine vsake stopnje smo čistili s kolonsko kromatografijo. Kot stacionarna faza je bil uporabljen silikagel Merck Silica gel 60 velikosti 0,040-0,063 mm. MF različnih kombinacij so navedene pri vsaki izolaciji. Velikost kolone vsake izolacije je bila določena v odvisnosti od količine vzorca.

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Končnim sintetiziranim spojinam smo določili čistost s pomočjo visokotlačne tekočinske kromatografije na aparaturi Agilent 1100LC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Uporabili smo kolono Agilent Eclipse Plus C18 (5 μ m, 4.6 \times 150 mm) pri temperaturi 25 °C, volumen injiciranja 15 μ L, koncentracijo vzorca 0.2 mg/mL v acetonitrilu; hitrost pretoka 1.0 mL/min; detekcija pri $\lambda = 220$ nm. Mobilna faza A je bila 0.1% TFA (v/v) v vodi, B pa je predstavljal acetonitril. Gradient (za MF B): 0–12 min, 10%–90%; 12–14 min, 90%; 14–15 min, 90%–10%.

3.2.2 Spektroskopske metode

Jedrska magnetna resonanca (NMR)

Spektre smo posneli na Fakulteti za Farmacijo, na aparaturi Bruker Avance III. ^1H NMR smo posneli pri 400 MHz pri vseh spojinah, pri končnih spojinah pa smo posneli tudi ^{13}C NMR pri 100 MHz. Vzorci so bili raztopljeni v devteriranem topilu CDCl_3 . Za interni standard smo uporabili TMS.

Masna spektrometrija (MS)

Masni spektri so bili posneti na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani, in sicer na aparaturi VG-Analytical Autospec Q proizvajalca Micromass, s tehnikama ESI in ESI-HRMS.

Infrardeča spektroskopija (IR)

IR spektre smo posneli na Fakulteti za Farmacijo, in sicer na aparaturi Perkin Elmer 1600 FT-IR.

3.2.3 Določanje tališča

Končnim spojinam smo na ogrevalni mizici določili talilne intervale s Koflerjevim mikroskopom znamke Leica ter termometrom 52 II Thermometer znamke Fluke.

3.2.4 Biološko testiranje

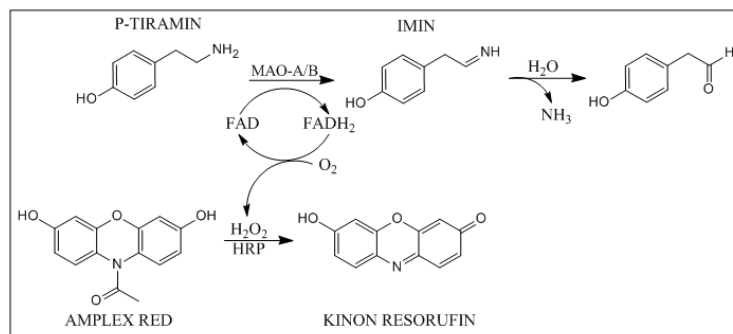
Biološko testiranje MAO-A in MAO-B je bilo izvedeno na Fakulteti za Farmacijo pod strokovnim vodstvom asist. dr. Damijana Kneza, mag. farm.

Vzorci smo pripravili po padajoči koncentraciji zaviralcev tako, da smo jih razredčili z DMSO. Najprej smo nanесли DMSO (kontrola) oziroma raztopino sintetiziranega zaviralca v DMSO, na koncu pa encim MAO-A ali MAO-B in pustili inkubirati pri 37 °C 15 minut. Sledil je dodatek barvila Amplex Red®, HRP ter p-tiramina (substrat). Encimsko reakcijo smo spremljali z merjenjem fluorescence ($\lambda_{\text{excit}} = 530 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$). Amplex Red® reagira s peroksidom v prisotnosti HRP, pri čemer nastane resorufin, ki fluorescira. Reakcija je zaradi prisotnosti roza barve vidna tudi s prostim očesom. Če pa se na encim MAO-A/B veže zaviralec in ga zavira, pa ne pride do nastanka peroksida, zato tudi ne nastaja resorufin, roza barva ni prisotna ali pa le v majhni meri. Vrednosti rezidualne aktivnosti (RA) smo določili pri 100 μM in izračunali po formuli:

$$\text{RA}(\%) = \frac{v_{\text{sp}} - v_{\text{brez}}}{v_{\text{DMSO}} - v_{\text{brez}}} \times 100\%$$

v	naklon=hitrost
v_{sp}	hitrost naraščanja fluorescence ob prisotnosti naše spojine
v_{DMSO}	hitrost naraščanja fluorescence ob prisotnosti DMSO in odsotnosti naše spojine
v_{brez}	hitrost naraščanja fluorescence v odsotnosti encima

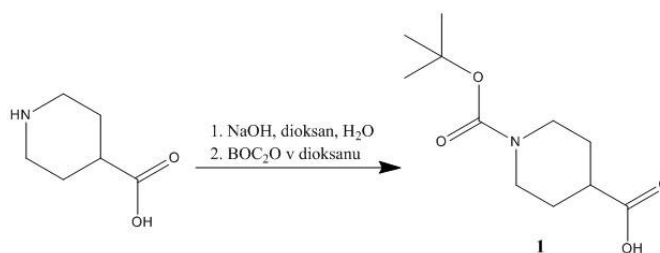
S pomočjo 4- parametrične Hilllove enačbe smo še določili vrednost IC_{50} , ki je koncentracija spojine, pri kateri je RA 50% oziroma pri kateri pride do 50% zaviranja delovanja encima.



Slika 5: Prikaz reakcije encima MAO-A/B ob prisotnosti barvila Amplex Red®

4 EKSPERIMENTALNI DEL

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



Slika 6: Shema sinteze spojine **1**

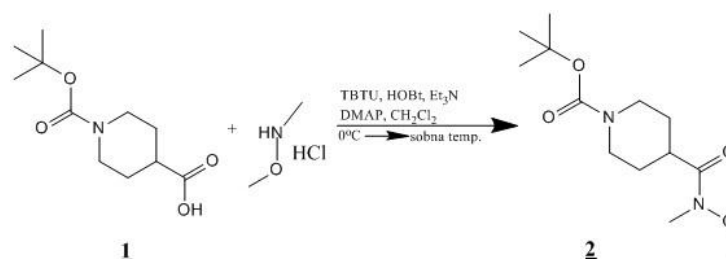
Sintezni postopek I

Začeli smo s piperidin-4-karboksilno kislino (93%, 7,75 g, 60,0 mol, 129,157 g/mol), ki smo jo raztopili v 40 ml 1M NaOH, 40 ml dioksana in 40 ml destilirane vode v 250 ml bučki. Raztopino smo dali na ledeno kopel, ker smo jo želeli ohladiti na 0 °C. Med mešanjem smo dodali 17,074 g di-*tert*-butil dikarbonata (Boc₂O) v prebitku, predhodno raztopljenega v 40 ml dioksana. Reakcijsko zmes smo pustili mešati pri sobni temperaturi preko noči. Po poteku reakcije smo na rotavaporju odparili polovično količino topil v bučki. Preostalo reakcijsko zmes smo prenesli v lij ločnik in ekstrahirali z 2x80 ml dietiletra. Vodno fazo smo nakisali z 1M HCl do pH 2-3 ter zatem ekstrahirali v liju ločniku z 2x100 ml etilacetata. Združene organske faze smo sušili s sušilnim sredstvom Na₂SO₄, ki smo se ga nato znebili s filtracijo. Na rotavaporju smo na koncu odparili topilo.

Tabela 1: Analizni podatki spojine **1**

Izgled	bela amorfna snov
MF	etilacetat/heksan=1/1
Rf	0,27
Izkoristek	96,4%
Tališče [°C]	164-165 °C
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm)	
1.43–1.53 (m, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.59–1.75 (m, 2H), 2.03–2.09 (m, 1H), 2.48 (tt, <i>J</i> = 10.2, 4.0 Hz, 1H), 2.82–2.89 (m, 1H), 3.03 (dd, <i>J</i> = 12.7, 10.6 Hz, 1H), 3.88 (td, <i>J</i> = 13.3, 4.0 Hz, 1H), 4.08–4.15 (m, 1H), 8.67 (bs, 1H)	

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



Slika 7: Shema sinteze spojine 2

Sintezni postopek II

Zaščiteno spojino smo raztopili v 50 ml diklormetana. Raztopino smo dali na ledeno kopel ter dodali sklopitveni reagente TBTU in HOBt ter pustili mešati 15 minut na 0 °C. Med mešanjem na 0 °C smo dodali *N,O*-dimetilhidroksilamin x HCl, trietilamin in katalizator DMAP. Zmes smo pustili mešati še pol ure na 0 °C, preden smo odstranili ledeno kopel in pustili reakcijsko zmes mešati preko noči pri sobni temperaturi. Reakcijski zmesi smo na rotavaporju odparili diklormetan ter preostanku v buči dodali 70 ml etilacetata. Zmes smo ekstrahirali v liju ločniku z 2x40 ml 10% citronske kisline, 2x40 ml NaHCO₃, 40 ml prečiščene vode in z 40 ml nasičene raztopine NaCl. Vodno fazo smo zavrgli, organsko fazo pa sušili z Na₂SO₄ in filtrirali, nato smo jo dali na rotavapor, da smo odparili topilo. Dobili smo oljnat produkt, ki smo ga očistili s kolonsko kromatografijo.

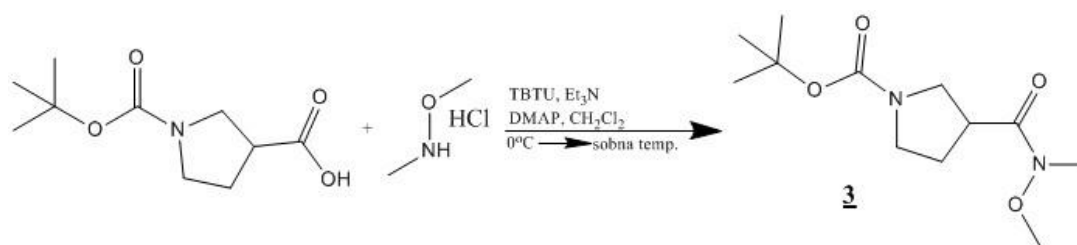
Tabela 2: Zatehte reagentov pri sintezi reagentov pri sintezi spojine 2

Spojina 1	16,88 g; 73 mmol; 229,7 g/mol
TBTU	26 g; 80,96 mmol; 321,08 g/mol
HOBt	13,52 g; 88,32 mmol; 153,13 g/mol
<i>N,O</i> -dimetilhidroksilamin x HCl	7,9 g; 80,96 mmol; 97,55 g/mol
Et ₃ N	30,81 ml; 0,725 g/mol; 220,8 mmol; 101,19 g/mol
DMAP	0,9 g; 7,36 mmol; 122,17 g/mol

Tabela 3: Analizni podatki spojine 2

Izgled	brezbarvna oljnata snov
MF	etilacetat/heksan=2/1
Rf	0,30
Izkoristek	86,6%
Tališče [°C]	89-91 °C
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃): δ (ppm)	
1.41–1.52 (m, 1H), 1.44 (s, 9H), 1.58–1.73 (m, 2H), 1.87–1.94 (m, 1H), 2.68 (tt, <i>J</i> = 12.8, 2.9 Hz, 1H), 2.72–2.82 (m, 1H), 2.86 (t, <i>J</i> = 11.7 Hz, 1H), 3.17 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 4.05–4.15 (m, 2H)	

4.3 Sinteza *tert*-butil 3-(metoksi(metil)karbamoil)pirolidin-1-karboksilata (**3**)



Slika 8: Shema sinteze spojine 3

Sintezni postopek

Imeli smo že pripravljeno zaščiteno pirol-3-karboksilno kislino, ki smo jo raztopili v 25 ml diklormetana in dali na ledeno kopel. Dodali smo sklopitveni reagent TBTU in pustili mešati 15 minut na 0 °C. Zatem smo dodali še *N,O*-dimetilhidroksilamin x HCl, trietilamin in katalizator DMAP in pustili mešati še pol ure na ledeni kopeli. Reakcijo smo pustili potekati čez noč pri sobni temperaturi. Zjutraj smo izolacijo izvedli po sinteznem postopku II.

Tabela 4: Zatehte reagentov pri sintezi regentov pri sintezi spojine 3

Zaščitena spojina	1,2915 g; 6,0 mmol; 215,25 g/mol
TBTU	2,12 g; 6,6 mmol; 321,08 g/mol
<i>N,O</i> -dimetilhidroksilamin x HCl	0,645 g; 6,6 mmol; 97,55 g/mol
Et ₃ N	2,5 ml; 18,0 mmol; 101,19 g/mol; 0,725 g/ml

DMAP	67,5 mg; 0,6 mmol; 122,17 g/mol
------	---------------------------------

Tabela 5: Analizni podatki spojine 3

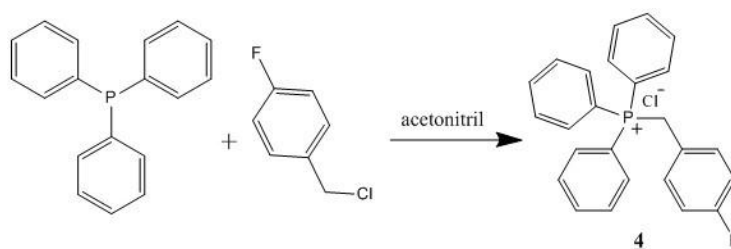
Izgled	brezbarvna oljnata snov
MF	etilacetat/heksan=2/1
Rf	0,28
Izkoristek	69,0%
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃): δ (ppm)	
1,47 (s, 9H, (CH ₃) ₃); 2,02-2,24 (m, 2H, 2x Pirolidin-H); 3,21 (s, 3H, NCH ₃); 3,30-3,39 (m, 2H, 2x Pirolidin-H); 3,42-3,47 (m, 1H, Pirolidin-H); 3,49-3,64 (m, 2H, 2x Pirolidin-H); 3,73 (s, 3H, OCH ₃)	
ESI-MS	(C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₄ Na): 281,55 (M+Na ⁺)

Vmesna stopnja I - Priprava Wittigovega reagenta

4.4 Sinteza trifenil(4-fluorobenzil)fosfonijevega klorida (4) in (2-fluorobenzil)trifenil fosfonijevega klorida (5)

Sintezni postopek vmesne stopnje I

Raztopini 4-fluorobenzilklorida (2-fluorobenzilklorida) in 15 ml acetonitrila smo dodali trifenilfosfin. Reakcijsko zmes smo pustili mešati preko noči in segrevali pod refluxom. Po 12 urah smo odparili topilo. Surov produkt smo očistili z filtracijo z odsesavanjem z dodatkom 5 ml diklormetana in 5 ml dietiletra.



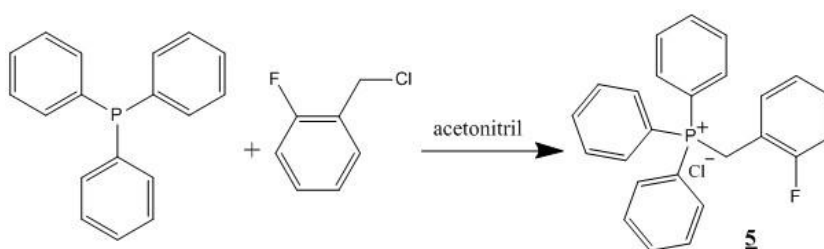
Slika 9: Shema sinteze spojine 4

Tabela 6: Zatehte reagentov pri sintezi spojine 4

4-fluorobenzil klorid	2,4 ml; 20 mmol; 1,207 g/ml; 144,58 g/mol
trifenil fosfin	5,24 g; 20 mmol; 262,3 g/mol

Tabela 7: Analizni podatki spojine 4

Izgled	bela kristalinična snov
Izkoristek	92,6%



Slika 10: Shema sinteze spojine 5

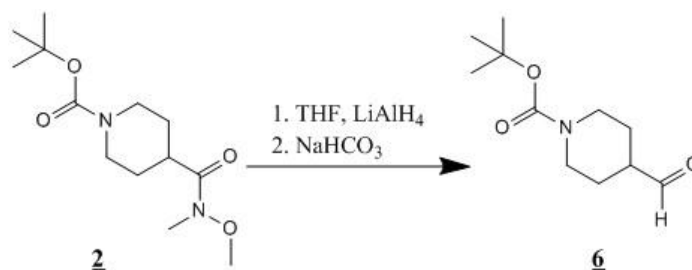
Tabela 8: Zatehte reagentov pri sintezi spojine 5

2-fluorobenzil klorid	1,18 ml; 10 mmol; 1,216 g/ml; 144,58 g/mol
trifenil fosfin	2,623 g; 10 mmol; 262,3 g/mol

Tabela 9: Analizni podatki spojine 5

Izgled	bela kristalinična snov
Izkoristek	54,4%

4.5 Sinteza *tert*-butil 4-formilpiperidin-1-karboksilata (**6**)



Slika 11: Shema sinteze spojine 6

Sintezni postopek III

Spojino smo raztopili v 10 ml brezvodnega THF. Reakcijsko zmes smo mešali ter nato hladili na ledeni kopeli, pri čemer smo imeli zagotovljeno atmosfero z argonom. Dodali smo 1,5 ekvivalenta LiAlH_4 po obrokih, ker je močan reducent in burno reagira. Pustili smo mešati 1,5 ure na ledeni kopeli. Potem smo reakcijo ustavili s 15 ml nasičene raztopine NaHCO_3 , ki smo jo dodali po kapljicah. Sledila je ekstrakcija z 3x40 ml etilacetata, 40 ml prečiščene vode in 40 ml nasičene raztopine NaCl . Združene organske faze smo sušili z Na_2SO_4 , odfiltrirali in odparili topilo na rotavaporju. Z dobljenim produktom smo takoj nadaljevali v naslednji stopnji, tj. sintezni postopek IV, ker je aldehyd, dobljen pri sinteznem postopku III, nestabilen.

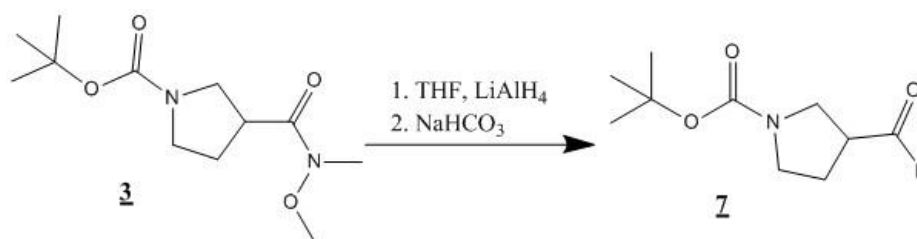
Tabela 10: Zatehte reagentov pri sintezi spojine 6

Spojina 2	8,165 g; 30 mmol; 272,17 g/mol
LiAlH_4	1,707 g; 45 mmol; 37,95 g/mol

Tabela 11: Analizni podatki spojine 6

Izgled	oljnata snov svetlo rumene barve
MF	etilacetat/heksan=2/1
Rf	0,6
Izkoristek	80%

4.6 Sinteza *tert*-butil 3-formilpirolidin-1-karboksilata (7)



Slika 12: Shema sinteze spojine 7

Sintetizirana po sinteznem postopku III.

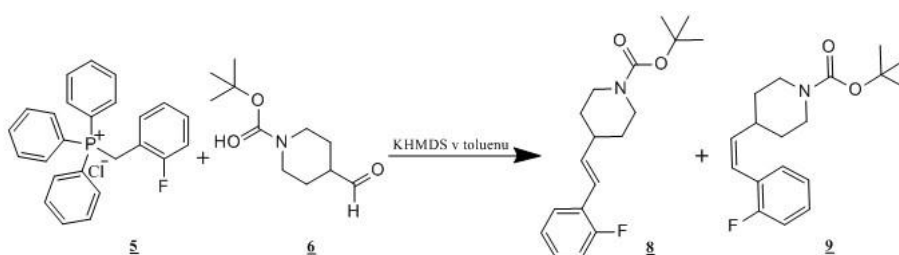
Tabela 12: Zatehte reagentov pri sintezi spojine 7

Spojina 3	2,06 g; 8 mmol; 258,16 g/mol
LiAlH ₄	0,4554 g; 12 mmol; 37,95 g/mol

Tabela 13: Analizni podatki spojine 7

Izgled	oljnata snov svetlo rumene barve
MF	etilacetat/heksan=2/1
Rf	0,58
Izkoristek	92%

4.7 Sinteza *tert*-butil (*E*)-4-(2-fluorostiril)piperidin-1-karboksilata (**8**) in *tert*-butil (*Z*)-4-(2-fluorostiril)piperidin-1-karboksilata (**9**)



Slika 13: Shema sinteze spojin 8 in 9

Sintezni postopek IV

Ohlajeni raztopini spojine 5 v 20 ml brezvodnega THF smo dodali 1,05 ekvivalenta KHMDS po kapljicah. Reakcijsko zmes smo pri sobni temperaturi mešali eno uro, nato smo po kapljicah dodali sintetizirani aldehyd, raztopljen v brezvodnem THF. Ob dodatku aldehyda je bila prisotna sprememba barve iz temno rdeče v oranžno. Reakcijo smo pustili teči čez noč pri sobni temperaturi. Postopek je imel zagotovljeno atmosfero z argonom. Reakcijo smo ustavili s 40 ml prečiščene vode, pri čemer smo opazili spremembo barve iz svetlo rdeče v rumeno. Nadaljevali smo z ekstrakcijo v liju ločniku. Vodno fazo smo spirali z 2x70 ml etilacetata. Združene organske faze smo spirali s 50 ml destilirane vode in 50 ml nasičene raztopine NaCl. V organski fazi je bila prisotna rumena barva. Organsko

fazo smo sušili z Na₂SO₄ ter filtrirali in rotavapirali. Potem je sledilo čiščenje produkta s kolonsko kromatografijo. Dobili smo cis in trans konformaciji produkta.

Tabela 14: Zatehte reagentov pri sintezi spojin 8 in 9 in izkoristek

Spojina 6	1,065 g; 5 mmol; 213,14 g/mol
Fosfonijeva sol spojine 5 (v prebitku)	2,118 g; 5 mmol; 423,6 g/mol
0,5M KHMDS v toluenu	10,5 ml; 5,25 mmol
Izkoristek	58% (cis in trans)

Tabela 15: Analizni podatki spojine 8

Izgled	olja
MF	eter/petroleter=1/10
Rf	0,14

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm)

1,36 (dt, 1H, $J_1 = 4,2$ Hz, $J_2 = 12,3$ Hz, Piperidin-H); 1,39 (dt, 1H, $J_1 = 4,2$ Hz, $J_2 = 12,3$ Hz, Piperidin-H); 1,46 (s, 9H, (CH₃)₃); 1,70-1,77 (m, 2H, 2x piperidin-H); 2,23-2,33 (m, 1H, piperidin-H); 2,76 (t, 1H, $J = 11,0$ Hz, 2x piperidin-H); 4,12 (rs, 2H, 2x piperidin-H); 6,20 (dd, 1H, $J_1 = 7,0$ Hz, $J_2 = 16,1$ Hz, Ar-CH=CH); 6,53 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz, Ar-CH=CH); 6,99 (ddd, 1H, $J_1 = 1,2$ Hz, $J_2 = 8,1$ Hz, $J_3 = 10,8$ Hz, ArH); 7,05 (dt, 1H, $J_1 = 1,2$ Hz, $J_2 = 7,6$ Hz, ArH); 7,12-7,18 (m, 1H, ArH); 7,41 (dt, 1H, $J_1 = 1,8$ Hz, $J_2 = 7,7$ Hz, ArH)

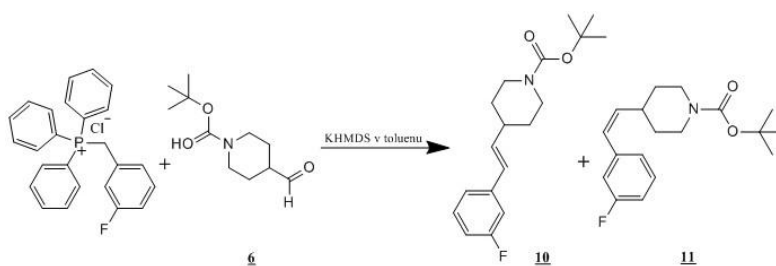
Tabela 16: Analizni podatki spojine 9

Izgled	olja
MF	eter/petroleter=1/10
Rf	0,16

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm)

1,27-1,40 (m, 2H, 2xPiperidin-H); 1,43 (s, 9H, (CH₃)₃); 1,56-1,62 (m, 2H, 2xPiperidin-H); 2,44-2,54 (m, 1H, Piperidin-H); 2,61-2,70 (m, 2H, 2xPiperidin-H); 4,09 (rs, 2H, 2xPiperidin-H); 5,53 (dd, 1H, $J_1 = 10,2$ Hz, $J_2 = 11,6$ Hz, Ar-CH=CH); 6,33 (d, 1H, $J = 11,6$ Hz, Ar-CH=CH); 6,96 (ddd, 1H, $J_1 = 1,3$ Hz, $J_2 = 8,2$ Hz, $J_3 = 10,8$ Hz, ArH); 7,00-7,10 (m, 2H, ArH); 7,17-7,22 (m, 1H, ArH)

4.8 Sinteza *tert*-butil (*E*)-4-(3-fluorostiril)piperidin-1-karboksilata (**10**) in *tert*-butil (*Z*)-4-(3-fluorostiril)piperidin-1-karboksilata (**11**)



Slika 14: Shema sinteze spojin 10 in 11

Sintetizirana po sinteznem postopku IV.

Tabela 17: Zatehte reagentov pri sintezi spojin 10 in 11 in izkoristek

Spojina 6	1,3 g; 6,1 mmol; 213,14 g/mol
Fosfonijeva sol (v prebitku)	4,1 g; 10 mmol; 423,6 g/mol
0,5M KHMDS v toluenu	21 ml; 10,5 mmol
Izkoristek	56% (cis in trans)

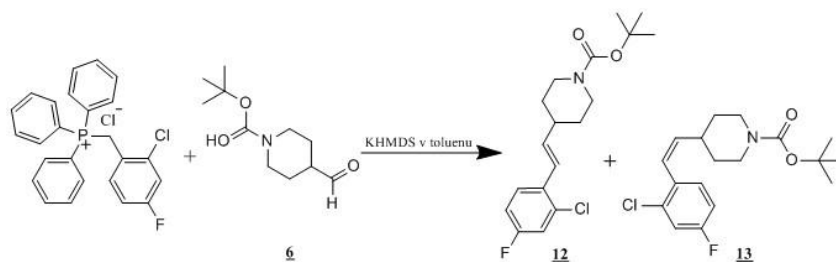
Tabela 18: Analizni podatki spojine 10

Izgled	bela oborina
MF	etilacetat/heksan=1/2
Rf	0,67
Tališče [°C]	45-46°C
ESI-MS	C ₁₈ H ₂₄ FNO ₂ Na: 328,40 (M+Na ⁺)
¹ H (400 MHz, CDCl ₃): δ (ppm)	1,31-1,44 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 1,47 (s, 9H, (CH ₃) ₃); 1,71-1,78 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 2,23-2,33 (m, 1H, piperidin- <i>H</i>); 2,78 (t, 1H, <i>J</i> = 12,2 Hz, 2x piperidin- <i>H</i>); 4,13 (rs, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 6,15 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 6,8 Hz, <i>J</i> ₂ = 16,0 Hz, Ar-CH=CH); 6,35 (d, 1H, <i>J</i> = 16,0 Hz, Ar-CH=CH); 6,91-6,97 (m, 2H, ArH); 6,89 (ddt, 1H, <i>J</i> ₁ = 0,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,6 Hz, <i>J</i> ₃ = 8,4 Hz, ArH); 7,02-7,06 (m, 1H, ArH); 7,07-7,11 (m, 1H, ArH); 7,25 (td, 1H, <i>J</i> ₁ = 5,8 Hz, <i>J</i> ₂ = 8,0 Hz, ArH)
¹³ C NMR (100 MHz, CDCl ₃): δ (ppm)	28,43; 31,63; 39,28; 43,39; 79,38; 112,40 (d, <i>J</i> _{C,F} = 21,3 Hz); 113,82 (d, <i>J</i> _{C,F} = 21,3 Hz); 121,90 (d, <i>J</i> _{C,F} = 2,2 Hz); 127,44 (d, <i>J</i> _{C,F} = 2,1 Hz); 129,88 (d, <i>J</i> _{C,F} = 8,9 Hz); 135,72; 139,84 (d, <i>J</i> _{C,F} = 7,3 Hz); 154,80; 163,07 (d, <i>J</i> _{C,F} = 245,1 Hz)

Tabela 19: Analizni podatki spojine 11

Izgled	rahlo rumeno olje
MF	etilacetat/heksan=1/2
Rf	0,70
ESI-MS	C ₁₈ H ₂₄ FNO ₂ Na: 328,42 (M+Na ⁺)
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm)	
1,35 (dt, 1H, <i>J</i> ₁ = 3,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 12,4 Hz, Piperidin-H); 1,38 (dt, 1H, <i>J</i> ₁ = 3,7 Hz, <i>J</i> ₂ = 12,2 Hz, Piperidin-H); 1,46 (s, 9H, (CH ₃) ₃); 1,60-1,69 (m, 2H, 2xPiperidin-H); 2,62-2,77 (m, 3H, 3xPiperidin-H); 4,09 (rs, 2H, 2xPiperidin-H); 5,50 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 10,2 Hz, <i>J</i> ₂ = 11,6 Hz, Ar-CH=CH); 6,35 (d, 1H, <i>J</i> = 11,6 Hz, Ar-CH=CH); 6,91-6,97 (m, 2H, ArH); 6,99-7,01 (m, 1H, ArH); 7,27-7,32 (m, 1H, ArH)	
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm)	
28,41; 31,89; 35,07; 43,47; 79,35; 113,58 (d, <i>J</i> _{C,F} = 21,3 Hz); 115,17 (d, <i>J</i> _{C,F} = 21,3 Hz); 124,18 (d, <i>J</i> _{C,F} = 2,9 Hz); 127,22 (d, <i>J</i> _{C,F} = 2,2 Hz); 129,70 (d, <i>J</i> _{C,F} = 8,2 Hz); 137,61; 139,62 (d, <i>J</i> _{C,F} = 8,2 Hz); 162,68 (d, <i>J</i> _{C,F} = 245,3 Hz)	

4.9 Sinteza *tert*-butil (*E*)-4-(2-kloro-4-fluorostiril)piperidin-1-karboksilata (**12**) in *tert*-butil (*Z*)-4-(2-kloro-4-fluorostiril)piperidin-1-karboksilata (**13**)



Slika 15: Shema sinteze spojin 12 in 13

Sintetizirana po sinteznem postopku IV.

Tabela 20: Zatehte reagentov pri sintezi spojin 12 in 13 in izkoristek

Spojina 6	1,3g; 6,1mmol; 213,14g/mol
Fosfonijeva sol (v prebitku)	4,4g; 10mmol; 441,3g/mol
0,5M KHMDS v toluenu	21ml; 10,5mmol

Izkoristek	52% (cis in trans)
------------	--------------------

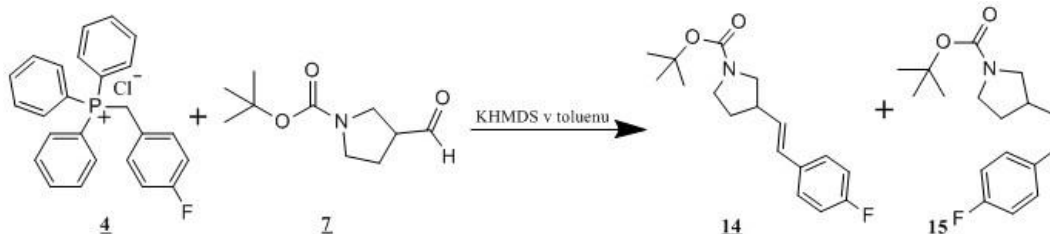
Tabela 21: Analizni podatki spojine 12

Izgled	bela oborina
MF	etilacetat/heksan=1/2
Rf	0,68
Tališče [°C]	90-92°C
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm)	
1,36 (dt, 1H, $J_1 = 4,1$ Hz, $J_2 = 12,4$ Hz, piperidin- <i>H</i>); 1,39 (dt, 1H, $J_1 = 4,2$ Hz, $J_2 = 12,3$ Hz, piperidin- <i>H</i>); 1,46 (s, 9H, (CH ₃) ₃); 1,72-1,79 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 2,27-2,36 (m, 1H, piperidin- <i>H</i>); 2,77 (t, 1H, $J = 11,4$ Hz, 2x piperidin- <i>H</i>); 4,13 (rs, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 6,04 (dd, 1H, $J_1 = 6,9$ Hz, $J_2 = 15,9$ Hz, Ar-CH=CH); 6,67 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz, Ar-CH=CH); 6,92 (dt, 1H, $J_1 = 2,6$ Hz, $J_2 = 8,4$ Hz, ArH); 7,07 (dd, 1H, $J_1 = 2,6$ Hz, $J_2 = 8,5$ Hz, ArH); 7,44 (dd, 1H, $J_1 = 6,1$ Hz, $J_2 = 8,8$ Hz, ArH)	
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm)	
28,40; 31,63; 39,47; 43,69; 79,36; 114,17 (d, $J_{C,F} = 21,3$ Hz); 116,62 (d, $J_{C,F} = 24,3$ Hz); 123,83 (d, $J_{C,F} = 1,4$ Hz); 127,51 (d, $J_{C,F} = 8,1$ Hz); 131,84 (d, $J_{C,F} = 3,7$ Hz); 133,09 (d, $J_{C,F} = 9,7$ Hz); 136,95 (d, $J_{C,F} = 2,2$ Hz); 154,77; 161,40 (d, $J_{C,F} = 249,6$ Hz)	
ESI-MS	C ₁₈ H ₂₃ ClFNO ₂ Na: 362,40 (M+Na ⁺)

Tabela 22: Analizni podatki spojine 13

Izgled	brezbarvno olje
MF	etilacetat/heksan=1/2
Rf	0,73
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm)	
1,27 (dt, 1H, $J_1 = 4,4$ Hz, $J_2 = 12,9$ Hz, piperidin- <i>H</i>); 1,30 (dt, 1H, $J_1 = 4,0$ Hz, $J_2 = 12,3$ Hz, piperidin- <i>H</i>); 1,39 (s, 9H, (CH ₃) ₃); 1,50-1,58 (m, 2H, 2x piperidin- <i>H</i>); 2,30-2,40 (m, 1H, piperidin- <i>H</i>); 2,60 (t, 1H, $J = 11,4$ Hz, 2x piperidin- <i>H</i>); 4,01 (rs, 2H, 2xPiperidin- <i>H</i>); 5,51 (dd, 1H, $J_1 = 10,2$ Hz, $J_2 = 11,4$ Hz, Ar-CH=CH); 6,29 (d, 1H, $J = 11,5$ Hz, Ar-CH=CH); 6,89 (dt, 1H, $J_1 = 3,0$ Hz, $J_2 = 8,5$ Hz, ArH); 7,06 (dd, 1H, $J_1 = 2,6$ Hz, $J_2 = 8,5$ Hz, ArH); 7,13 (dd, 1H, $J_1 = 6,2$ Hz, $J_2 = 8,6$ Hz, ArH)	
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm)	
28,21; 31,59; 35,03; 43,14; 79,09; 113,50 (d, $J_{C,F} = 20,9$ Hz); 116,54 (d, $J_{C,F} = 24,3$ Hz); 124,54; 130,73 (d, $J_{C,F} = 8,3$ Hz); 131,74 (d, $J_{C,F} = 3,7$ Hz); 133,98 (d, $J_{C,F} = 10,2$ Hz); 137,81 (d, $J_{C,F} = 1,5$ Hz); 154,49; 161,22 (d, $J_{C,F} = 249,4$ Hz)	

4.10 Sinteza *terc*-butil (*E*)-3-(4-fluorostiril)pirolidin-1-karboksilat (**14**) in *terc*-butil (*Z*)-3-(4-fluorostiril)pirolidin-1-karboksilat (**15**)



Slika 16: Shema sinteze spojin **14** in **15**

Sintetizirana po sinteznem postopku IV.

Tabela 23: Zatehte reagentov pri sintezi spojin **14** in **15** in izkoristek

Spojina 7	1,47 g; 7,4 mmol; 199,25 g/mol
Fosfonijeva sol (v prebitku)	3,3 g; 7,8 mmol; 423,6 g/mol
0,5M KHMDS v toluenu	15,6 ml; 7,77 mmol
Izkoristek	49% (cis in trans)

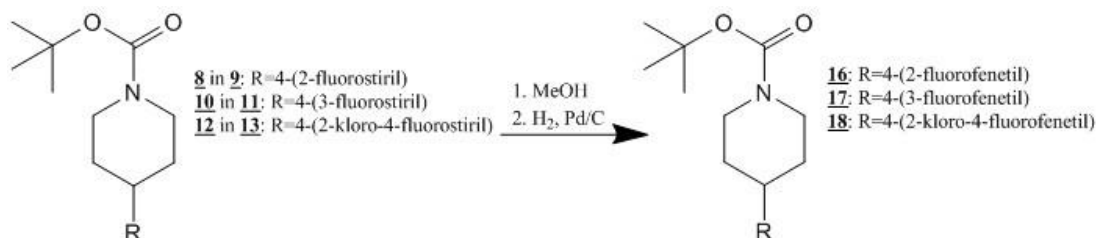
Tabela 24: Analizni podatki spojine **14**

Izgled	bela oborina
MF	etilacetat/heksan=1/2
Rf	0,68
Tališče [°C]	70-72 °C
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃): δ (ppm)	
1,45 (s, 9H, (CH ₃) ₃); 1,67-1,80 (m, 1H, Pirolidin-H); 2,04 (dtd, 1H, J ₁ = 3,2 Hz, J ₂ = 6,6 Hz, J ₃ = 9,6 Hz, Pirolidin-H); 2,84-2,96 (m, 1H, Pirolidin-H); 3,05-3,16 (m, 1H, Pirolidin-H); 3,25-3,36 (m, 1H, Pirolidin-H); 3,42-3,64 (m, 2H, 2xPirolidin-H); 6,01 (dd, 1H, J ₁ = 7,8 Hz, J ₂ = 15,9 Hz, Ar-CH=CH); 6,39 (d, 1H, J= 15,9 Hz, Ar-CH=CH); 6,93-6,99 (m, 2H, ArH); 7,25-7,30 (m, 2H, ArH)	
¹³ C NMR (100 MHz, CDCl ₃): δ (ppm)	
28,52; 33,06; 37,70; 42,39; 51,65; 59,25; 79,21; 115,42 (d, J _{C,F} = 21,6 Hz); 127,55 (d, J _{C,F} = 7,8 Hz); 129,37; 129,87 (d, J _{C,F} = 2,2 Hz); 133,18; 154,54; 162,14 (d, J _{C,F} = 246,4 Hz)	

ESI-MS	C ₁₇ H ₂₂ FNO ₂ Na (M+Na ⁺): 314,37
Tabela 25: Analizni podatki spojine 15	
Izgled	brezbarvno olje
MF	etilacetat/heksan=1/2
Rf	0,70
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm)	
1,45 (s, 9H, (CH ₃) ₃); 1,66-1,78 (m, 1H, Piroolidin-H); 2,02 (dtd, 1H, J ₁ = 2,7 Hz, J ₂ = 6,4 Hz, J ₃ = 9,1 Hz, Piroolidin-H); 3,00-3,10 (m, 1H, Piroolidin-H); 3,14-3,32 (m, 2H, 2xPiroolidin-H); 3,44-3,64 (m, 2H, 2xPiroolidin-H); 5,52 (dd, 1H, J ₁ = 10,5 Hz, J ₂ = 10,9 Hz, Ar-CH=CH); 6,45 (d, 1H, J= 11,5 Hz, Ar-CH=CH); 6,99-7,04 (m, 2H, ArH); 7,16-7,21 (m, 2H, ArH)	
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm)	
28,46; 33,06; 37,70; 45,67; 51,65; 79,15; 115,17 (d, J _{C,F} = 21,4 Hz); 129,46; 130,02 (d, J _{C,F} = 7,9 Hz); 132,58; 133,0 (d, J _{C,F} = 3,5 Hz); 154,37; 161,68 (d, J _{C,F} = 246,4 Hz)	
ESI-MS	C ₁₇ H ₂₂ FNO ₂ Na (M+Na ⁺): 314,59

Vmesna stopnja II – Katalitsko hidrogeniranje

4.11 Sinteza *terc*-butil 4-(2-fluorofenil)piperidin-1-karboksilata (**16**)



Slika 17: Shema sintez spojin **16**, **17** in **18**

Sintezni postopek vmesne stopnje II

Spojino smo raztopili v 10 ml metanola in jo prepihali z argonom. Nato smo dodali paladij na ogljiku v količini, ki ustreza 10% mase spojine. Reakcijsko zmes smo pustili mešati še 15 minut pri atmosferi pod argonom. Nato smo argon previdno zamenjali z vodikom in pustili reakcijsko zmes mešati čez noč. Paladij smo odstranili s filtracijo z odsesavanjem preko celita. Preostanek smo odparili na rotavaporju.

Tabela 26: Zatehte reagentov pri sintezi spojine 16

Spojini 8 in 9	0,437 g; 1,43 mmol; 305,18 g/mol
Pd/C	~43,7 mg

Tabela 27: Analizni podatki spojine 16

Izgled	svetlo rumeno olje
MF	etilacetat/heksan=1/2
Rf	0,70
Izkoristek	95%
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm)	
1,12 (dt, 1H, $J_1 = 4,1$ Hz, $J_2 = 12,4$ Hz, Piperidin-H); 1,15 (dt, 1H, $J_1 = 4,2$ Hz, $J_2 = 12,4$ Hz, Piperidin-H); 1,37-1,44 (m, 1H, Piperidin-H); 1,46 (s, 9H, (CH ₃) ₃); 1,52-1,59 (m, 2H, CH ₂); 1,69-1,76 (m, 2H, 2x Piperidin-H); 2,58-2,72 (m, 4H, CH ₂ -Ar + 2x Piperidin-H); 4,08 (rs, 2H, 2x Piperidin-H); 6,97-7,02 (m, 1H, ArH); 7,03-7,07 (m, 1H, ArH); 7,13-7,19 (m, 2H, ArH). 31,84; 35,72; 42,07; 51,52; 58,34; 72,07; 78,61; 114,32 (d, $J_{C,F} = 21,5$ Hz); 126,58; 129,34-129,60 (m); 132,50-132,71 (m); 135,21; 160,78 (d, $J_{C,F} = 245,6$ Hz)	
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm)	
28,41; 31,89; 35,07; 43,47; 79,35; 113,58 (d, $J_{C,F} = 21,3$ Hz); 115,17 (d, $J_{C,F} = 21,3$ Hz); 124,18 (d, $J_{C,F} = 2,9$ Hz); 127,22 (d, $J_{C,F} = 2,2$ Hz); 129,70 (d, $J_{C,F} = 8,2$ Hz); 137,61; 139,62 (d, $J_{C,F} = 8,2$ Hz); 162,68 (d, $J_{C,F} = 245,3$ Hz)	
ESI-MS	C ₁₈ H ₂₆ FNO ₂ Na: 330,41 (M+Na ⁺)

4.12 Sinteza *terc*-butil 4-(3-fluorofenetil)piperidin-1-karboksilata (17)

Sintetizirana po vmesnem sinteznem postopku II.

Tabela 28: Zatehte reagentov pri sintezi spojine 17

Spojini 10 in 11	0,701 g; 2,29 mmol; 305,18 g/mol
Pd/C	70,1 mg

Tabela 29: Analizni podatki spojine 17

Izgled	svetlo rumeno olje
MF	etilacetat/heksan=1/2
Rf	0,65

Izkoristek	99%
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm)	
1,11 (dt, 1H, <i>J</i> ₁ = 4,1 Hz, <i>J</i> ₂ = 12,3 Hz, Piperidin-H); 1,14 (dt, 1H, <i>J</i> ₁ = 4,2 Hz, <i>J</i> ₂ = 12,5 Hz, Piperidin-H); 1,35-1,44 (m, 1H, Piperidin-H); 1,45 (s, 9H, (CH ₃) ₃); 1,50-1,59 (m, 2H, CH ₂); 1,65-1,72 (m, 2H, 2xPiperidin-H); 2,59-2,72 (m, 4H, CH ₂ -Ar + 2xPiperidin-H); 4,08 (rs, 2H, 2xPiperidin-H); 6,84-6,89 (m, 2H, ArH); 6,91-6,95 (m, 1H, ArH); 7,22 (ddd, 1H, <i>J</i> ₁ = 6,1 Hz, <i>J</i> ₂ = 7,6 Hz, <i>J</i> ₃ = 8,9 Hz, ArH)	
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm)	
28,43; 32,03; 32,64; 35,44; 37,96; 43,55; 79,20; 112,56 (d, <i>J</i> _{C,F} = 21,0 Hz); 115,05 (d, <i>J</i> _{C,F} = 20,7 Hz); 123,91 (d, <i>J</i> _{C,F} = 2,8 Hz); 129,68 (d, <i>J</i> _{C,F} = 8,3 Hz); 145,04 (d, <i>J</i> _{C,F} = 7,3 Hz); 154,84; 162,87 (d, <i>J</i> _{C,F} = 245,4 Hz)	
ESI-MS	C ₁₈ H ₂₆ FNO ₂ Na: 330,42 (M+Na ⁺)

4.13 Sinteza *tert*-butil 4-(2-kloro-4-fluorofenil)piperidin-1-karboksilata (**18**)

Sintetizirana po vmesnem sinteznem postopku II.

Tabela 30: Zatehte reagentov pri sintezi spojine 18

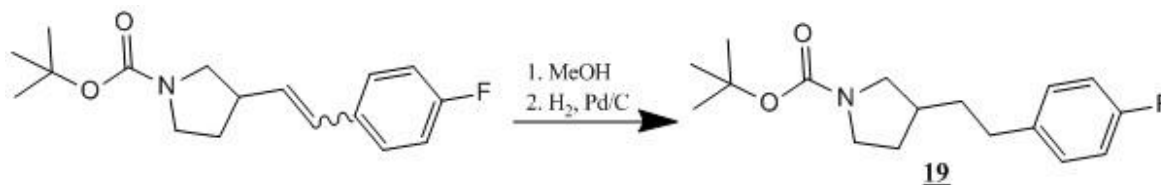
Spojini 12 in 13	0,493 g; 1,42 mmol; 345,19 g/mol
Pd/C	49,3 mg

Tabela 31: Analizni podatki spojine 18

Izgled	svetlo rumeno olje
MF	etilacetat/heksan=1/3 + eter/petroleter=1/10
Rf	0,40
Izkoristek	99%

Analizni podatki manjkajo, ker nismo dobili čiste spojine.

4.14 Sinteza *tert*-butil 3-(4-fluorofenil)pirolidin-1-karboksilata (**19**)



Slika 18: Analizni podatki spojine 18

Sintetizirana po vmesnem sinteznem postopku II.

Tabela 32: Zatehte reagentov pri sintezi spojine 19

Spojini 14 in 15	0,440 g; 1,51 mmol; 291,16 g/mol
Pd/C	44 mg

Tabela 33: Analizni podatki spojine 19

Izgled	rumeno olje
MF	etilacetat/heksan=1/2
Rf	0,67
Izkoristek	90%

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm)

1,40-1,56 (m, 1H, Pirolidin-H); 1,45 (s, 9H, (CH₃)₃); 1,67 (dt, $J_1=7,6$ Hz, $J_2=7,7$ Hz, CH₂); 1,98 (dtd, 1H, $J_1=2,7$ Hz, $J_2=6,6$ Hz, $J_3=9,1$ Hz, Pirolidin-H); 2,03-2,13 (m, 1H, Pirolidin-H); 2,59 (t, 2H, $J=7,8$ Hz, CH₂-Ar); 2,82-2,94 (m, 1H, Pirolidin-H); 3,18-3,28 (m, 1H, Pirolidin-H); 3,37-3,60 (m, 2H, 2xPirolidin-H); 6,92-6,98 (m, 2H, ArH); 7,09-7,13 (m, 2H, ArH)

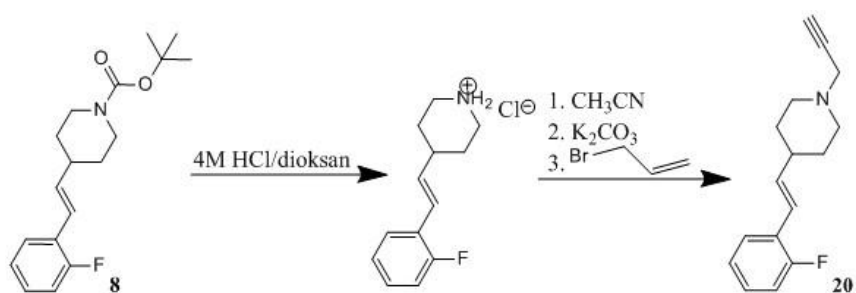
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm)

31,00; 33,58; 35,11; 37,53; 45,30; 51,00; 78,95; 115,05 (d, $J_{C,F}=21,5$ Hz); 129,53 (d, $J_{C,F}=7,8$ Hz); 137,44 (d, $J_{C,F}=3,3$ Hz) 154,52; 161,20 (d, $J_{C,F}=243,5$ Hz)

ESI-MS

C₁₇H₂₄FNO₂Na (M+Na⁺): 316,61

4.15 Sinteza (*E*)-4-(2-fluorostiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (**20**)



Slika 19: Shema sinteze spojine 20

Sintezni postopek V

Spojino 8 smo odščitili s 4 ml 4 M HCl v 1,4-dioksanu in 40 µl koncentrirane HCl (37%). Po približno po eni uri smo s TLC metodo preverili, če je potekla odščita. Odščiteni spojini smo na rotavaporju odparili topilo in dodali 5 ml acetonitrila in 3,5 ekvivalenata K₂CO₃. Zagotovili smo atmosfero z argonom in ohladili na ledeni kopeli. Dodali smo 1,2 ekvivalenta propargil bromida v toluenu (80% raztopina), pokrili s folijo do septuma in pustili potekati reakcijo čez noč. Reakcijski zmesi smo dodali 50 ml etilacetata in spirali z 2x20 ml destilirane vode in z 20 ml nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili z Na₂SO₄ in jo prefiltrirali. Surov produkt smo očistili z kolonsko kromatografijo.

Tabela 34: Zatehte reagentov pri sintezi spojine 20

Spojina 8	0,195 g/mol; 0,64 mmol; 305,18 g/mol
K ₂ CO ₃	0,309 g; 2,23 mmol; 138,205 g/mol
propargil bromid (80%)	82 µl; 0,76 mmol; 119 g/mol; 1,38 g/ml

Tabela 35: Analizni podatki spojine 20

Izgled	svetlo rumeno olje
MF	etilacetat/heksan=1/2
Rf	0,20
Izkoristek	58%

¹H NMR (400 oz. 100 MHz, CDCl₃): δ (ppm)

1,56 (dt, 1H, $J_1 = 3,9$ Hz, $J_2 = 12,0$ Hz, Piperidin-H); 1,59 (dt, 1H, $J_1 = 3,9$ Hz, $J_2 = 12,0$ Hz, Piperidin-H); 1,80-1,86 (m, 2H, 2x Piperidin-H); 2,12-2,22 (m, 1H, Piperidin-H); 2,26 (t, 1H, $J = 2,4$ Hz, C≡CH); 2,28 (dt, $J_1 = 2,5$ Hz, $J_2 = 11,7$ Hz, 2x Piperidin-H); 2,91-2,96 (m, 2H, 2x Piperidin-H); 3,33 (d, 2H, $J = 2,4$ Hz, NCH₂C); 6,23 (dd, 1H, $J_1 = 7,1$ Hz, $J_2 = 16,1$ Hz, Ar-CH=CH); 6,55 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz, Ar-CH=CH); 7,00 (ddd, 1H, $J_1 = 1,2$ Hz, $J_2 = 8,1$ Hz, $J_3 = 10,8$ Hz, ArH); 7,07 (dt, 1H, $J_1 = 1,0$ Hz, $J_2 = 7,4$ Hz, 7,14-7,19 (m, 1H, ArH); 7,44 (dt, 1H, $J_1 = 1,7$ Hz, $J_2 = 7,7$ Hz, ArH)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm)

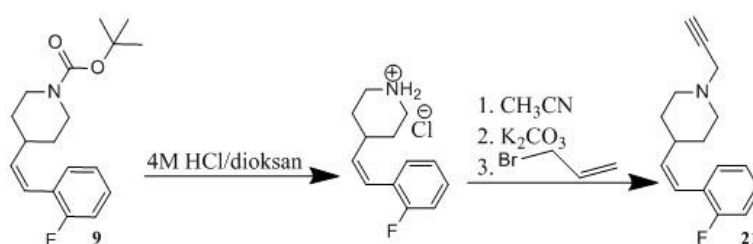
31,93; 39,21; 47,24; 52,21; 72,97; 79,06; 115,58 (d, $J_{C,F} = 22,3$ Hz); 120,60 (d, $J_{C,F} = 3,8$ Hz); 123,96 (d, $J_{C,F} = 3,6$ Hz); 125,32 (d, $J_{C,F} = 12,3$ Hz); 126,88 (d, $J_{C,F} = 12,3$ Hz); 128,15 (d, $J_{C,F} = 8,5$ Hz); 137,41 (d, $J_{C,F} = 4,2$ Hz); 159,95 (d, $J_{C,F} = 248,4$ Hz)

IR (cm⁻¹)

3183, 2947, 2921, 2802, 2756, 1576, 1485, 1455, 1445, 1389, 1371, 1360, 1331, 1301, 1277, 1263, 1230, 1213, 1194, 1183, 1141, 1108, 1091, 1031, 1020, 983, 968, 946, 842, 811, 777, 754, 713

ESI-HRMS	izračunana za C ₁₆ H ₁₉ NF (M+H ⁺): 244,1502 izmerjena: 244,1500
HPLC	99.5% (t _R = 9.09 min)

4.16 Sinteza (Z)-4-(2-fluorostiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (**21**)



Slika 20: Shema sinteze spojine 21

Sintetizirana po sinteznem postopku V.

Tabela 36: Zatehte reagentov pri sintezi spojine 21

Spojina 9	0,325 g; 1,06 mmol; 305,18 g/mol
K ₂ CO ₃	0,515 g ; 3,72 mmol; 138,205 g/mol
propargil bromid (80%)	137 µl; 1,27 mmol; 119 g/mol; 1,38 g/ml

Tabela 37: Analizni podatki spojine 21

Izgled	brezbarvno olje
MF	etilacetat/heksan=1/2
Rf	0,20
Izkoristek	5%

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm)

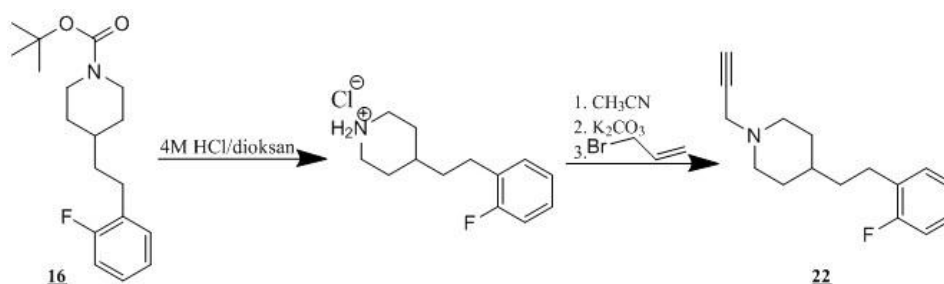
1,49-1,60 (m, 2H, 2xPiperidin-H); 1,68-1,74 (m, 2H, 2xPiperidin-H); 2,17-2,21 (m, 2H, 2xPiperidin-H); 2,23 (t, 1H, J= 2,4 Hz, C≡CH); 2,33-2,44 (m, 1H, Piperidin-H); 2,85-2,91 (m, 2H, 2x Piperidin-H); 3,30 (d, 2H, J= 2,4 Hz, NCH₂C); 5,62 (dd, 1H, J₁= 10,2 Hz, J₂= 11,6 Hz, Ar-CH=C \underline{H}); 6,37 (d, 1H, J= 11,4 Hz, Ar-C \underline{H} =CH); 7,03-7,07 (m, 1H, ArH); 7,08-7,13 (m, 1H, ArH); 7,20-7,24 (m, 2H, ArH)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm)

32,07; 34,96; 47,25; 51,87; 73,01; 79,01; 115,44 (d, J_{C,F} = 22,2 Hz); 123,67 (d, J_{C,F} = 3,5 Hz); 126,98 (d, J_{C,F} = 10,4 Hz); 128,47 (d, J_{C,F} = 8,0 Hz); 129,51 (d, J_{C,F} = 12,5 Hz); 130,28 (d, J_{C,F} = 3,5 Hz); 139,22 (m); 159,66 (d, J_{C,F} = 246,2 Hz)

IR (cm⁻¹)	
	3299, 2930, 1601, 1508, 1446, 1225, 1157, 972, 845, 657
ESI-HRMS	izračunana za C ₁₆ H ₁₉ NF (M+H ⁺): 244,1502 izmerjena: 244,1501
HPLC	97.1% (t _R = 9.04 min)

4.17 Sinteza 1-(prop-2-in-1-il)-4-(2-fluorofenil)piperidina (**22**)



Slika 21: Shema sinteze spojine 22

Sintetizirana po sinteznem postopku V.

Tabela 38: Zatehte reagentov pri sintezi spojine 22

Spojina 16	0,402 g; 1,3 mmol; 307,38 g/mol
K ₂ CO ₃	0,632 g; 4,57 mmol; 138,205 g/mol
propargil bromid (80%)	169,5 µl; 1,57 mmol; 119 g/mol; 1,38 g/ml

Tabela 39: Analizni podatki spojine 22

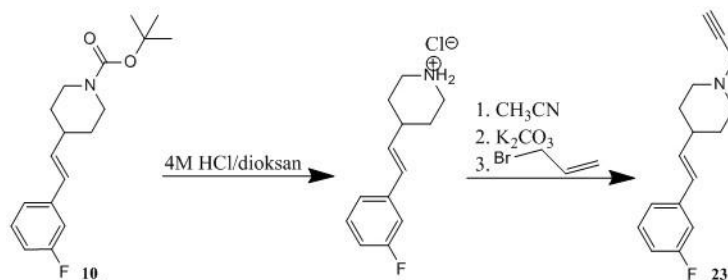
Izgled	rumeno olje
MF	etilacetat/heksan=1/2
Rf	0,21
Izkoristek	8%

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm)

1,23-1,37 (m, 3H, 3x Piperidin-H); 1,53-1,59 (m, 2H, CH₂); 1,74-1,80 (m, 2H, 2x Piperidin-H); 2,14-2,21 (m, 2H, 2x Piperidin-H); 2,23 (t, 1H, J = 2,4 Hz, C≡CH); 2,63-2,68 (m, 2H, CH₂); 2,86-2,91 (m, 2H, 2x Piperidin-H); 3,30 (d, 2H, J = 2,4 Hz, NCH₂C); 6,97-7,02 (m, 1H, ArH); 7,03-7,07 (m, 1H, ArH); 7,12-7,20 (m, 2H, ArH)

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm)	
26,16; 32,12; 34,85; 36,88; 47,19; 52,52; 72,89; 79,15; 115,15 (d, $J_{\text{C,F}} = 22,5$ Hz); 123,88 (d, $J_{\text{C,F}} = 3,4$ Hz); 127,32 (d, $J_{\text{C,F}} = 8,0$ Hz); 129,41 (d, $J_{\text{C,F}} = 16,1$ Hz); 130,41 (d, $J_{\text{C,F}} = 5,3$ Hz); 161,09 (d, $J_{\text{C,F}} = 244,5$ Hz)	
IR (cm^{-1})	
3383, 2975, 2931, 1691, 1638, 1492, 1453, 1423, 1366, 1324, 1277, 1228, 1161, 1127, 1086, 1033, 966, 863, 804, 757	
ESI-HRMS	izračunana za $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NF}$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 246,1658 izmerjena: 246,1657
HPLC	95.1% ($t_{\text{R}} = 9.20$ min)

4.18 Sinteza (*E*)-4-(3-fluorostiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (**23**)



Slika 22: Shema sinteze spojine 23

Sintetizirana po sinteznem postopku V.

Tabela 40: Zatehte reagentov pri sintezi spojine 23

Spojina 10	0,148 g; 0,48 mmol; 305,18 g/mol
K_2CO_3	0,234 g; 1,69 mmol; 138,205 g/mol
propargil bromid (80%)	62 μl ; 0,58 mmol; 119 g/mol; 1,38 g/ml

Tabela 41: Analizni podatki spojine 23

Izgled	svetlo rumeno olje
MF	etilacetat/heksan=1/2
Rf	0,27
Izkoristek	38%

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm)

1,57 (dt, 1H, $J_1 = 3,9$ Hz, $J_2 = 12,0$ Hz, Piperidin-H); 1,60 (dt, 1H, $J_1 = 3,9$ Hz, $J_2 = 11,9$ Hz, Piperidin-H); 1,78-1,85 (m, 2H, 2x Piperidin-H); 2,09-2,19 (m, 1H, Piperidin-H); 2,27 (t, 1H, $J = 2,5$ Hz, C≡CH); 2,31 (dt, $J_1 = 2,5$ Hz, $J_2 = 11,7$ Hz, 2x Piperidin-H); 2,92-2,98 (m, 2H, 2x Piperidin-H); 3,35 (d, 2H, $J = 2,5$ Hz, NCH₂C); 6,17 (dd, 1H, $J_1 = 6,9$ Hz, $J_2 = 16,0$ Hz, Ar-CH=CH); 6,34 (d, 1H, $J = 16,0$ Hz, Ar-CH=CH); 6,88 (ddt, 1H, $J_1 = 0,9$ Hz, $J_2 = 2,6$ Hz, $J_3 = 8,4$ Hz, ArH); 7,02-7,06 (m, 1H, ArH); 7,07-7,11 (m, 1H, ArH); 7,21-7,27 (m, 1H, ArH)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm)

31,71; 38,64; 47,14; 52,09; 73,32; 78,63; 112,39 (d, $J_{C,F} = 22,0$ Hz); 113,73 (d, $J_{C,F} = 21,3$ Hz); 121,87 (d, $J_{C,F} = 2,9$ Hz); 127,33 (d, $J_{C,F} = 2,9$ Hz); 129,85 (d, $J_{C,F} = 8,7$ Hz); 136,11; 139,95 (d, $J_{C,F} = 7,3$ Hz); 163,07 (d, $J_{C,F} = 244,9$ Hz)

IR (cm⁻¹)

3303, 2931, 2808, 2751, 1651, 1611, 1583, 491, 1466, 1445, 1385, 1364, 1336, 1312, 1267, 1245, 1140, 1106, 1074, 962, 939, 897, 873, 829, 809, 777, 684, 631, 590

ESI-HRMS

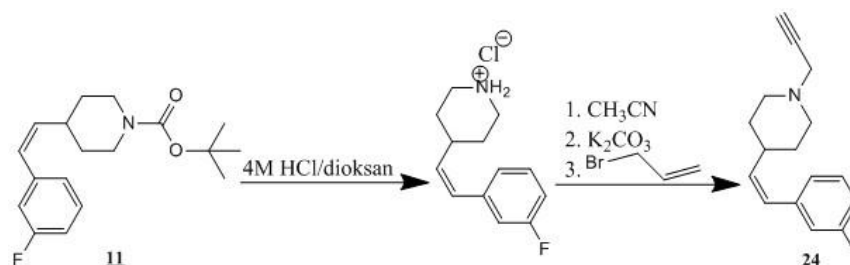
izračunana za C₁₆H₁₉NF (M+H⁺): 244,1502

izmerjena: 244,1504

HPLC

99.6% ($t_R = 9.15$ min)

4.19 Sinteza (Z)-4-(3-fluorostiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (24)



Slika 23: Shema sinteze spojine 24

Sintetizirana po sinteznem postopku V.

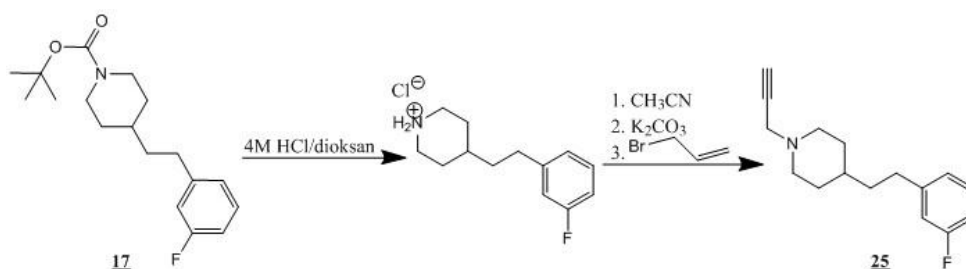
Tabela 42: Zatehte reagentov pri sintezi spojine 24

Spojina 11	0,195 g; 0,63 mmol; 305,18 g/mol
K ₂ CO ₃	0,309 g; 2,23 mmol; 138,205 g/mol
propargil bromid (80%)	82 µl; 0,76 mmol; 119 g/mol; 1,38 g/ml

Tabela 43: Analizni podatki spojine 24

Izgled	belorumena oborina
MF	etilacetat/heksan=1/2
Rf	0,19
Izkoristek	12%
Tališče [°C]	51-53°C
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm)	
1,49-1,60 (m, 2H, 2xPiperidin-H); 1,69-1,76 (m, 2H, 2xPiperidin-H); 2,23 (dt, J ₁ = 2,5 Hz, J ₂ = 11,7 Hz, 2x Piperidin-H); 2,24 (t, 1H, J= 2,4 Hz, C≡CH); 2,42-2,58 (m, 1H, Piperidin-H); 2,84-2,90 (m, 2H, 2x Piperidin-H); 3,30 (d, 2H, J= 2,4 Hz, NCH ₂ C); 5,53 (dd, 1H, J ₁ = 10,2 Hz, J ₂ = 11,6 Hz, Ar-CH=CH); 6,33 (d, 1H, J= 11,7 Hz, Ar-CH=CH); 6,90-6,95 (m, 2H, ArH); 6,98-7,02 (m, 1H, ArH); 7,25-7,32 (m, 1H, ArH)	
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm)	
32,16; 34,44; 47,22; 51,81; 73,02; 78,96; 113,45 (d, J _{C,F} = 21,2 Hz); 115,18 (d, J _{C,F} = 21,3 Hz); 124,22 (d, J _{C,F} = 2,8 Hz); 127,02 (d, J _{C,F} = 2,1 Hz); 129,63 (d, J _{C,F} = 8,6 Hz); 138,30; 139,76 (d, J _{C,F} = 7,9 Hz); 162,67 (d, J _{C,F} = 245,2 Hz)	
IR (cm⁻¹)	
3304, 2924, 2851, 2805, 2755, 1611, 1580, 1513, 1487, 1465, 1444, 1386, 1364, 1335, 1311, 1272, 1247, 1231, 1138, 1124, 1105, 1073, 1018, 973, 937, 923, 878, 792, 764, 752, 694, 667, 634	
ESI-HRMS	izračunana za C ₁₆ H ₁₉ NF (M+H ⁺): 244,1502 izmerjena: 244,1504
HPLC	97.9% (t _R = 9.10 min)

4.20 Sinteza 1-(prop-2-in-1-il)-4-(3-fluorofenil)piperidina (**25**)



Slika 24: Shema sinteze spojine 25

Sintetizirana po sinteznem postopku V.

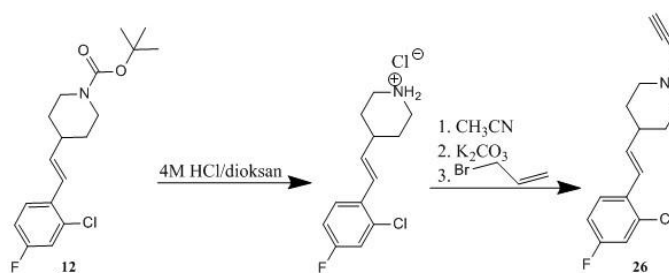
Tabela 44: Zatehte reagentov pri sintezi spojine 25

Spojina 17	0,701 g; 2,28 mmol; 307,38 g/mol
K ₂ CO ₃	1,1 g; 7,98 mmol; 138,205 g/mol
propargil bromid (80%)	295 µl; 2,73 mmol; 119 g/mol; 1,38 g/ml

Tabela 45: Analizni podatki spojine 25

Izgled	rumeno olje
MF	etilacetat/heksan=1/2
Rf	0,18
Izkoristek	18%
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm)	
1,23-1,37 (m, 3H, 3x Piperidin-H); 1,53-1,59 (m, 2H, CH ₂); 1,72-1,78 (m, 2H, 2x Piperidin-H); 2,14-2,21 (m, 2H, 2x Piperidin-H); 2,24 (t, 1H, <i>J</i> = 2,4 Hz, C≡CH); 2,59-2,64 (m, 2H, CH ₂); 2,85-2,90 (m, 2H, 2x Piperidin-H); 3,30 (d, 2H, <i>J</i> = 2,4 Hz, NCH ₂ C); 6,83-6,89 (m, 2H, ArH); 6,92-6,95 (m, 1H, ArH); 7,19-7,25 (m, 1H, ArH)	
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm)	
32,09; 32,77; 34,64; 37,89; 47,14; 52,44; 72,92; 79,04; 112,46 (d, <i>J</i> _{C,F} = 21,9 Hz); 115,04 (d, <i>J</i> _{C,F} = 20,5 Hz); -123,90 (d, <i>J</i> _{C,F} = 2,2 Hz); 129,61 (d, <i>J</i> _{C,F} = 8,7 Hz); 145,19 (d, <i>J</i> _{C,F} = 7,2 Hz); 162,84 (d, <i>J</i> _{C,F} = 245,0 Hz)	
IR (cm⁻¹)	
3305, 2919, 2849, 2803, 2755, 1616, 1588, 1488, 1466, 1446, 1387, 1367, 1337, 1312, 1251, 1183, 1139, 1125, 1105, 1085, 1021, 995, 976, 959, 934, 888, 866, 782, 741, 719, 691, 629	
ESI-HRMS	izračunana za C ₁₆ H ₂₁ NF (M+H ⁺): 246,1658 izmerjena: 246,1659
HPLC	97.6% (<i>t</i> _R = 9.26 min)

4.21 Sinteza (*E*)-4-(2-kloro-4-fluorostiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (**26**)



Slika 25: Shema sinteze spojine 26

Sintetizirana po sinteznem postopku V.

Tabela 46: Zatehte reagentov pri sintezi spojine 26

Spojina 12	0,218 g; 0,63 mmol; 345,19 g/mol
K ₂ CO ₃	0,305 g; 2,21 mmol; 138,205 g/mol
propargil bromid (80%)	82 µl; 0,75 mmol; 119 g/mol; 1,38 g/ml

Tabela 47: Analizni podatki spojine 26

Izgled	svetlo rumeno olje
MF	etilacetat/heksan=1/2
Rf	0,18
Izkoristek	58%

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm)

1,56 (dt, 1H, $J_1 = 3,9$ Hz, $J_2 = 12,0$ Hz, Piperidin-H); 1,59 (dt, 1H, $J_1 = 3,9$ Hz, $J_2 = 11,9$ Hz, Piperidin-H); 1,76-1,85 (m, 2H, 2x Piperidin-H); 2,12-2,23 (m, 1H, Piperidin-H); 2,25 (t, 1H, $J = 2,4$ Hz, C≡CH); 2,28 (dt, $J_1 = 2,5$ Hz, $J_2 = 11,7$ Hz, 2x Piperidin-H); 2,90-2,96 (m, 2H, 2x Piperidin-H); 3,32 (d, 2H, $J = 2,4$ Hz, NCH₂C); 6,07 (dd, 1H, $J_1 = 7,1$ Hz, $J_2 = 15,9$ Hz, Ar-CH=CH); 6,68 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz, Ar-CH=CH); 6,90-6,95 (m, 1H, ArH); 7,08 (dd, 1H, $J_1 = 2,6$ Hz, $J_2 = 8,5$ Hz, ArH); 7,47 (dd, 1H, $J_1 = 6,1$ Hz, $J_2 = 8,8$ Hz, ArH)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm)

31,87; 38,93; 47,18; 52,10; 72,95; 78,99; 114,11 (d, $J_{C,F} = 21,3$ Hz); 116,57 (d, $J_{C,F} = 24,7$ Hz); 123,61; 127,49 (d, $J_{C,F} = 8,8$ Hz); 131,98 (d, $J_{C,F} = 3,7$ Hz); 133,00 (d, $J_{C,F} = 10,2$ Hz); 137,51 (d, $J_{C,F} = 1,7$ Hz); 161,33 (d, $J_{C,F} = 249,4$ Hz)

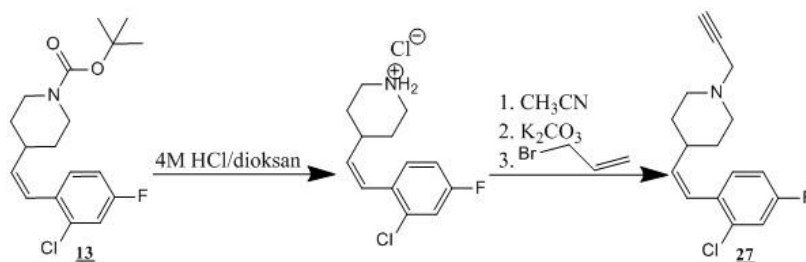
IR (cm⁻¹)

3303, 2933, 2803, 2753, 1650, 1600, 1574, 1466, 1445, 1396, 1364, 1336, 1312, 1269, 1258, 1237, 1183, 1137, 1122, 1040, 966, 904, 858, 805, 776, 760, 686, 627, 579

ESI-HRMS izračunana za C₁₆H₁₈NFCl (M+H⁺): 278,1112
izmerjena: 278,1120

HPLC 100% (t_R = 9.86 min)

4.22 Sinteza (Z)-4-(2-kloro-4-fluorostiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (**27**)



Slika 26: Shema sinteze spojine 27

Sintetizirana po sinteznem postopku V.

Tabela 48: Zatehte reagentov pri sintezi spojine 27

Spojina 13	0,260 g; 0,75 mmol; 345,19 g/mol
K ₂ CO ₃	0,364 g; 2,63 mmol; 138,205 g/mol
propargil bromid (80%)	97 µl; 0,90 mmol; 119 g/mol; 1,38 g/ml

Tabela 49: Analizni podatki spojine 27

Izgled	belorumena oborina
MF	etilacetat/heksan=1/2
Rf	0,19
Izkoristek	6%
Tališče [°C]	51-53 °C

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm)

1,48-1,59 (m, 2H, 2x Piperidin-H); 1,62-1,70 (m, 2H, 2x Piperidin-H); 2,13-2,31 (m, 4H, J= 2,4 Hz, C≡CH + 3x Piperidin-H); 2,82-2,88 (m, 2H, 2x Piperidin-H); 3,28 (d, 2H, J= 2,4 Hz, NCH₂C); 5,61 (dd, 1H, J₁= 10,4 Hz, J₂= 10,8 Hz, Ar-CH=CH); 6,35 (d, 1H, J= 11,5 Hz, Ar-CH=CH); 6,96 (dt, 1H, J₁= 2,4 Hz, J₂= 8,4 Hz, ArH); 7,14 (dd, 1H, J₁= 2,4 Hz, J₂= 8,4 Hz, ArH); 7,19 (dd, 1H, J₁= 6,4 Hz, J₂= 8,2 Hz, ArH)

 ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm)

32,09; 34,57; 47,22; 51,78; 72,98; 78,97; 113,65 (d, $J_{\text{C,F}} = 20,7$ Hz); 116,71 (d, $J_{\text{C,F}} = 24,8$ Hz); 124,52; 130,94 (d, $J_{\text{C,F}} = 8,3$ Hz); 132,07 (d, $J_{\text{C,F}} = 3,7$ Hz); 134,16 (d, $J_{\text{C,F}} = 10,2$ Hz); 138,66; 161,37 (d, $J_{\text{C,F}} = 248,6$ Hz)

IR (cm^{-1})

3166, 3010, 2932, 2789, 2758, 1601, 1574, 1485, 1467, 1445, 1403, 1390, 1367, 1331, 1307, 1295, 1271, 1257, 1230, 1221, 1210, 1169, 1142, 1121, 1109, 1064, 1041, 1016, 1006, 973, 951, 901, 875, 863, 821, 790, 768, 747, 704, 687, 643, 615, 583, 547

ESI-HRMS

izračunana za $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{NFCl}$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 278,1112

izmerjena: 278,1105

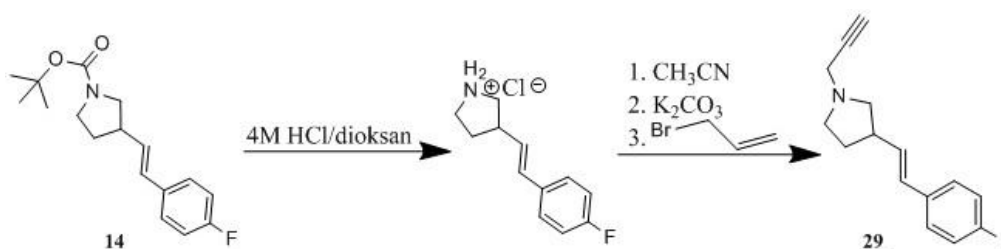
HPLC

99.7% ($t_{\text{R}} = 9.85$ min)

4.23 Sinteza 1-(prop-2-in-1-il)-4-(2-kloro-4-fluorofenetil)piperidina (**28**)

Sinteza je bila izvedena po sinteznem postopku V, vendar končne spojine nismo dobili.

4.24 Sinteza (*E*)-3-(4-fluorostiril)-1-(prop-2-in-1-il)pirolidina (**29**)



Slika 27: Shema sinteze spojine **29**

Sintetizirana po sinteznem postopku V.

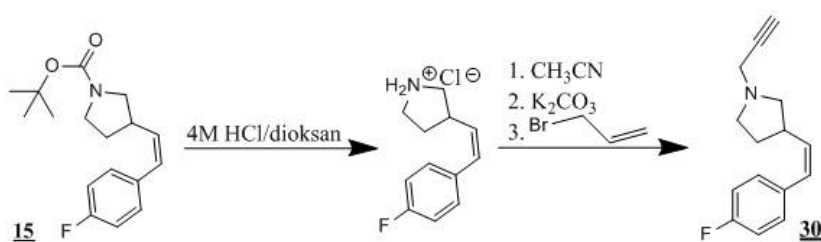
Tabela 50: Zatehte reagentov pri sintezi spojine **29**

Spojina 14	0,171 g; 0,58 mmol; 291,16 g/mol
K_2CO_3	0,284 g; 2,05 mmol; 138,205 g/mol
propargil bromid (80%)	76 μl ; 0,70 mmol; 119 g/mol; 1,38 g/ml

Tabela 51: Analizni podatki spojine 29

Izgle	rumeno olje
MF	etilacetat/heksan=2/1
Rf	0,18
Izkoristek	65%
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm)	
1,66-1,74 (m, 1H, Pirolidin-H); 2,11-2,19 (m, 1H, Pirolidin-H); 2,23 (t, 1H, <i>J</i> = 2,4 Hz, C≡CH); 2,50 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 6,7 Hz, <i>J</i> ₂ = 8,6 Hz, Pirolidin-H); 2,72 (dt, 1H, <i>J</i> ₁ = 5,5 Hz, <i>J</i> ₂ = 8,8 Hz, Pirolidin-H); 2,77-2,83 (m, 1H, Pirolidin-H); 2,92-3,02 (m, 2H, 2xPirolidin-H); 3,44 (d, 2H, <i>J</i> = 2,4 Hz, NCH ₂ C); 6,12 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,1 Hz, <i>J</i> ₂ = 15,8 Hz, Ar-CH=CH); 6,34 (d, 1H, <i>J</i> = 15,8 Hz, Ar-CH=CH); 6,94-7,00 (m, 2H, ArH); 7,26-7,32 (m, 2H, ArH)	
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm)	
31,68; 41,46; 42,79; 52,13; 58,40; 72,55; 79,21; 115,32 (d, <i>J</i> _{C,F} = 22,1 Hz); 127,44 (d, <i>J</i> _{C,F} = 8,1 Hz); 128,02; 133,11 (d, <i>J</i> _{C,F} = 2,2 Hz); 133,48; 161,96 (d, <i>J</i> _{C,F} = 245,7 Hz)	
IR (cm⁻¹)	
3299, 2960, 2916, 2799, 1655, 1603, 1508, 1480, 1439, 1370, 1329, 1223, 1157, 1133, 1094, 067, 1013, 966, 898, 854, 812, 772, 633, 569	
ESI-HRMS	izračunana za C ₁₅ H ₁₇ NF (M+H ⁺): 230,1345 izmerjena: 230,1340
HPLC	95,3% (<i>t</i> _R = 8,83 min)

4.25 Sinteza (Z)-3-(4-fluorostiril)-1-(prop-2-in-1-il)pirolidina (30)



Slika 28: Shema sinteze spojine 30

Sintetizirana po sinteznem postopku V.

Tabela 52: Zatehte reagentov pri sintezi spojine 30

Spojina 15	0,183 g; 0,62 mmol; 291,16 g/mol
K ₂ CO ₃	0,304 g; 2,2 mmol; 138,205 g/mol
propargil bromid (80%)	81,5 µl; 0,75 mmol; 119 g/mol; 1,38 g/ml

Tabela 53: Analizni podatki spojine 30

Izgled	rumeno olje
MF	etilacetat/heksan=2/1
Rf	0,27
Izkoristek	42%
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm)	
1,67 (tdd, <i>J</i> ₁ = 6,7 Hz, <i>J</i> ₂ = 8,4 Hz, <i>J</i> ₃ = 13,0 Hz, Pirolidin-H); 2,15 (dddd, <i>J</i> ₁ = 5,6 Hz, <i>J</i> ₂ = 7,7 Hz, <i>J</i> ₃ = 9,3 Hz, <i>J</i> ₄ = 13,0 Hz, Pirolidin-H); 2,23 (t, 1H, <i>J</i> = 2,4 Hz, C≡CH); 2,47 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 7,0 Hz, <i>J</i> ₂ = 9,2 Hz, Pirolidin-H); 2,71-2,81 (m, 2H, 2x Pirolidin-H); 2,92 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 7,8 Hz, <i>J</i> ₂ = 9,2 Hz, Pirolidin-H); 3,24-3,35 (m, 1H, Pirolidin-H); 3,43 (d, 2H, <i>J</i> = 2,4 Hz, NCH ₂ C); 5,66 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 10,2 Hz, <i>J</i> ₂ = 11,3 Hz, Ar-CH=CH); 6,36 (d, 1H, <i>J</i> = 11,4 Hz, Ar-CH=CH); 6,98-7,04 (m, 2H, ArH); 7,17-7,22 (m, 2H, ArH)	
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm)	
32,58; 36,42; 42,73; 52,20; 58,98; 72,55; 79,18; 115,05 (d, <i>J</i> _{C,F} = 21,4 Hz); 127,41; 130,09 (d, <i>J</i> _{C,F} = 7,7 Hz); 133,24 (d, <i>J</i> _{C,F} = 3,5 Hz); 135,77; 161,60 (d, <i>J</i> _{C,F} = 246,0 Hz)	
IR (cm⁻¹)	
3301, 3008, 2957, 2910, 2798, 1689, 1602, 1508, 1480, 1426, 1398, 1369, 1346, 1326, 1221, 1157, 1129, 1097, 1067, 1014, 969, 900, 840, 747, 704, 662, 633, 554	
ESI-HRMS	izračunana za C ₁₅ H ₁₇ NF (M+H ⁺): 230,1345 izmerjena: 230,1343
HPLC	96,8% (<i>t</i> _R = 8,74 min)

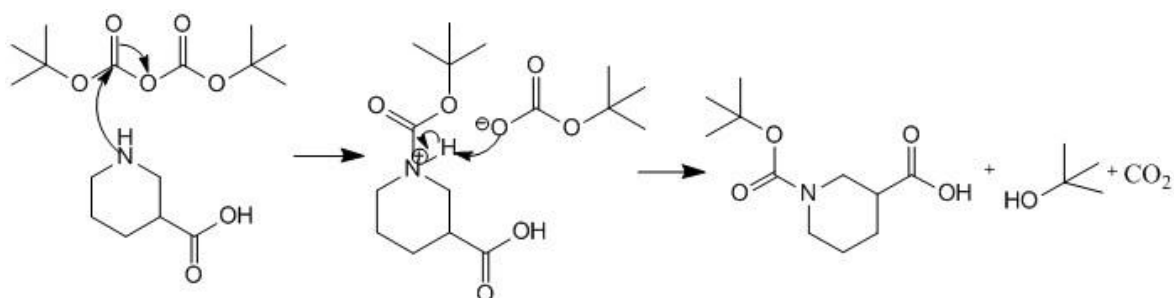
4.26 Sinteza 1-(prop-2-in-1-il)-3-(4-fluorofenil)pirolidina (**31**)

Sinteza je bila izvedena po sinteznem postopku V, vendar končne spojine nismo dobili.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 Zaščita funkcionalne skupine – I. stopnja

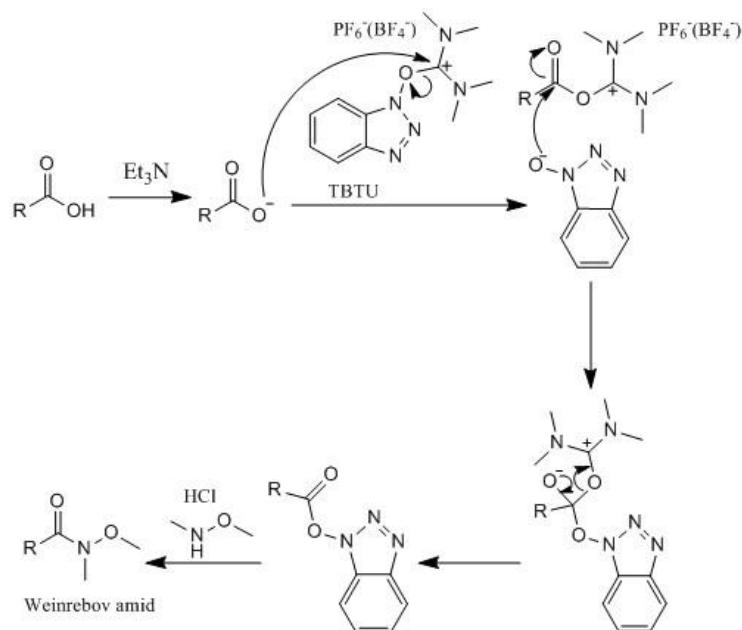
Pri prvem sinteznem postopku in v samem začetku eksperimentalnega dela smo izvedli zaščito funkcionalne skupine. Kadar imamo reaktant z več funkcionalnimi skupinami, ki bi lahko reagirale v nadaljnjih stopnjah, pri čemer bi dobili več različnih produktov, jih moramo začasno zaščititi tj. narediti manj reaktivne. Zaradi tega smo izvedli zaščito amino skupine v obliki *tert*-butilkarbamata. Za to zaščito smo se odločili zato, ker ne reagira pri katalitskem hidrogeniranju, ki je v vmesna stopnja II pri sintezi. *N*-aciliranje je mehanizem reakcije, pri čemer aminska skupina nuklefilno napade eno karbonylni skupino Boc_2O . Topila, ki smo jih uporabili, so dioksan, v katerem je topen Boc_2O , ter NaOH, v katerem je topna piperidin-3-karboksilna kislina. Po končani reakciji smo zaščiteno spojino previdno nakisali z HCl do pH 2-3, ker smo hoteli doseči, da je naš produkt v neionizirani obliki. Z ekstrakcijami z dietileterom in etilacetatom smo se znebili prebitnega Boc_2O , *tert*-butanola in nezreagirane piperidin-3-karboksilne kisline. (22, 23)



Slika 29: Mehanizem zaščite amina z uvedbo Boc_2O (prirejeno po 24)

5.2 Sinteza Weinrebvih amidov – II. stopnja

Weinrebvi amidi se sintetizirajo z reakcijo med *N,O*-dimetilhidroksilaminijevim kloridom in ustreznim derivatom karboksilne kisline. Kisline smo aktivirali s pomočjo sklopitvenega reagenta TBTU, za boljši izkoristek reakcije pa smo dodali še HOBt. Pri tem smo dobili bolj reaktivne intermediate in boljšo reakcijo z aminom. Karboksilno skupino smo ionizirali z bazo Et_3N . (25, 26)



Slika 30: Sinteza Weinrebovega amida (prirejeno po 26)

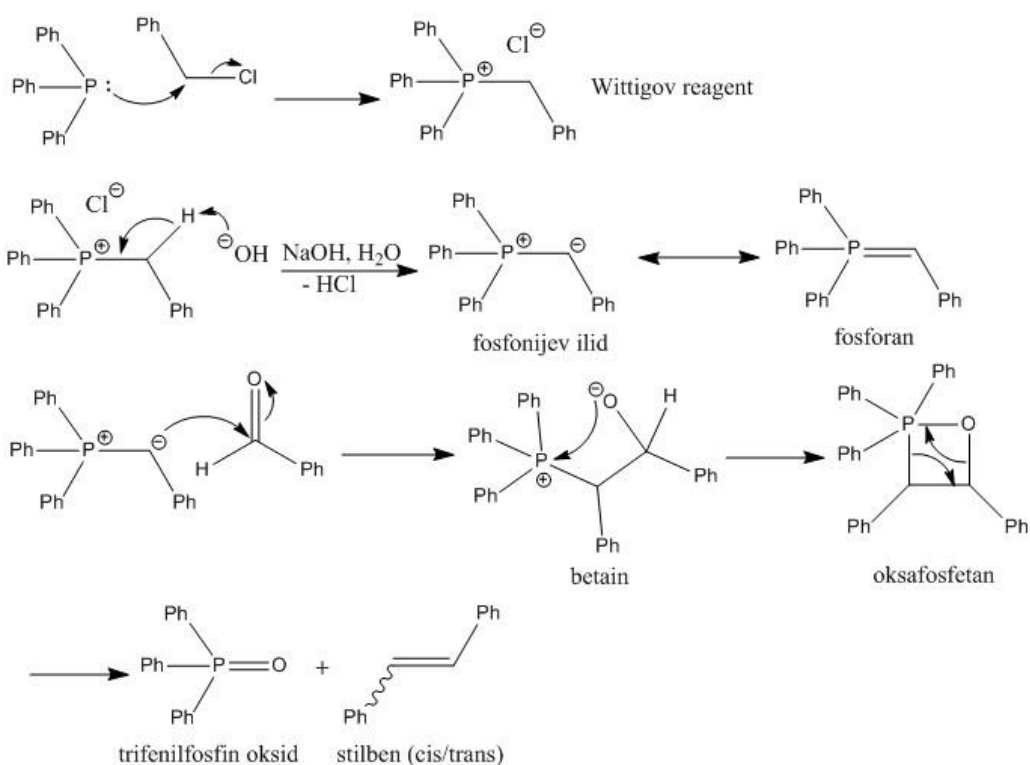
5.3 Redukcija do aldehida – III. stopnja

Izvedli smo redukcijo z močnim nukleofilnim reducentom LiAlH_4 . Da bi se reakcija ustavila pri tetraedričnem intermediatu, ki je relativno stabilen, smo pri redukciji uporabili brezvodno topilo THF. Po 1,5 uri smo dodali nasičeno raztopino NaHCO_3 , zaradi katere tetraedrični intermedat preide v aldehyd. Zelo pomembno je, da se reakcija izvaja na ledeni kopeli (nizka temperatura), ker ob višji temperaturi nastane terciarni amin. (27) Zaradi burne reakcije LiAlH_4 z vodo smo skozi celotno reakcijo zagotavljali inertno atmosfero z argonom.

5.4 Priprava Wittigovega reagenta in Wittigova reakcija – vmesna stopnja I in IV. stopnja

Preden smo začeli z Wittigovo reakcijo, smo v vmesni stopnji sintetizirali fosfonijevo sol (fosforan), ki nastopa kot reagent pri Wittigovi reakciji. Fosfonijevo sol smo dobili z reakcijo trifenilfosfina in alkil halogenida. Wittigova reakcija se uporablja pri sintezi alkenov (tvorba dvojne vezi) v reakciji aldehida ali ketona s fosfonijevim ilidom (fosforanom), čemur sledi nastanek ustreznega alkena in trifenilfosfin oksida. Začetni korak pri mehanizmu reakcije je nukleofilna adicija negativno nabitega atoma ogljika ilida na karbonilni ogljikov atom aldehida. Ilid, ki ima negativno nabit ogljik, smo pripravili z uporabo močne baze KHMDS v toluenu. Pri tem nastane vmesni produkt betain, ki v

procesu ciklizacije preide v drugi vmesni produkt oksafosfetan. Z nadaljnjim potekom reakcije pride do eliminacije in nastanka alkena. Reakcija je dejansko kondenzacija, lahko pa na njo gledamo tudi kot na redukcijo karbonilne spojine v alken. Prednost Wittigove reakcije je možnost vpliva na stereoselektivnost reakcije, in sicer z izbiro ustreznega ilida. Razlikujemo stabilne, polstabilne in nestabilne ilide. Stabilni ilidi so manj reaktivni in v reakciji z aldehydom večinoma dajo *E*-alkene (trans-stereoselektivnost), nestabilni pa *Z*-alkene (cis-stereoselektivnost). Stereoizomeri cis in trans imajo različne fizikalne (tališče, vrelišče, topnost), kemijske in spektroskopske lastnosti. Ker imajo različen retencijski faktor, smo lahko za ločevanje uporabili kolonsko kromatografijo. (28, 29, 30)

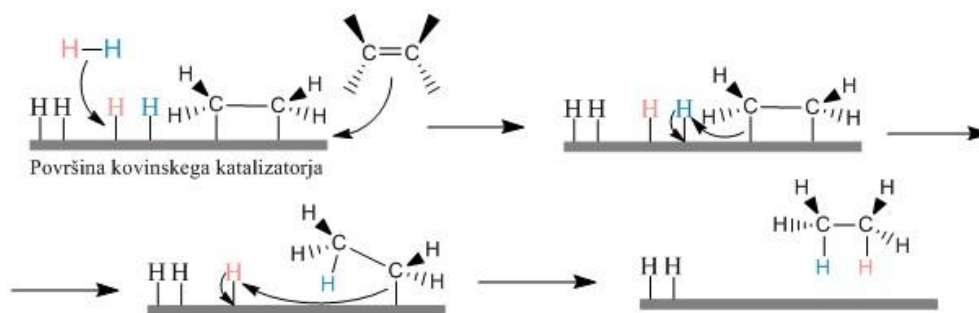


Slika 31: Mehanizem tvorbe fosfonijeve soli in Wittigove reakcije do nastanka cis in trans alkenov (prirejeno po 28)

5.5 Katalitsko hidrogeniranje – vmesna stopnja II

Hidrogeniranje je reakcija adicije, kjer se dvojni vezi alkena dodata dva atoma vodika, kar ima za posledico tvorbo nasičenega alkana. To je termodinamsko ugodna reakcija, ker tvori stabilnejši (nizkoenergetski) produkt. Z drugimi besedami, energija produkta je nižja od energije reaktanta, reakcija je eksotermna (toplota se sprošča). Čeprav je hidrogeniranje alkena termodinamsko ugodna reakcija, se ne bo nadaljevala brez dodajanja katalizatorja. Iz tega razloga smo kot katalizator uporabili paladij na ogljiku. S prisotnostjo kovinskega

katalizatorja se vodikove vezi plina cepijo in vsak vodik se veže na kovinsko katalizatorsko površino in tvori kovinsko-vodikovo vez. Kovinski katalizator prav tako adsorbira alken na površino. Atom vodika se nato prenese na alken in tvori novo vez C-H. Drugi atom vodika se prenese tako, da tvori drugo vez C-H. Dva vodika sta dodana ogljikoma na dvojni vezi in tvorita alkan. Zaradi fizične razporeditve alkena in vodika na površini ravnega kovinskega katalizatorja se morata oba vodika dodati na isto stran dvojne vezi, zato govorimo o sin adiciji. (27)



Slika 32: Shematski prikaz katalitskega hidrogeniranja (prirejeno po 30)

5.6 Odščita funkcionalne skupine in *N*-alkiliranje – V. stopnja

Pred vezavo propargilne skupine, smo morali najprej izvesti odščito amino skupine. Odščito smo naredili z acidolizo s pomočjo raztopine HCl v dioksanu. Pri acidolizi se vodik veže na karbonilno skupino, pri čemer nastane derivat karbaminske kisline in *tert*-butilni karbokation. Sledi dekarboksilacija, kot stranski produkt pa se sprošča CO₂. *Tert*-butilni kation reagira s prostim kloridnim ionom, tako da na koncu dobimo *tert*-butilklorid in odščiteni amin, ki je zaradi kislih pogojev v obliki kloridne soli. (23) Po odščiti smo lahko nadaljevali s sintezo. Propargilno skupino smo vpeljali z *N*-alkiliranjem, ki je organska reakcija med alkil halidom (propargil bromid) in aminom. Poteče reakcija nukleofilne substitucije. Pri reakciji smo kot bazo uporabili K₂CO₃, ki se ob nastanku končnega produkta pretvori v kalijev bromid. (32)

Izkoristki so bili v zadnji stopnji večinoma slabi, razen pri spojinah v *trans* obliki, ki so imele relativno dobre izkoristke (20, 23, 26 in 29). Dveh končnih spojin (28 in 31) na koncu sploh nismo uspeli sintetizirati. Možni razlogi bi lahko bili v samem sinteznem

postopku ali v izbiri reagentov, do izgub pa pride tudi pri čiščenju s kolonsko kromatografijo.

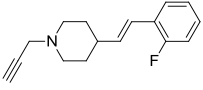
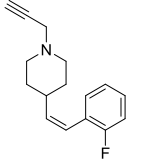
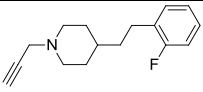
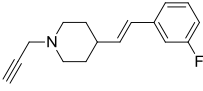
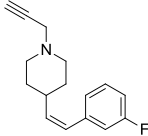
5.7 Analiza z NMR spektroskopsko metodo

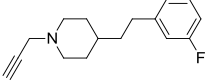
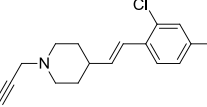
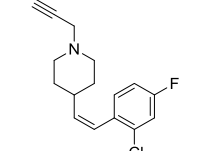
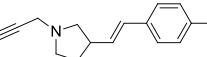
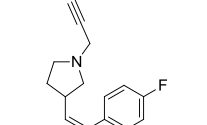
Z metodo NMR smo preverjali vse produkte vsake stopnje. S pomočjo te spektroskopske metode smo tudi ločevali med cis in trans konfiguracijo spojin. Kemijski premik cis protonov pri cis dvojni vezi je manjši od trans, poleg tega pa so sklopitvene konstante cis derivatov manjše od trans (pri cis derivatih so v območju med 10 in 11 Hz, pri trans pa 15-16Hz).

5.8 Rezultati in komentar biološkega testiranja

Z biokemičnim testom smo končnim sintetiziranim spojinam določili RA in IC₅₀ (pri spojinah, pri katerih je bil pri 100 μM RA manjši od 50%). RA je razmerje encimske aktivnosti ob prisotnosti in brez prisotnosti zaviralca. Čim nižja je RA encima ob prisotnosti spojine, tem večje je zaviralno delovanje te spojine.

Tabela 54: Rezultati biološkega testiranja spojin, podani v obliki RA encima pri 100 μM ali kot vrednosti IC₅₀ (krepko tiskane) za spojine, pri katerih smo dobili RA<50%

Oznaka	Struktura	<i>hMAO-A</i> IC ₅₀ [μM] ± SD	<i>hMAO-B</i> IC ₅₀ [μM] ± SD oz. RA pri 100 μM [%]
<u>20</u>		27,3 ±1,8	11,8 ±0,8
<u>21</u>		3,01 ±0.2	65,5 ±0.3%
<u>22</u>		5.9 ±0.2	14,2 ±0,7
<u>23</u>		6,9 ±0,9	5,05 ±1,2
<u>24</u>		0,068 ± 0,004	48,9 ±2,5

<u>25</u>		19,9 ±1,6	3,4 ±0,3
<u>26</u>		66,03 ±8,4	0,42 ±0,05
<u>27</u>		46,1 ±10,1	53,0 ±2,7
<u>29</u>		23,1 ±2,5	17,4 ±2,04
<u>30</u>		62,4 ±2,6	50,7 ±2,3

Iz rezultatov je razvidno, da v splošnem *cis* oblike močnejše zavirajo MAO-A, *trans* oblike pa MAO-B, razen pri spojini 30, ki je *cis* izomer s pirolidinskim obročem in nekoliko močnejše zavira MAO-B. Prav tako je tudi spojina 29 močnejši zaviralec MAO-B. Iz tega lahko sklepamo, da spojine s pirolidinskim obročem (29, 30) v primerjavi s spojinami s piperidinskim obročem, ne glede na njihovo stereoizomerno obliko, močnejše zavirajo encim MAO-B. Če primerjamo spojine 20-25, ki imajo vezan fluor na *orto* ali *meta* poziciji na benzenovem obroču, je opazno močnejše zaviranje encimov pri *meta* poziciji. *Para* substitucija s fluorom na fenilnem obroču in še dodatna substitucija s klorom na *orto* mestu pri spojini 26 vodita še do močnejšega zaviranja MAO-B in IC₅₀ vrednosti v nanomolarnem območju. Poleg tega smo dobili tudi spojino z večjo selektivnostjo za encim MAO-B. Pri spojinah 22 in 25, ki imajo namesto dvojne vezi enojno vez (reducirani derivati), je spojina 25 močnejši zaviralec MAO-B, vendar pa se po jakosti delovanja signifikantno ne razlikujejo v primerjavi s *trans* analogi. Glede na zaviralno delovanje obeh encimov pri spojinah 29 in 30 lahko sklepamo, da uvedba pirolidinskega obroča ni smiselna. Najmočnejše zaviranje od vseh sintetiziranih spojin ima spojina 24 (IC₅₀ = 68 nM), in sicer za encim MAO-A. Spojina 26 pa je najmočnejši zaviralec MAO-B. Spojina 21 pa je selektivni zaviralec MAO-A, saj praktično ne zavira delovanja encima MAO-B.

6 SKLEP

V magistrski nalogi smo uspešno sintetizirali 10 novih spojin in ovrednotili njihovo zaviralno delovanje na encimih MAO-A in MAO-B. Naši zaključki so sledeči:

- sintezni postopki so bili z izjemo zadnje (V.) stopnje, kjer so bili izkoristki zelo slabi in dveh spojin nismo dobili, ustrezni, saj smo dobili relativno dobre izkoristke. Spojine 20, 23, 26 in 29, ki so v trans obliki, so imele relativno dobre izkoristke, kar pomeni, da je postopek V. stopnje primeren za sintezo trans oblik;
- potrdili smo zaviralno delovanje spojin s propargilno skupino;
- selektivnost cis stereoizomerov za MAO-A in trans stereoizomerov za MAO-B lahko potrdimo. Odstopanje je bilo prisotno samo pri eni spojini (spojina 30);
- zamenjava piperidinskega obroča s pirolidinskim je zmanjšala zaviralno delovanje na MAO, kar pomeni, da so derivati s piperidinski obročem bolj perspektivni zaviralci MAO;
- uvedba Cl na aromatskem obroču je vodila do večje selektivnosti in močnejšega zaviranja MAO-B;
- spojina 24, ki izkazuje najmočnejše zaviralno delovanje na MAO-A, predstavlja najboljšo izhodiščno spojino za nadaljnje raziskave, prav tako pa je zanimiva tudi spojina 26, ki je močan zaviralec MAO-B.

S sintezo novih spojin smo prispevali k boljšemu razumevanju odnosa med samo strukturo derivatov propargilaminov in njenim zaviralnim delovanjem. Ena od nadaljnjih možnosti za spojine, ki kažejo obetavne rezultate, bi bilo testiranje njihovega delovanja na živalih (recimo *in vivo* testiranje na miših).

7 LITERATURA

1. Ribarić S.: Temelji patološke fiziologije, 2. izdaja; Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologiju, Ljubljana, 2011; 306-311
2. Cai Zhiyou: Monoamine Oxidase s: Promising Therapeutic Agents for Alzheimer's Disease (Review). *Molecular Medicine Reports* 2014; 9: 1533-1541
3. Jolene Ooi, Michael R. Hayden, Mahmoud A. Pouladi: Inhibition of Excessive Monoamine Oxidase A/B Activity Protects Against Stress-induced Neuronal Death in Huntington Disease. *Molecular Neurobiology* 2015; 52: 1850-1861
4. Ječmenica Dijana: Neurorehabilitacija Parkinsonove bolesti. Diplomski rad; Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; Zagreb, 2015
5. Brinar Vesna i suradnici: Neurologija za medicinare; Medicinska naklada, Zagreb, 2009; 272-283
6. Rang H. P., Ritter J. M., Flower R. J., Henderson G.: Rang & Dale's Pharmacology, 8th edition, Elsevier Ltd., 2016; 491-496, 570-588
7. Kecmanović Dušan: Psihijatrija, III, prerađeno i dopunjeno izdanje; Medicinska knjiga, Beograd-Zagreb, 1986; 205-216, 472-527
8. Miko Ivan: Etiologija depresije. Diplomski rad; Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; Zagreb, 2015
9. Ram Singh, Geetanjali, Naveen Sharma: Monoamine Oxidase Inhibitors for Neurological Disorders: A review. *Chemical Biology Letters* 2014; 1(1): 33-39
10. John P. M. Finberg: Update on the pharmacology of selective inhibitors of MAO-A and MAO-B: Focus on modulation of CNS monoamine neurotransmitter release. *Pharmacology & Therapeutics* 2014; 143: 133-152
11. Moussa B. H. Youdim, Dale Edmondson, Keith F. Tipton: The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Neuroscience* 2006; 7: 295-309
12. Kenneth I. Shulman, Nathan Herrmann, Scott E. Walker: Current Place of Monoamine Oxidase s in the Treatment of Depression. Springer International Publishing Switzerland 2013; 27: 789–797
13. Ronald A. Remick, Colleen Froese: Monoamine Oxidase Inhibitors: Clinical Review. *Canadian Family Physician* 1990; 36: 1151-1155
14. John P. M. Finberg, Jose M. Rabey: Inhibitors of MAO-A and MAO-B in Psychiatry and Neurology. *Frontiers in Pharmacology* 2016; 7: 340

15. D. E. Edmondson, A. Mattevi, C. Binda, M. Li, F. Hubálek: Structure and Mechanism of Monoamine Oxidase. *Current Medicinal Chemistry* 2004; 11: 1983-1993
16. Claudia Binda, Paige Newton-Vinson, Frantisek Hubálek, Dale E. Edmondson, Andrea Mattev: Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders. *Nature Structural Biology* 2001; 9: 22-26
17. Peter Riederer, Gerd Laux: MAO-s in Parkinson's Disease. *Experimental Neurobiology* 2011; 20: 1-17
18. Simone Carradori, Romano Silvestri: New Frontiers in Selective Human MAO B inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 2015; 58: 6717–6732
19. Paul B. Huleatt, Mui Ling Khoo, Yi Yuan Chua, Tiong Wei Tan, Rou Shen Liew, Balázs Balogh, Ruth Deme, Flóra Gölöncser, Kalman Magyar, David P. Sheela, Han Kiat Ho, Beáta Sperlágh, Péter Mátyus, Christina L. L. Chai: Novel Arylalkenylpropargylamines as Neuroprotective, Potent, and Selective Monoamine Oxidase B s for the Treatment of Parkinson's Disease. *Journal of Medicinal Chemistry* 2015; 58: 1400–1419
20. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002396/human_med_001847.jsp&mid=WC0b01ac058001d124 (dostop dne 1.5.2018.)
21. Mee-Sook Song, Dmitriy Matveychuk, Erin M. MacKenzie, Maryana Duchcherer, Darrell D. Mousseau, Glen B. Baker: An update on amine oxidases: Multifaceted drugs. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2013; 44: 118–124
22. Anderluh M., Mravljak J., Perdih A., Sova M. in Pečar S.: Farmacevtska kemija III, Vaje in seminarji: Dodatne vsebine za razumevanje, Metode N- in O-aciliranja; Fakulteta za Farmacijo, Ljubljana, oktober 2010;
23. Anderluh M., Mravljak J., Perdih A., Sova M. in Pečar S.: Farmacevtska kemija III, Vaje in seminarji: Dodatne vsebine za razumevanje, Zaščitne skupine; Fakulteta za Farmacijo, Ljubljana, oktober 2010;
24. http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_Mech.htm (dostop dne 7.6.2018.)

25. Vadim K. Khlestkin, Dmitrii G. Mazhukin: Recent Advances in the Application of N,O-Dialkylhydroxylamines in Organic Chemistry. *Current Organic Chemistry* 2003; 7: 967-993
26. Eric Valeur, Mark Bradley: Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *The Royal Society of Chemistry* 2009; 38: 606-631
27. Reinhard Bruckner: *Organic Mechanisms, Reactions, Stereochemistry and Synthesis*, 3rd edition; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010; 795-799, 806-809
28. Byrne Peter A., Declan G. Gilheany: The modern interpretation of the Wittig reaction mechanism. *Chemical Society Reviews* 2013; 42: 6670-6696
29. Razum Marta: Wittigova reakcija. Završni rad; Prirodoslovno – matematički fakultet, Kemijski odsjek; Zagreb, 2017
30. Levačić Marko: Sinteza, izolacija izomera i spektroskopska karakterizacija 2- I 3-[4-(2-vinilfenil)buta-1,3-dienil]tiofena. Završni rad; Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije; Zagreb, 2015
31. <https://chemistry.tutorvista.com/organic-chemistry/catalytic-hydrogenation.html>
(dostop dne 7.6.2018.)
32. Yogesh R. Jorapur, Jae Min Jeong, Dae Yoon Chi: Potassium carbonate as a base for the N-alkylation of indole and pyrrole in ionic liquids. *Tetrahedron Letters* 2006; 47(14): 2435-2438