

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŽIGA ŽIBRET

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM
FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŽIGA ŽIBRET

**SINTEZA TIOFENSKIH IN FURANSKIH
ANALOGOV 4-(4-FLUOROSTIRIL)-1-
PROPARGILPIPERIDINA KOT ZAVRALCEV
MONOAMINO OKSIDAZ**

**SYNTHESIS OF THIOPHENE AND FURAN-
BASED ANALOGUES OF 4-(4-FLUOROSTYRYL)-
1-PROPARGYLPIPERIDINE AS INHIBITORS OF
MONOAMINE OXIDASES**

UNIFORM MASTER'S STUDY PROGRAMME PHARMACY

Ljubljana, 2018

Magistrsko naložko sem opravljal na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sov, mag. farm. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Mateju Sovi, mag. farm., za vse nasvete, pomoč in usmerjanje pri izvedbi laboratorijskega dela ter za strokovni pregled magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi vsem ostalim, ki so k nastanku magistrske naloge kakorkoli pripomogli. Posebna zahvala pa gre družini za njihovo podporo tekom študija ter vsem prijateljem, ki so študijskim letom doprinesli dodano vrednost.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložko z naslovom Sinteza tiofenskih in furanskih analogov 4-(4-fluorostiril)-1-propargilpiperidina kot zaviralcev monoamino oksidaz izdelal samostojno, pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sov, mag. farm.

Žiga Žibret

Ljubljana, 2018

Predsednik komisije: prof. dr. Darko Černe, mag. farm., spec. med. biokem.

Članica komisije: doc. dr. Urša Pečar Fonović, univ. dipl. biol.

VSEBINA

VSEBINA	i
KAZALO SLIK	iv
KAZALO PREGLEDNIC	vi
POVZETEK	vii
ABSTRACT	viii
SEZNAM OKRAJŠAV	ix
1. UVOD	1
1.1. MONOAMIN OKSIDAZI A IN B	1
1.2. SUBSTRATNA IN STRUKTURNΑ SPECIFIČNOST IZOFORM	3
1.3. ZAVIRALCI MAO	4
1.3.1. REVERZIBILNI ZAVIRALCI MAO-A (RIMA)	6
1.3.2. IREVERZIBILNI ZAVIRALCI MAO-B	7
1.4. TERAPEVTSKA UPORABA	9
1.4.1. DUŠEVNE MOTNJE	9
1.4.2. PARKINSONOVA BOLEZEN (PB)	9
1.4.3. ALZHEIMERJEVA BOLEZEN (AB)	10
2. NAMEN DELA	11
3. MATERIALI IN METODE	12
3.1. REAGENTI, TOPILA IN LABORATORIJSKA OPREMA	12
3.2. KROMATOGRAFSKE METODE	12
3.2.1. TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA	12
3.2.2. KOLONSKA ADSORPCIJSKA KROMATOGRAFIJA	12
3.2.3. TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)	12
3.3. SPEKTROSKOPSKE METODE	13
3.3.1. JEDRSKA MAGNETNORESONANČNA SPEKTROSKOPIJA (NMR)	13
3.3.2. MASNA SPEKTROMETRIJA (MS)	13
3.4. DOLOČANJE TEMPERATURE TALIŠČA	13
3.5. POIMENOVANJE IN RISANJE SPOJIN	13
3.6. BIOKEMIJSKO TESTIRANJE	14
4. EKSPERIMENTALNO DELO	15
4.1. SINTEZA 1-(TERC-BUTOXIKARBONIL)PIPERIDIN-4-KARBOKSILNE	

KISLINE (1).....	15
4.2. SINTEZA TERC-BUTIL 4-(METOKSI(METIL)KARBAMOIL)-PIPERIDIN-1-KARBOKSILATA (2)	16
4.3. SINTEZA TERC-BUTIL 4-FORMILPIPERIDIN-1-KARBOKSILATA (3)	17
4.4. SINTEZA 5-KLORO-4-(KLOROSULFONIL)TIOFEN-2-KARBOKSILNE KISLINE (4).....	17
4.5. SINTEZNI POSTOPEK A: SINTEZA ALKIL N,N-DIMETILSULFON AMIDOV	18
4.5.1. Sinteza 5-kloro-4-(N,N-dimetilsulfamoil)tiofen-2-karboksilne kisline (5)	18
4.5.2. Sinteza 4-(N,N-dimetisulfamoil)benzojske kisline (6)	19
4.6. SINTEZNI POSTOPEK B: REDUKCIJA KISLINE V ALKOHOL	19
4.7. SINTEZNI POSTOPEK C: SINTEZA ALKIL BROMIDOV	20
4.7.1. Sinteza 4-(hidroksimetil)-N,N-dimetilbenzensulfonamida (7) in 4-(bromometil)-N,N-dimetilbenzensulfonamida (8)	20
4.7.2. Sinteza (5-klorotiofen-2-il)metanola (9) in 2-(bromometil)-5-klorotiofena (10)	21
4.7.3. Sinteza 5-(hidroksimetil)-N,N-dimetiltiofen-3-sulfonamida (11) in 5-(bromometil)-N,N-dimetiltiofen-3-sulfonamida (12)	21
4.8. SINTEZNI POSTOPEK D: SINTEZA WITTIGOVIH REAGENTOV	22
4.8.1. Sinteza ((5-klorobenzo[b]tiofen-3-il)metil)trifenilfosfonijevega bromida (13)	23
4.8.2. Sinteza trifenil((5-(trifluorometil)furan-2-il)metil)fosfonijevega bromida (14)	23
4.8.3. Sinteza ((5-klorotiofen-2-il)metil)trifenilfosfonijevega bromida (15)	23
4.8.4. Sinteza (4-(N,N-dimetilsulfamoil)benzil)trifenilfosfonijevega bromida (16)	23
4.8.5. Sinteza ((5-kloro-4-(N,N-dimetilsulfamoil)tiofen-2-il)metil)trifenilfosfonijevega bromida (17)	24
4.9. SINTEZNI POSTOPEK E: WITTIGOVA REAKCIJA	24
4.9.1. Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>E/Z</i>)-4-(2-(5-klorobenzo[b]tiofen-3-il)vinil)piperidin-1-karboksilata (18 in 19).....	25
4.9.2. Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>E/Z</i>)-4-(2-(5-(trifluorometil)furan-2-il)vinil)piperidin-1-karboksilata (20 in 21).....	26
4.9.3. Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>E/Z</i>)-4-(2-(5-klorotiofen-2-il)vinil)piperidin-1-karboksilata (22 in 23)	27
4.9.4. Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>E/Z</i>)-4-(4-(N,N-dimetilsulfamoil)stiril)piperidin-1-	

karboksilata (24 in 25).....	28
4.9.5. Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>E/Z</i>)-4-(2-(4-(<i>N,N</i> -dimetilsulfamoil)tiofen-2-il)vinil)piperidin-1-karboksilata (26 in 27)	29
4.10. SINTEZNI POSTOPEK F: ODSTRANITEV BOC ZAŠČITNE SKUPINE	30
4.11. SINTEZNI POSTOPEK G: ALKILACIJA PIPERIDINSKEGA DUŠIKA	31
4.11.1. Sinteza (<i>E</i>)-4-(2-(5-klorobenzo[b]tiofen-3-il)vinil)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (28)	32
4.11.2. Sinteza (<i>E</i>)-1-(prop-2-in-1-il)-4-(2-(5-(trifluorometil)furan-2-il)vinil)piperidina (29)	33
4.11.3. Sinteza (<i>Z</i>)-1-(prop-2-in-1-il)-4-(2-(5-(trifluorometil)furan-2-il)vinil)piperidina (30)	34
4.11.4. Sinteza (<i>E</i>)-4-(2-(5-klorotiofen-2-il)vinil)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (31) .	35
4.11.5. Sinteza (<i>Z</i>)-4-(2-(5-klorotiofen-2-il)vinil)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (32)..	36
4.11.6. Sinteza (<i>E</i>)- <i>N,N</i> -dimetil-4-(2-(1-(prop-2-in-1-il)piperidin-4-il)vinil)benzensulfonamida (33)	37
4.11.7. Sinteza (<i>Z</i>)- <i>N,N</i> -dimetil-4-(2-(1-(prop-2-in-1-il)piperidin-4-il)vinil)benzensulfonamida (34)	38
4.11.8. Sinteza (<i>E</i>)- <i>N,N</i> -dimetil-5-(2-(1-(prop-2-in-1-il)piperidin-4-il)vinil)tiofen-3-sulfonamida (35).....	39
4.11.9. Sinteza (<i>Z</i>)- <i>N,N</i> -dimetil-5-(2-(1-(prop-2-in-1-il)piperidin-4-il)vinil)tiofen-3-sulfonamida (36).....	40
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	41
5.1. KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV	41
5.1.1. UVEDBA ZAŠČITNE SKUPINE BOC	41
5.1.2. SINTEZA WEINREBOVEGA AMIDA IN REDUKCIJA DO ALDEHIDA..	41
5.1.3. SINTEZA WITTIGOVIH REAGENTOV	42
5.1.4. WITTIGOVA REAKCIJA	44
5.1.5. ODSTRANITEV ZAŠČITNE SKUPINE BOC.....	45
5.1.6. ALKILACIJA PIPERIDINSKEGA DUŠIKA	46
5.2. REZULTATI IN KOMENTAR BIOLOŠKEGA VREDNOTENJA	46
6. SKLEP	50
7. LITERATURA	42

KAZALO SLIK

Slika 1: Mehanizem oksidativne deaminacije s prostetično skupino FAD	2
Slika 2: Metabolizem aldehidov.	2
Slika 3: Primerjava med aktivnimi mesti izoform MAO.....	3
Slika 4: Iproniazid in traničipromin, kot predstavnika prvih zaviralcev MAO	5
Slika 5: Mehanizem ponovnega privzema tiramina.....	6
Slika 6: Moklobemid, predstavnik skupine RIMA	7
Slika 7: Selegilin in razagilin kot predstavnika ireverzibilnih zaviralcev MAO-B	8
Slika 8: Načrtovane spremembe na dveh znanih zaviralcih	11
Slika 9: Oksidacija reagenta Amplex Red v resorufin.....	14
Slika 10: Reakcijska shema sinteze spojine <u>1</u>	15
Slika 11: Reakcijska shema sinteze spojine <u>2</u>	16
Slika 12: Reakcijska shema sinteze spojine <u>3</u>	17
Slika 13: Reakcijska shema sinteze spojine <u>4</u>	17
Slika 14: Reakcijska shema sinteze spojine <u>5</u>	18
Slika 15: Reakcijska shema sinteze spojine <u>6</u>	19
Slika 16: Reakcijska shema sinteze spojin <u>7</u> in <u>8</u>	20
Slika 17: Reakcijska shema sinteze spojin <u>9</u> in <u>10</u>	21
Slika 18: Reakcijska shema sinteze spojine <u>11</u> in <u>12</u>	21
Slika 19: Reakcijska shema sinteze spojin <u>13</u> - <u>17</u>	22
Slika 20: Reakcijska shema sinteze spojin <u>18</u> - <u>27</u>	24
Slika 21: Spojini <u>18</u> in <u>19</u>	25
Slika 22: Spojini <u>20</u> in <u>21</u>	26
Slika 23: Spojini <u>22</u> in <u>23</u>	27
Slika 24: Spojini <u>24</u> in <u>25</u>	28
Slika 25: Spojini <u>26</u> in <u>27</u>	29
Slika 26: Reakcijska shema odstranitve zaščitne skupine Boc	30
Slika 27: Reakcijska shema sinteze končnih spojin <u>28</u> - <u>36</u>	31
Slika 28: Končna spojina <u>28</u>	32
Slika 30: Končna spojina <u>29</u>	33
Slika 31: Končna spojina <u>30</u>	34
Slika 32: Končna spojina <u>31</u>	35

Slika 33: Končna spojina <u>32</u>	36
Slika 34: Končna spojina <u>33</u>	37
Slika 35: Končna spojina <u>34</u>	38
Slika 36: Končna spojina <u>35</u>	39
Slika 37: Končna spojina <u>36</u>	40
Slika 38: Mehanizem uvedbe zaščitne skupine Boc	41
Slika 39: Mehanizem redukcije Weinrebovega amida do aldehida.....	42
Slika 40: Mehanizem nastanka trifenilfosfonijeve soli.....	43
Slika 41: Mehanizem Wittigove reakcije preko betainskega intermediata.....	44
Slika 42: Danes veljaven mehanizem Wittigove reakcije.....	45

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Substituenti v sintezi Wittigovih reagentov.	23
Preglednica II: Substituenti v reagentih in produktih Wittigove reakcije.	24
Preglednica III: Substituenti v odščiti Boc in alkilaciji piperidinskega dušika	31
Preglednica IV: Rezultati biokemijskega testiranja	47

POVZETEK

Monoamin oksidaze (MAO) so encimi, ki se nahajajo na zunanji membrani mitohondrijev in katalizirajo oksidativno deaminacijo primarnih, sekundarnih in terciarnih aminov. Ločimo dve izoformi encima MAO: MAO-A in MAO-B, ki se razlikujeta po obliki in velikosti aktivnega mesta, ter posledično po substratih, ki sta jih sposobni metabolizirati. Zaviralci MAO so trenutno registrirani za terapijo depresije, Parkinsonove bolezni in različnih anksioznih motenj. Zaradi njihove vloge pri uravnavanju monoaminskih živčnih prenašalcev pa so izredno zanimivi zaradi potencialnih terapevtskih učinkov pri različnih duševnih boleznih, Alzheimerjevi bolezni in alkoholizmu.

V eksperimentalnem delu magistrske naloge smo načrtovali in sintetizirali benzenske, furanske in tiofanske analoge na osnovi dveh znanih zaviralcev MAO, 4-(4-fluorostiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina in 4-(4-(metilsulfonil)stiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina. Naša sintezna pot je obsegala *terc*-butil karbamatno (Boc) zaščito piperidin-4-karboksilne kisline, nadaljnjo redukcijo do aldehida preko Weinrebovega amida, Wittigovo reakcijo, odstranitev zaščite Boc, ter alkilacijo piperidinskega dušika. Uspešno smo sintetizirali devet izomerov *cis* in *trans* končnih spojin.

Sintetiziranim spojinam smo z biokemijskim testiranjem na izoliranih rekombinantnih človeških encimih MAO-A in MAO-B določili rezidualno aktivnost in srednjo zaviralno koncentracijo (IC_{50}). Kot najmočnejši zaviralec na MAO-B se je izkazala spojina (*E*)-*N,N*-dimetil-4-(2-(1-(prop-2-in-1-il)piperidin-4-il)vinil)benzensulfonamid (**33**) z vrednostjo IC_{50} 22 nM. Ugotovili smo, da so izomeri *trans* vsaj 10-krat močneje zavirali encim MAO-B, kot njihovi pripradajoči izomeri *cis*. Jakosti delovanja med ostalimi substituenti, kot so furan s trifluorometilno skupino (**29**), klorotiofensi (**31**) in tiofensulfonamidni substituent (**35**) pa so primerljive z našo izhodno spojino s fluorostirilnim fragmentom.

Zaključimo lahko, da spojina **33** predstavlja pomembno izhodišče za nadaljnji razvoj novih nanomolarnih zaviralcev MAO-B kot potencialnih zdravilnih učinkovin v terapiji nevrodegenerativnih bolezni.

Ključne besede: monoamin oksidaza, zaviralci MAO, Wittigova reakcija, nevrodegenerativne bolezni

ABSTRACT

Monoamine oxidases (MAO) are enzymes located on the outer mitochondrial membrane which catalyse oxidative deamination of primary, secondary and tertiary amines. Up to date, two isoforms of the enzyme MAO are known, MAO-A and MAO-B. They differ in shape and size of the active site and thus, their specificity for the substrates they metabolise. MAO inhibitors are currently registered for the treatment of depression, Parkinson's disease and various anxiety disorders. Due to their role in regulating monoamine neurotransmitters, they are of great interest due to the potential therapeutic effects in various mental illnesses, Alzheimer's disease and alcoholism.

As a part of this Master's thesis we designed and synthesized benzene, furan and thiophene analogues based on the known MAO inhibitors 4-(4-fluoro-styryl)-1-(prop-2-yn-1-yl)-piperidine and 4-(4-(methylsulfonyl)styryl)-1-(prop-2-yn-1-yl)-piperidine. Our synthetic pathway included *tert*-butyl carbamate (Boc) protection of piperidine-4-carboxylic acid, further reduction to aldehyde via Weinreb amide, Wittig reaction, removal of Boc protection and alkylation of piperidine nitrogen. We successfully synthesized nine *cis* and *trans* isomers of final compounds.

We evaluated synthesized final compounds biochemically by determining residual activity (RA) and half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) on isolated recombinant human enzymes MAO-A and MAO-B. The most potent inhibitor of MAO-B was (*E*)-*N,N*-dimethyl-4-(2-(1-(prop-2-yn-1-yl)piperidin-4-yl)vinyl)benzenesulfonamide (**33**) with an IC_{50} value of 22 nM. We found out that *trans* isomers are at least 10 times more potent inhibitors of MAO-B enzyme than its *cis* counterparts. The potency of analogues with other substituents such as furan with the trifluoromethyl group (**29**) or chlorothiophene (**31**) and thiophenesulfonamide substituent (**35**) are comparable with our starting compound with the fluorostyryl fragment.

To conclude, compound **33** represents an important starting point for further research of novel MAO-B inhibitors as potential therapeutic drugs for neurodegenerative diseases.

Keywords: monoamine oxidase, MAO inhibitors, Wittig reaction, neurodegenerative disorders

SEZNAM OKRAJŠAV

5-HT	Serotonin
AB	Alzheimerjeva bolezen
AK	Aminokislina
Boc	<i>Terc</i> -butil karbamat
CŽS	Centralni živčni sistem
DMSO	Dimetilsulfoksid
ekv.	Množinski ekvivalent
FAD	Flavin adenin dinukleotid
Hz	Hertz
IC ₅₀	Srednja zaviralna koncentracija
Ile	Izolevcin
J	Sklopitvena konstanta
KHMDS	kalijev bis(trimetilsilil)amid
MAO	Monoamin oksidaza
MAO-A	Monoamin oksidaza tipa A
MAO-B	Monoamin oksidaza tipa B
MS	Masna spektrometrija
NMR	Jedrska magnetnoresonančna spektroskopija
OPA	Oksafosfetan
PB	Parkinsonova bolezen
δ	Kemijski premik

1. UVOD

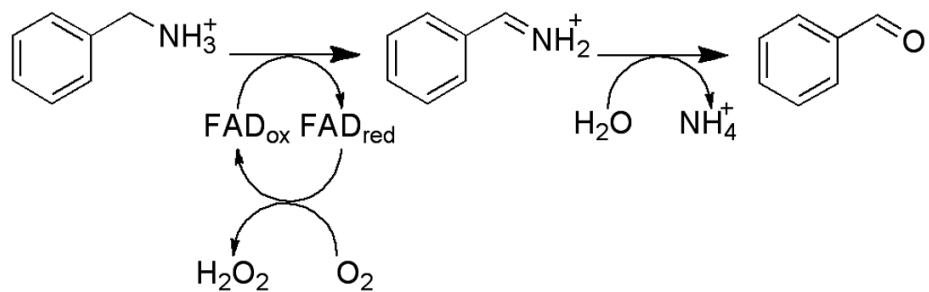
1.1. MONOAMIN OKSIDAZI A IN B

Monoamin oksidaze (MAO) so encimi, ki se nahajajo na zunanjih membranah mitohondrijev in katalizirajo oksidativno deaminacijo primarnih, sekundarnih in terciarnih aminov. Leta 1928 jih je odkrila Mary Bernheim v jetrih živalih in jih poimenovala tiramin oksidaze. Danes ločimo dve izoformi encima MAO: MAO-A in MAO-B, ki sta dva od najbolj raziskanih encimov na svetu in imata pomembno vlogo pri uravnavanju ravni živčnih prenašalcev (1, 2).

Izoencima imata 70 % podobnost v aminokislinskem zaporedju, podobno tridimensionalno strukturo in molekulske maso, razlikujeta pa se po substratni specifičnosti, selektivnosti zaviranja in tkivni razporeditvi (3). Kodirata ju dva različna gena, ki sta lokalizirana na kromosomu X. Med razvojem zarodka se MAO-A razvije pred MAO-B, nato pa se po rojstvu, koncentracija MAO-B v možganih drastično poveča in se povečuje vse do smrti. Oba encima sta prisotna v skoraj vseh tkivih v organizmu, medtem ko njuno razmerje v posameznih tkivih variira (4). Človeška MAO-A je predvsem prisotna v placenti, adipoznem tkivu, ščitnici in pljučih, manj prisotna pa je v možganih. Nasprotno, MAO-B je najbolj izražena prav v različnih delih centralnega živčnega sistema (CŽS) (hipotalamus, prefrontalni korteks, amigdala, hrbtenjača), bogat vir MAO-B pa so tudi maternica, ledvice, jetra in srce. V CŽS najdemo največ MAO-A v kateholaminergičnih nevronih, medtem ko je MAO-B bolj izražena v serotoninergičnih nevronih in celicah glie (5). MAO naj bi v perifernih tkivih skrbela za obrambo organizma z oksidacijo aminov v krvi ali pa s preprečitvijo njihovega vstopa v krvni obtok. V kapilarah krvno-možganske pregrade ima domnevno podobno obrambno funkcijo, saj služi kot metabolična pregrada. Nekateri viri tudi navajajo, da v perifernem živčnem sistemu in CŽS intranevralni MAO-A in MAO-B varujeta nevrone pred eksogenimi amini, prekineta delovanje aminskih nevrotransmitorjev ter regulirata znotrajcelične zaloge aminov (4).

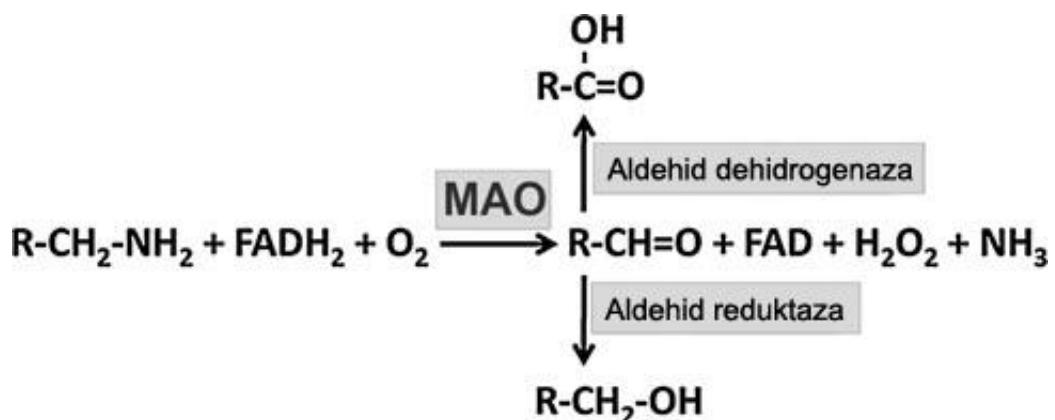
Na obeh izoformah MAO je kovalentno vezan kofaktor flavin-adenin-dinukleotid (FAD) v obliki 8α-S-cisteinil FAD, ki ima pomembno vlogo pri oksidaciji monoaminov. Reakcije potekajo po mehanizmu oksidativne deaminacije, kjer se primarni, sekundarni ali terciarni amin najprej pretvori v ustrezni iminski intermediat. Pri tem se flavinski kofaktor sprva reducira in nato re-oksidira v prvotno obliko z molekularnim kisikom, kar povzroči

nastajanje vodikovega peroksida (H_2O_2). Iminski intermediat se nato hidrolizira z neencimsko reakcijo do ustreznega aldehyda in amonijevega iona (Slika 1). MAO-A metabolizira seratonin (5-HT), adrenalin in noradrenalin, medtem ko MAO-B preferenčno metabolizira benzilamin in feniletilamin ter počasi tudi noradrenalin in 5-HT. Oba izoencima metabolizirata dopamin, tiramin in triptamin v enakem razmerju (1, 3).



Slika 1: Mehanizem oksidativne deaminacije s prostetično skupino FAD encima MAO. Pritejeno po (1).

H_2O_2 , ki nastane pri tej reakciji, ima lahko pomembne interakcije in signalne funkcije v možganih, medtem ko je aldehyd, ki je nastal pri deaminaciji 5-HT in noradrenalina lahko vpleten v regulacijo spanja. Oba produkta sta pri višjih koncentracijah toksična, zato se aldehydnih produkt naprej metabolizira z aldehyd dehidrogenazo do karboksilne kisline ali z aldehyd reduktazo do glikolov (Slika 2). H_2O_2 pa pred nastankom radikalov inaktivirajo superoksid-dismutaze, glutation-peroksidaze in katalaze (4, 5, 6).

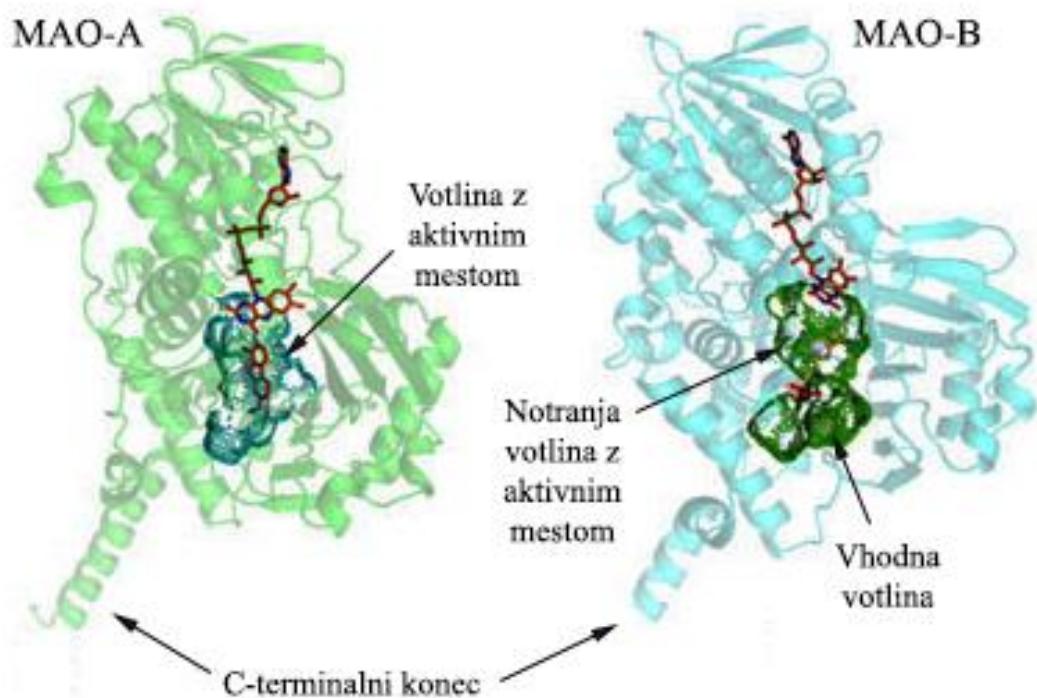


Slika 2: Metabolizem aldehydov, ki so nastali pri reakciji z MAO z aldehyd dehidrogenazo ali aldehyd reduktazo. Pritejeno po (5).

Aldehid, ki nastane iz dopamina, in je citotoksičen, se naj ne bi akumuliral v zdravih možganih. To je lahko pomembno pri Parkinsonovi bolezni, pri kateri je koncentracija aldehid dehidrogenaze v možganih v substanci nigri zelo zmanjšana. Taki aldehydi lahko z aminskimi skupinami tvorijo toksične spojine, kot npr. tetrahidropapaverolin, ki je bil povezan s parkinsonizmom in z alkoholno-sorodnimi nenormalnostmi (4).

1.2. SUBSTRATNA IN STRUKTURNA SPECIFIČNOST IZOFORM

Odkritje kristalnih struktur MAO-A in MAO-B je omogočilo nadaljnjo razumevanje mehanizma vezave substratov in katalize, kot tudi strukturnih zahtev za vezavo zaviralcev in njihovega zaviralnega delovanja. Na podlagi nedavnih študij z uporabo elektronske paramagnetne resonance so ugotovili, da se človeški in podganji izoformi MAO nahajata na zunanjih mitohondrijski membrani v obliki dimera. Encima, ki sta predstavljena na sliki 3, sta sestavljena iz treh domen, kjer so mesta za vezavo prostetične skupine FAD, substrata in encima na mitohondrijsko membrano (7, 8).



Slika 3: Primerjava med aktivnimi mesti izoform MAO. MAO-A je prikazana z zeleno, MAO-B pa s svetlo modro barvo. Votline v MAO-A in MAO-B so prikazane z modro in zeleno barvo. Prirejeno po (5).

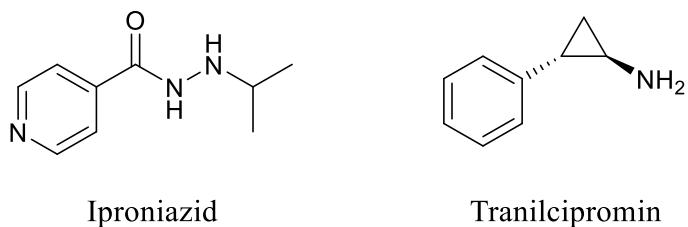
C-terminalni konec obeh izoform je transmembranska α -vijačnica, ki zasidra encim na mitohondrijsko zunanjou membrano tako, da ostanek encima gleda proti citoplazmi. Proti membrani pa so usmerjene tudi hidrofobne stranske verige aminokislin (AK), ki pomagajo pri dodatni stabilizaciji encima (9). Za vezavo substratov je pomembno mesto flavina N-5 v kofaktorju FAD v aktivnem mestu encima. Substrat z njim najprej tvori nestabilni kompleks, ki lahko razpade ali pa tvori kovalentno vez v primeru, ko se nanj veže ireverzibilni zaviralec (10).

Ena glavnih razlik med MAO-A in MAO-B je v obliki in konfiguraciji njunih vezavnih mest za substrate, katere predstavlja hidrofobna votlina, obdana z aminokislinskimi ostanki številnih aromatskih in alifatskih AK (4). Kristalne strukture človeških in podganjih MAO so razkrile, da pride do vezave substrata in oksidacije pri MAO-A v manjši, bolj kompaktni hidrofobni votlini, medtem ko je pri MAO-B za to zadolžena hidrofobna votlina, ki je sestavljena iz dveh delov. Obe votlini se raztezata od vezavnega mesta skupine FAD v jedru encima pa vse do površine encima. Volumen vezavne votline pri človeški MAO-A je $\sim 400 \text{ \AA}^3$ in pri človeški MAO-B $\sim 700 \text{ \AA}^3$. Votlina MAO-B je sestavljena iz dveh manjših votlin: substrat-vezavna votlina, ki meri $\sim 400 \text{ \AA}^3$ in vhodna votlina, ki meri $\sim 300 \text{ \AA}^3$. Ali je aktivno mesto ena sama velika votlina ali pa je sestavljena iz dveh manjših votlin, je odvisno od konformacije AK Ile199. Vezava ustreznega substrata povzroči, da se AK Ile199 zavrti in tako omogoči, da se manjši votlini združita v eno veliko votlino. Manjša vhodna votlina v izoformi MAO-B tako omogoči dostop samo manjšim hidrofobnim molekulam, kot sta benzilamin in feniletilamin, medtem ko je dostop večjim, hidroksiliranim aminom, kot npr. 5-HT, omejen. Širša vhodna votlina MAO-A, pa omogoči vezavo večjih, MAO-A selektivnih substratov, kot je 5-HT. Te značilnosti vezavnih mest za substrate tudi kontrolirajo vezavne značilnosti zaviralcev. Odkritje natančne strukture in lokacije vezavnih mest je izboljšalo razumevanje vezave velikih ligandov. Primer je izboljšano razumevanje vezave imidazolinov na MAO. Imidazolini so skupina spojin, ki imajo pomembne antihipertenzivne in potencialno antidepresivne lastnosti (4, 5, 10, 11).

1.3. ZAVIRALCI MAO

Prvi zaviralec MAO je bil odkrit po naključju v sredini 20. stoletja pri pacientih, ki so se zdravili za tuberkulozo. Eksperimenti so pokazali, da je proti-tuberkulozno zdravilo ioniazid tudi močan zaviralec MAO. Za strukturno sorodno spojino iproniazid (slika 4) pa

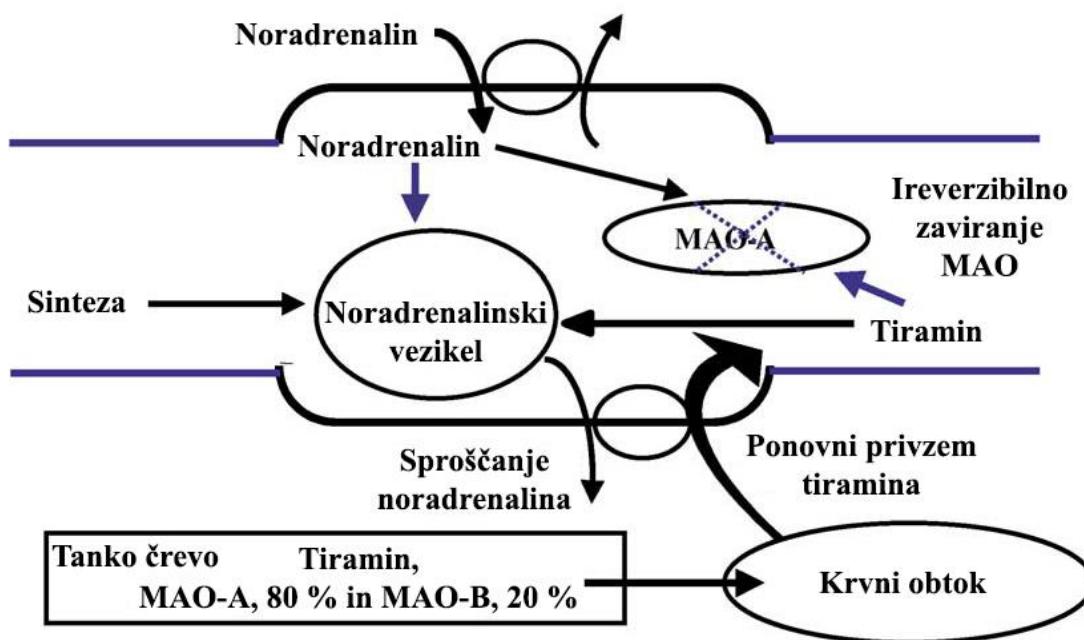
je bilo ugotovljeno, da ima antidepresiven učinek pri pacientih s tuberkulozo, ki so hkrati zboleli tudi za depresijo. Tako je iproniazid postal prvi zaviralec MAO, ki je bil uspešno uporabljen v terapiji depresije (14). V poznih 50. in 60. letih prejšnjega stoletja pa je bila njegova klinična uporaba in uporaba drugih sorodnih zaviralcev MAO postavljena pod vprašaj, saj so odkrili hude stranske učinke teh zdravil. Iproniazid je povzročal toksičnost jeter zaradi svoje hidrazinske strukture. Čeprav je bil ta problem rešen z razvojem novih nehidrazinskih zaviralcev MAO, kot je tranylcipromin (slika 4), pa se je pri teh pojavil novi pomembni neželeni učinek: hipertenzivna (tiraminska) kriza, angleško imenovana »cheese effect« (6, 15).



Slika 4: Iproniazid in tranylcipromin, kot predstavnika prvih zaviralcev MAO.

Danes poznamo veliko različnih zaviralcev MAO. Med njimi so tako reverzibilni kot tudi ireverzibilni zaviralci, ki so lahko selektivni za samo eno izoformo (MAO-A ali MAO-B) ali pa so neselektivni (zavirajo obe izoformi). Imajo pomembno terapevtsko vlogo pri različnih boleznih, kot so duševne motnje in nevrodegenerativne bolezni (4). To so večinoma dolgotrajne ali kronične bolezni, kot na primer depresija ali Parkinsonova bolezen, kjer je dolgoročni učinek delovanja ireverzibilnih zaviralcev zaželen. Tako je aplikacija zdravil le enkrat dnevno, kar poveča zavzetost bolnikov za zdravljenje. Slabost ireverzibilnih zaviralcev pa je možnost dolgo delujočih neželenih učinkov, ki jih lahko povzroči zaviranje encima. Med te spadata predvsem serotoninски sindrom in že prej omenjena hipertenzivna kriza (10). Serotoninски sindrom je opisan kot klinična triada sprememb duševnega statusa, avtonomne hiperaktivnosti in nevromuskularnih nepravilnosti ter zajema simptome, kot so tremor, diareja, delirij, nevromuskulatorna rigidnost in tudi hipertermija. Povzroči ga močno povečana koncentracija 5-HT v CŽS. To se lahko zgodi pri sočasni uporabi zaviralcev MAO in zaviralcev ponovnega privzema 5-HT, kamor spadajo selektivni zaviralci ponovnega privzema 5-HT, triciklični antidepresivi in zaviralci ponovnega privzema 5-HT in noradrenalina (16). Hipertenzivna (tiraminska) kriza pa se največkrat pojavi pri uporabi izoformno neselektivnih zaviralcev MAO ali pa pri selektivnih zavircih MAO-A. Le-te

izoforme so lokalizirane večinoma v gastrointestinalnem traktu in jetrih, kjer presnavljajo tiramin in druge simpatikomimetične amine, ki so prisotni v fermentirani hrani, kot je sir. Po zaviranju encima se nemetabolizirani amini sproščajo v sistemski krvni obtok in adrenergične nevrone, kjer povzročajo sproščanje noradrenalina in posledično povišan sistolični krvni tlak, kar lahko privede do usodne hipertenzivne krize. To je bil tudi glavni razlog za upad zanimanja za načrtovanje zaviralcev MAO, je pa spodbudilo iskanje novih antidepresivov, ki niso bili zaviralcji monoamin oksidaz (17, 18). Mehanizem hipertenzivne krize je predstavljen na sliki 5.



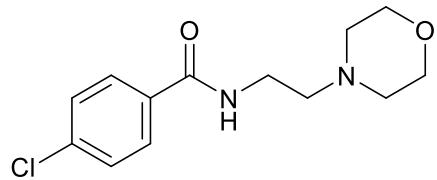
Slika 5: Mehanizem ponovnega privzema tiramina in sproščanje noradrenalina iz perifernih adrenergičnih nevronov kot odgovor na ireverzibilno zaviranje MAO-A v tankem črevesu, krvnih žilah in adrenergičnih nevronih. Pritejeno po (18).

Nove raziskave o zaviralcih MAO kažejo, da so kljub njihovi dokazani učinkovitosti še zmeraj premalo uporabljeni. Pojavili so se tudi dvomi o veljavnosti strogih diet, ki so se jih morali držati pacienti z zaviralcji MAO in so temeljili na zastarelih raziskavah. Kljub temu mnogi zdravniki še vedno predpisujejo zaviralce MAO kot zadnjo linijo zdravljenja, ki se uporablja le, če so drugi razredi antidepresivnih zdravil neučinkoviti (19, 20).

1.3.1. REVERZIBILNI ZAVIRALCI MAO-A (RIMA)

Kmalu se je razvoj zaviralcev MAO osredotočil na reverzibilne zaviralce MAO-A (RIMA), saj se je pokazala potreba po zaviralcih, ki bi lahko prehajali skozi krvno-možgansko pregrado in tako imeli antidepresivne učinke, ne da bi izzvali hipertenzivno krizo. Ker se

RIMA reverzibilno vežejo na MAO-A v črevesju, jih lahko tiramin in ostali podobni amini v visokih koncentracijah kompetitivno izrinejo iz aktivnega mesta encima in tako ne povzročijo hipertenzivne krize. Za njihovo antidepresivno delovanje pa je ključno, da imajo veliko afiniteto do izoforme MAO-A, saj bi jih drugače lahko iz aktivnega mesta izrinili ostali substrati, kot sta noradrenalin in 5-HT (10). Najpomembnejši predstavnik skupine je moklobemid (slika 6), ki je tudi registriran za zdravljenje depresije in socialne fobije (21). Njegova najpogostejsa neželena učinka sta nespečnost in prebavne težave, hipertenzivna kriza pa je bila zabeležena le enkrat. Po učinkovitosti pri zdravljenju depresije so enako učinkoviti kot zaviralci ponovnega privzema 5-HT in bolj varni ter bolje tolerirani kot triciklični antidepresivi (14). Poroča se tudi o izboljšanju spomina in odzivnega časa starostnikov, ki so jemali moklobemid (6).



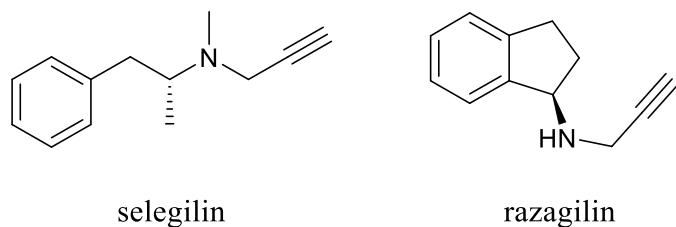
Slika 6: Moklobemid, predstavnik skupine RIMA.

1.3.2. IREVERZIBILNI ZAVIRALCI MAO-B

Na splošno imajo reverzibilni zaviralci boljši varnostni profil, medtem ko ireverzibilni zaviralci močneje zavirajo encime, so manj občutljivi na farmakokinetične parametre in imajo daljši čas delovanja (28). Vsem ireverzibilnim zavircem MAO, ki so opisani v literaturi, je skupno, da se vežejo na dušikov atom N-5 flavinske skupine FAD. Zaviralec je sestavljen iz substratu-podobnega dela, ki je ključen za afiniteto molekule, in reaktivne skupine, katera vstopi v kovalentno interakcijo z FAD v encimu in ga tako ireverzibilno zavira. Zaradi ireverzibilne narave zaviranja MAO lahko že enkratni odmerek zaviralca popolnoma zavre encim, kar pomeni, da bo za vrnitev delovanja encimov potrebna nova sinteza le-teh. Za učinkovito farmakološko delovanje je bilo dokazano, da je potrebno zaviranje vsaj 80 % encima. To lahko dosežemo z vsakodnevno aplikacijo relativno nizkega odmerka ireverzibilnih zaviralcev MAO (10).

Kot smo omenili že na začetku tega poglavja, je bil prvi zaviralec MAO ravno iproniazid, kateri je ireverzibilni zaviralec in je bil odkrit po naključju. Kmalu je sledilo odkritje ciklopropilaminskih zaviralcev, med katerimi smo izpostavili tranylcipromin, ki je bil razvit

za klinično terapijo depresije. Je zelo učinkovit in hitro delajoč ireverzibilni zaviralec obeh izoform MAO, ki se še danes uporablja pri pacientih z rezistentnimi oblikami depresij (10, 22). Ker so neselektivni zaviralci MAO zavirali tudi MAO-A v črevesju ter s tem povečali možnost za hipertenzivno krizo, se je razvoj terapevtskih učinkovin premaknil v smer selektivnih zaviralcev MAO-B. Med njimi bi izpostavili selegilin in razagilin (slika 7), ki sta tudi edina zaviralca MAO-B registrirana za uporabo pri zdravljenju Parkinsonove bolezni (PB), kjer prihaja do znižane koncentracije dopamina v bazalnih ganglijih (23, 24). Čeprav so jih sprva razvili kot potencialna antidepresiva, ki ne povzročata hipertenzivne krize, so hitro ugotovili, da izražata antidepresivne lastnosti samo pri višjih koncentracijah. Takrat postaneta neselektivna in zavirata tako MAO-A kot MAO-B. Raziskovalci so se osredotočili na njuno selektivno zaviranje izoforme MAO-B in ugotovili, da sta obe učinkovini zelo učinkoviti pri lajšanju simptomov v zgodnjih stadijih PB. Izkazalo se je, da sta že v nizkih odmerkih oba selektivna zaviralca MAO-B zelo učinkovita pri povečanju sinaptičnih koncentracij dopamina v bazalnih ganglijih (10, 14, 18, 25).



Slika 7: Selegilin in razagilin kot predstavnika ireverzibilnih zaviralcev MAO-B.

Vsi zaviralci MAO imajo že sami po sebi nevroprotективne lastnosti, saj zavirajo nastajanje H_2O_2 in toksičnih aldehidov zaradi zaviranja oksidativnega metabolizma aminov. Rezultati dolgoročne klinične raziskave s selegilinom so pokazali, da podaljša življensko dobo pacientov s PB in upočasni napredovanje dopaminergične nevrodegeneracije (4). Kasneje so ugotovili, da selegilin in razagilin preprečujejo apoptozi celicno smrt, sproženo po mitohondrijski poti, ki nastane zaradi oksidativnega stresa ali notranje poškodbe celice. Ugotovili so tudi, da nevroprotективni učinek ni povezan zgolj s selektivnostjo zaviralca MAO, ampak je povezan tudi z *N*-propargilaminsko skupino, ki je prisotna v vseh teh učinkovinah. Danes je znano, da *N*-propargilaminska skupina deluje antiapoptozično, zavira nastajanje amiloidnih proteinov β in ima pomembno vlogo pri zagotavljanju nevronskih in mitohondrijskih protektivnih lastnosti teh spojin (26, 27).

1.4. TERAPEVTSKA UPORABA

Kot smo že omenili v prejšnjih poglavjih, so zaviralci MAO trenutno registrirani za terapijo depresije, Parkinsonove bolezni in različnih anksioznih motenj, kot so panične motnje, socialne fobije in posttravmatska stresna motnja. Zaradi njihove vloge pri uravnavanju monoaminskih živčnih prenašalcev so izredno zanimivi zaradi potencialnih terapevtskih učinkov pri različnih duševnih boleznih, Alzheimerjevi bolezni, alkoholizmu, migrenah in odvisnosti (28).

1.4.1. DUŠEVNE MOTNJE

Zaviralci MAO se že več kot pol stoletja uporabljajo v terapiji depresije. Antidepresivne lastnosti so rezultat selektivnega zaviranja MAO-A v CŽS, kar vodi do povišanih koncentracij dopamina, noradrenalina in 5-HT v možganih. Reverzibilni zaviralci MAO-A so še posebej učinkoviti v terapiji depresije pri starejših pacientih. Zdi se, da so MAO-A in neselektivni zaviralci MAO boljši pri zdravljenju fobične anksioznosti in netipične depresije, še posebno tiste, ki vključujejo histerične lastnosti, hipersomnijo, bulimijo in utrujenost, kot zaviralci ponovnega privzema aminov (30). Zaviralci MAO-B nimajo antidepresivnega učinka in ne povzročajo hipertenzivske krize, razen če so aplicirani v dovolj velikih odmerkih, da zavirajo tudi MAO-A. Poročano je bilo, da selegilin in lazabemid pomagata pri odvajanju od kajenja in tudi pri vzdrževanju abstinence pri kajenju (31). Zaviralec MAO-A moklobemid ima tudi podobne učinke, verjetno zaradi povečane koncentracije 5-HT v možganih. Ker sta pri ljudeh, ki radi kadijo tobačne izdelke, zavirani obe izoformi MAO, je verjetno ta terapevtski učinek povezan z nadaljevanjem zaviranja encimov, na katerega so kadilci že navajeni (4).

1.4.2. PARKINSONOVA BOLEZEN (PB)

Je kronična nevrodegenerativna bolezen, ki prizadane 1-2 % ljudi po 50. letu starosti. Danes vemo, da gre pri parkinsonizmu za progresivno propadanje dopaminskih nigro-striatnih nevronov, kar se kaže s pomankanjem dopamina v striatumu. Za bolnike s PB je značilna akinezija, bradikinezija, mišična rigidnost, tremor, demenca in tudi depresija (32). Ker je v bazalnih ganglijih izražanje MAO-B bistveno večje od MAO-A se v terapiji PB uporabljajo selektivni zaviralci MAO-B, kot sta že omenjena selegilin in razagilin, ki dvigujeta koncentracijo dopamina v striatumu. Uporabljam jih lahko v monoterapiji, ali pa v kombinaciji z L-DOPA (4, 10, 33).

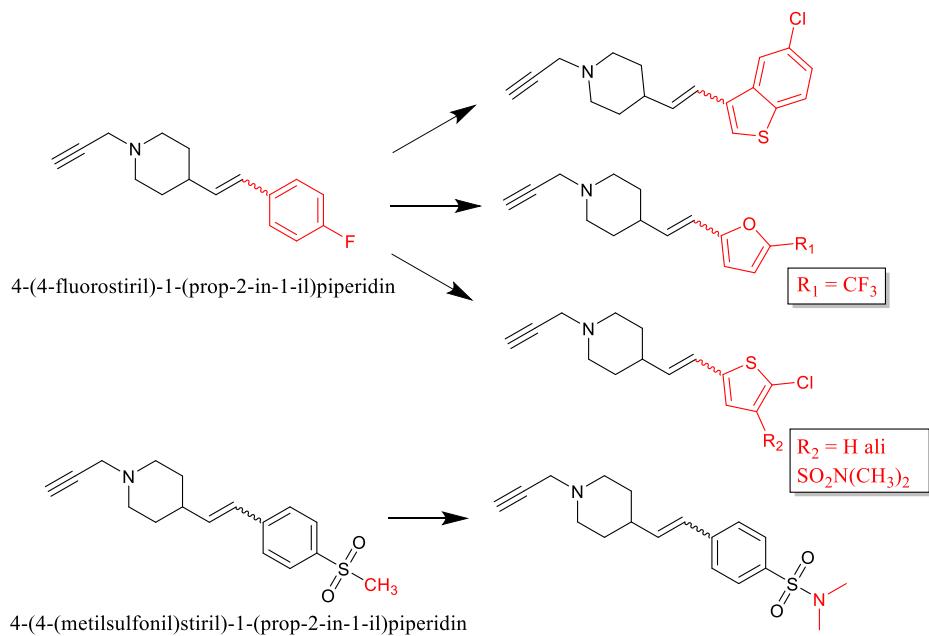
1.4.3. ALZHEIMERJEVA BOLEZEN (AB)

AB je kronična progresivna nevrodegenerativna bolezen, pri kateri so v ospredju znaki demence. Tudi pri AB je izražanje MAO-B v možganih povečano, kar pripelje do oksidativnega stresa, nastanka nevrotoksičnih produktov in patognomoničnih sprememb, ki jih imenujemo amiloidni plaki in nevrfibrilarne pentlje (32). Ker je pri AB okvarjen predvsem holinergični prenos v hipokampusu, se v terapiji uporablja primarno zaviralci acetilholin esteraze, kot so donepezil, rivastigmin, galantamin, in antagonist receptorjev NMDA, memantin. Klinične terapevtske raziskave s selegilinom pri pacientih z AB niso dale končnih, prepričljivih rezultatov (4). Bila pa je predlagana terapija v kombinaciji z zavircem acetilholin esteraze in zavircem MAO-B, saj slednji zmanjšujejo nastanek amiloidnih plakov in dokazano izboljšujejo miselne sposobnosti pacientov (4, 34, 35).

Danes MAO predstavlja zanimivo tarčo za načrtovanje učinkovin, ki bi se lahko uporabljale v terapiji številnih človeških bolezni. Zanimanje raste za zaviralce MAO, ki so bolj izoformno specifični in bi imeli zaradi svoje biološke aktivnosti lahko potencialne nove terapevtske učinke v drugih tkivih ali pa bi lahko bili uporabljeni kot farmakološko ali diagnostično orodje. Trenutno je razvoj novih učinkovin osredotočen na razvoj selektivnih zaviralcev MAO-B, ki bi lahko delovali tudi na več tarč hkrati. To bi omogočilo celovito zdravljenje bolj kompleksnih bolezni, manj neželenih učinkov in boljšo zavzetost bolnikov za sodelovanje pri terapiji (28).

2. NAMEN DELA

Namen magistrskega dela je načrtovanje in sinteza novih zaviralcev MAO-A in MAO-B na osnovi dveh znanih zaviralcev, 4-(4-fluorostiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (36) in 4-(4-(metilsulfonil)stiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (37), ki sta bila sintetizirana na Fakulteti za Farmacijo v Ljubljani. Osredotočili se bomo na sintezo benzenskih, furanskih in tiofenskih derivatov že omenjenih zaviralcev (slika 8).



Slika 8: Načrtovane spremembe na dveh znanih zaviralcih z ohranjeno propargilno skupino, piperidinom in dvojno vezjo. Rdeča barva označuje variabilne dele molekul.

Načrtovane spojine bomo pripravili po večstopenjski sintezni poti, ki bo vključevala pripravo soli s trifenilfosfinom in Wittigovo reakcijo z Boc zaščitenim 4-formilpiperidinom, v zadnji stopnji pa odstranitev zaščitne skupine Boc in alkilacija piperidinskega dušika s propargilnim fragmentom, ki je ključen za vezavo v aktivno mesto MAO ter nevroprotективno delovanje takega tipa spojin. Znano je tudi, da lahko z izomerijo *cis* in *trans* dosežemo selektivnost na izoformah MAO (36), zato želimo sintetizirati in ločiti čim bolj optično čiste spojine s pomočjo kolonske kromatografije. S pomočjo spektrofotometričnega testa bomo vsem končnim spojinam določili rezidualno aktivnost, aktivnim spojinam pa tudi vrednost IC₅₀. Z dobljenimi rezultati bomo poskusili ovrednotiti vpliv strukturnih sprememb na zaviralno delovanje končnih spojin na človeških encimih MAO-A oz. MAO B.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. REAGENTI, TOPILA IN LABORATORIJSKA OPREMA

Pri izvedbi eksperimentalnega dela magistrske naloge smo uporabili komercialno dostopne reagente in topila proizvajalcev Acros Organics, Alfa Aesar, Apollo Scientific, Carlo Erba, Kemika, Maybridge, Merck in Sigma-Aldrich. Brezvodni topili THF in CH₂Cl₂ smo pripravili z destilacijo pod argonovo atmosfero. Uporabili smo standardno laboratorijsko opremo, kot je magnetno mešalo z grelnikom IKA WERKE RCT basic, rotavapor Büchi, analitska tehnica Mettler Toledo, sušilnik BINDER Series FD in UV-svetilka CAMAG UV-Cabinet II.

3.2. KROMATOGRAFSKE METODE

3.2.1. TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA

Tankoplastno kromatografijo smo uporabljali za spremljanje poteka reakcij, preverjanje čistosti vmesnih in končnih spojin ter pri izbiri mobilne faze za kolonsko kromatografijo. Pri izvedbi tankoplastne kromatografije smo uporabili kromatografske plošče Fertigplatten Silikagel 60 F₂₅₄ proizvajalca Merck, kjer stacionarno fazo predstavlja silikagel z debelino nanosa 0,20 mm na aluminijastem nosilcu velikosti 20 × 20 cm. Za mobilno fazo smo uporabili različne kombinacije topil etilacetata in heksana, kakor je tudi navedeno pod posamezno spojino v poglavju Eksperimentalno delo. Spojine smo na plošči TLC detektirali s svetlobo UV pri valovni dolžini $\lambda = 254$ nm in orositvenim reagentom ninhidrinom.

3.2.2. KOLONSKA ADSORPCIJSKA KROMATOGRAFIJA

Kolonsko kromatografijo smo uporabili pri ločitvi izomerov *cis* in *trans* ter pri čiščenju končnih spojin. Za stacionarno fazo smo uporabili Silikagel 60 proizvajalca Merck z velikostjo delcev 0,040-0,063 mm, kot mobilno fazo pa smo uporabili različne kombinacije topil etilacetata in heksana, navedeno v poglavju Eksperimentalno delo pri posameznem sinteznem postopku. Kolonsko kromatografijo smo izvajali v steklenih kolonah različnih velikosti, odvisno od mase vzorca. Za ločitev faz v koloni smo uporabili pesek proizvajalca Sigma-Aldrich.

3.2.3. TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)

Reverznofazno visokotlačno kromatografijo smo uporabili pri določanju čistosti končnih spojin. Izvajali smo jo na sistemu Agilent Technologies 1100 z detektorjem UV-VIS G1365B (220 nm). Uporabili smo kolono Agilent Eclipse Plus C18 (5 µm, 4,6 × 50 mm) s

hitrostjo pretoka mobilne faze 1,0 ml/min. Volumen injiciranega vzorca je znašal 5 μ L, kot mobilno fazo pa smo uporabili mešanico 0,1 % raztopine trifluorocetne kisline v vodi in acetonitrila. Gradient acetonitrila je znašal: 0–12 min, 10–90 %; 12–14 min, 90 %; 14–15 min, 90–10 %. Določena relativna čistost vseh analiziranih spojin je presegala 95,0 %.

3.3. SPEKTROSKOPSKE METODE

3.3.1. JEDRSKA MAGNETNORESONANČNA SPEKTROSKOPIJA (NMR)

Za identifikacijo vmesnih spojin in preverjanje njihove čistosti smo posneli spektre $^1\text{H-NMR}$ (pri frekvenci 400 MHz), končnim spojinam pa smo posneli tudi spektre $^{13}\text{C-NMR}$ (pri frekvenci 100 MHz). Spektre smo posneli s pomočjo spektromетra Bruker AVANCE III. Spojine smo raztopili v devteriranih topilih CDCl_3 ali DMSO-d_6 , ki jima je kot interni standard dodan TMS, glede na katerega smo določili kemijske premike v enotah ppm. Sklopitvene konstante (J) smo podali v hertzih (Hz), oblike vrhov pa smo podali s standardnimi oznakami za singlet (s), razširjen singlet (rs), duplet (d), dublet dubleta (dd), triplet (t) in multiplet (m). Za analizo spektrov smo uporabili računalniški program MestRe-C 4.8.6.0 proizvajalca Mestrelab Research S.L.

3.3.2. MASNA SPEKTROMETRIJA (MS)

Intermediatom vmesnih reakcij smo posneli masni spekter v tehniki elektrosprejske ionizacije (ESI) na masnem spektrometu ADVION expression CMSL. Končnim spojinam pa smo posneli masne spektre v ESI-HRMS tehniki z masnim spektrometrom Thermo Scientific Exactive Plus Orbitrap.

3.4. DOLOČANJE TEMPERATURE TALIŠČA

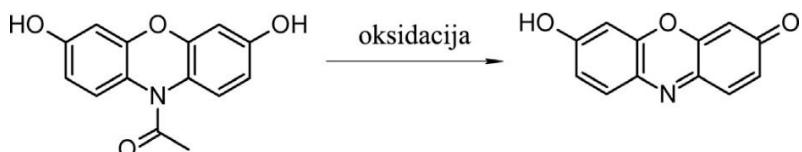
Končnim trdnim spojinam smo določili temperaturo tališča s pomočjo Koflerjevega mikroskopa z ogrevalno mizico proizvajalca Leica in termometrom 52 II Thermometer proizvajalca Fluke.

3.5. POIMENOVANJE IN RISANJE SPOJIN

Za risanje struktur spojin in reakcijskih schem ter poimenovanje spojin po nomenklaturi IUPAC smo uporabili računalniški program ChemDraw Professional 16.0.1.4 proizvajalca PerkinElmer Informatics, Inc.

3.6. BIOKEMIJSKO TESTIRANJE

Sintetiziranim končnim spojinam smo ovrednotili zaviralno delovanje na encimih MAO-A in MAO-B z merjenjem fluorescence resorufina. Resorufin je produkt, ki nastane pri oksidaciji reagenta Amplex® Red v prisotnosti sproščenega vodikovega peroksida in dodane hrenove peroksidaze (slika 9).



Slika 9: Oksidacija reagenta Amplex Red v resorufin (prirejeno po (38)).

Za izvedbo testa smo uporabili rekombinantna človeška encima MAO-A in MAO-B, izražena v insektnih celicah s pomočjo bakulovirusnega ekspresijskega sistema (Sigma Aldrich). Pripravili smo raztopine končnih spojin raztopljenih v 100 % DMSO in jih v fosfatnem pufru (50 mM, pH = 7,4, dodan reagent 0,05 % V/V Triton X-114) inkubirali (15 minut pri 37 °C) s količino encima MAO-A ali MAO-B potrebnega za oksidacijo 165 pmol *p*-tiramina/min. Nato smo dodali 200 µM reagenta Amplex® Red, 2 U/ml hrenove peroksidaze in 1 mM substrata *p*-tiramina, ki ga MAO-A oz. MAO-B oksidativno deaminira. Pri tem nastaja vodikov peroksid, ki v prisotnosti hrenove peroksidaze reagira z reagentom Amplex® Red in ga oksidira v rdeče obarvani fluorescentni produkt resorufin. Fluoresenco resorufina smo merili kvantitativno pri valovni dolžini 590 nm. V kontrolnem poskusu smo uporabili samo čisti DMSO brez končnih spojin. Iz zbranih rezultatov smo spojinam določili rezidualno aktivnost (RA) po naslednji enačbi:

$$RA (\%) = \frac{v_1 - b}{v_0 - b} \times 100$$

V_1 – hitrost naraščanja fluorescence ob prisotnosti zaviralca,

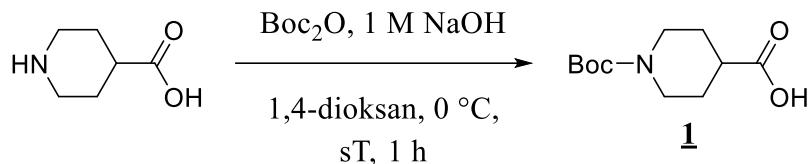
V_0 – hitrost naraščanja fluorescence ob odsotnosti zaviralca,

b – slepa vrednost (hitrost naraščanja fluorescence ob odsotnosti encima).

Spojinam, ki so imele RA manjšo od 50 %, torej pri katerih je bilo delovanje encima zavrto za več kot 50 %, smo določili tudi vrednosti IC₅₀. To smo storili z prileganjem Hillove enačbe eksperimentalno določenim vrednostim RA pri določeni koncentraciji v odvisnosti od koncentracije zaviralca.

4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1. SINTEZA 1-(TERC-BUTOKSIKARBONIL)PIPERIDIN-4-KARBOKSILNE KISLINE (1)

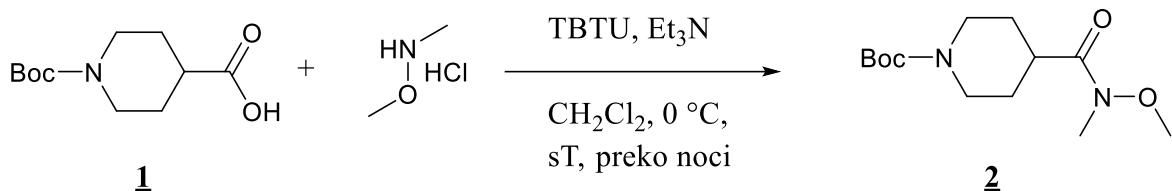


Slika 10: Reakcijska shema sinteze spojine **1**.

Piperidin-4-karboksilno kislino (15,00 g, 116,10 mmol, 1,0 ekv.) smo raztopili v mešanici 1,4-dioksana (75 ml) in 1 M NaOH (116,10 ml, 116,10 mmol, 1,0 ekv.) in ohladili na 0 °C. Nato smo v reakcijsko zmes po kapljicah dodajali raztopino Boc₂O (30,41 g, 139,3 mmol, 1,2 ekv.) v 1,4-dioksanu (100 ml) in mešali 1 uro pri sobni temperaturi. Organsko topilo smo odstranili z rotavapiranjem, vodno fazo reakcijske zmesi prenesli v ljuljanje in ekstrahirali z Et₂O (2 x 100 ml). Vodno fazo smo nato nakisali z 1 M HCl do pH 2-3, oborino odnučali in spirali s prečiščeno vodo ter sušili na sobni temperaturi preko noči.

IUPAC ime	1-(<i>tert</i> -butoksikarbonil)piperidin-4-karboksilna kislina (1)
Videz	Beli kristali
Tališče	T _{TAL} = 157-159 °C (v literaturi: 158-160 °C (36))
TLC	R _f = 0,20 (MF: EtOAc/n-heksan = 1/1)
Izkoristek	87,5 %
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,46 (s, 9H), 1,63–1,70 (m, 2H), 1,87–1,95 (m, 2H), 2,50 (tt, J ₁ = 10,8 Hz, J ₂ = 3,7 Hz, 1H), 2,84–2,91 (m, 2H), 4,03 (td, J ₁ = 13,8 Hz, J ₂ = 4,0 Hz, 2H), 9,11 (rs, 1H).

4.2. SINTEZA TERC-BUTIL 4-(METOKSI(METIL)KARBAMOIL)-PIPERIDIN-1-KARBOKSILATA (2)

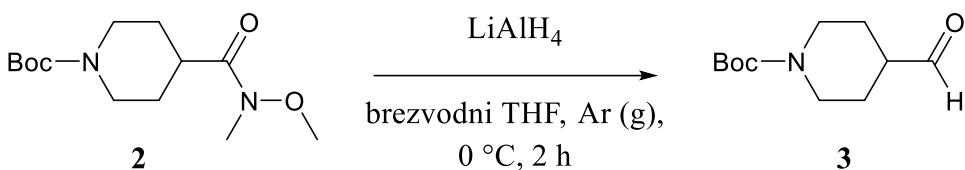


Slika 11: Reakcijska shema sinteze spojine **2**.

Spojino **1** (15,00 g, 65,42 mmol, 1,0 ekv.) smo raztopili v CH_2Cl_2 (150 ml) in jo ohladili na 0 °C. Dodali smo Et_3N (22,67 ml, 163,55 mmol, 2,5 ekv.), TBTU (22,05 g, 68,67 mmol, 1,05 ekv.) in mešali 30 minut na 0 °C. V ohlajeno reakcijsko zmes smo dodali *N,O*-dimetilhidroksilaminijev klorid (7,65 g, 78,48 mmol, 1,2 ekv.) ter jo mešali preko noči na sobni temperaturi. Reakcijsko zmes smo prenesli v lij ločnik in ekstrahirali z nasičeno raztopino NaHCO_3 (100 ml), 1 M HCl (100 ml) in nasičeno raztopino NaCl (100 ml). Organsko fazo smo sušili z NaSO_4 , organsko topilo pa smo odstranili z rotavapiranjem.

IUPAC ime	terc-butil 4-(metoksi(metil)karbamoil)- piperidin-1-karboksilat (2)
Videz	Bela amorfna snov
Tališče	$T_{\text{AL}} = 67\text{-}70^\circ\text{C}$ (v literaturi: 68-73 °C (36))
TLC	$R_f = 0,31$ (MF: $\text{EtOAc/n-heksan} = 2/1$)
Izkoristek	72,3 %
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)	δ (ppm) = 1,46 (s, 9H), 1,62–1,76 (m, 4H), 2,70–2,81 (m, 3H), 3,19 (s, 3H), 3,68 (s, 3H), 4,16 (m, 2H).

4.3. SINTEZA TERC-BUTIL 4-FORMILPIPERIDIN-1-KARBOKSILATA (3)

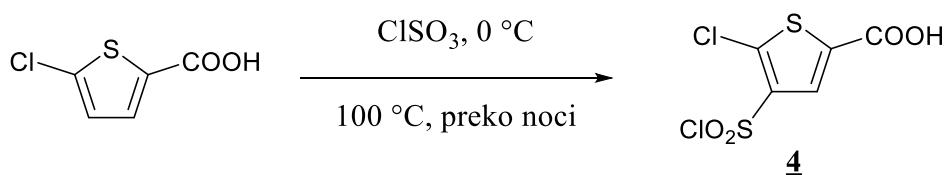


Slika 12: Reakcijska shema sinteze spojine 3.

Spojino 2 (8,90 g, 32,7 mmol, 1,0 ekv.) smo natehtali v bučko in dodali že pripravljeni brezvodni THF (80 ml) ter reakcijsko zmes ob mešanju ohladili na 0 °C. Nato smo pod argonovo atmosfero počasi dodajali LiAlH₄ (1,86 g, 49,05 mmol, 1,5 ekv.) in pazili, da se reakcijska zmes ni preveč penila. Po dodatku celotne količine LiAlH₄ smo reakcijsko zmes mešali na ledu 2 uri. Po dveh urah smo reakcijo ustavili z dodatkom NaHCO₃ (30 ml) in izvedli ekstrakcijo z EtOAc (3 x 100 ml). Združene organske faze smo spirali z NaHCO₃ (50 ml), 1 M HCl (50 ml), nasičeno raztopino NaCl (50 ml) in sušili z NaSO₄. Topilo smo odstranili z rotavapiranjem ter dobljeni produkt takoj uporabili v naslednji stopnji.

IUPAC ime	terc-butil 4-formilpiperidin-1-karboksilat (<u>3</u>)
Videz	Rumena oljnata snov
TLC	R _f = 0,59 (MF: EtOAc/n-heksan = 3/1)
Izkoristek	85,6 %

4.4. SINTEZA 5-KLORO-4-(KLOROSULFONIL)TIOFEN-2-KARBOKSILNE KISLINE (4)



Slika 13: Reakcijska shema sinteze spojine 4.

Bučko smo ohladili na 0 °C na ledeni kopeli, nato pa vanjo previdno odmerili klorsulfonsko kislino (12,36 ml, 183,6 mmol, 5 ekv.). Med mešanjem smo počasi dodajali 5-klorotiofen-2-karboksilno kislino (6,00 g, 36,9 mmol, 1 ekv.). Reakcijsko zmes smo pri temperaturi refluksa (T_{REF} = 100 °C) mešali preko noči. Naslednji dan smo bučko ohladili na ledu in

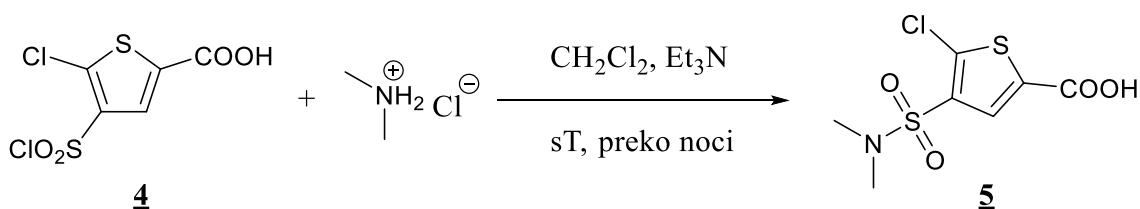
reakcijsko zmes zlili v čašo z ledom. Oborino smo odnučali ter jo sprali s prečiščeno hladno vodo.

IUPAC ime	5-kloro-4-(klorosulfonil)tiofen-2-karboksilna kislina (4)
Videz	Svetlo rjavi kristali
Tališče	$T_{TAL} = 116\text{--}118\text{ }^{\circ}\text{C}$
TLC	$R_f = 0,32$ (MF: EtOAc)
Izkoristek	74,2 %
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)	δ (ppm) = 7,57 (s, 1H), 10,91 (rs, 1H).

4.5. SINTEZNI POSTOPEK A: SINTEZA ALKIL *N,N*-DIMETILSULFON AMIDOV

Ustrezno izhodno kislino (1,0 ekv.) smo natehtali v bučko, jo raztopili v brezvodnem CH_2Cl_2 , dodali Et_3N (3,0 ekv.) in na koncu dodali še dimetilaminijev klorid (1,5 ekv.). Reakcijsko zmes smo mešali na sobni temperaturi preko noči. Naslednji dan smo odstranili organsko topilo z rotavapiranjem ter reakcijsko zmes ekstrahirali z enakimi volumeni (100 ml) EtOAc in prečiščene vode. Organsko fazo smo spirali z 1 M HCl (50 ml), nasičeno NaCl (50 ml) ter sušili z NaSO_4 . Topilo smo ponovno odparili pod znižanim tlakom.

4.5.1. Sinteza 5-kloro-4-(*N,N*-dimetilsulfamoil)tiofen-2-karboksilne kisline (**5**)



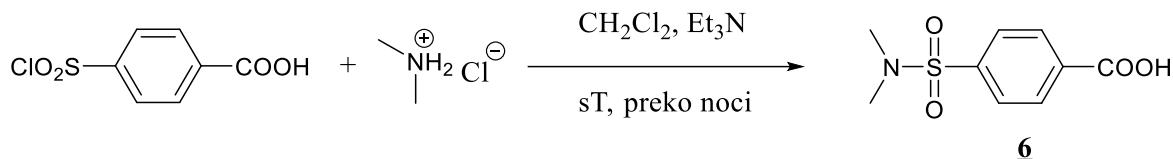
Slika 14: Reakcijska shema sinteze spojine **5**.

Sintezo spojine **5** smo izvedli iz spojine **4** (7,15 g, 27,40 mmol, 1,0 ekv.), CH_2Cl_2 (60 ml), Et_3N (11,46 ml, 82,2 mmol, 3 ekv.) in dimetilaminijevega klorida (3,35 g, 41,10 mmol, 1,5 ekv.) po sinteznem postopku A.

IUPAC ime	5-kloro-4-(<i>N,N</i> -dimetilsulfamoil)tiofen-2-karboksilna kislina (5)
Videz	Temno rjavi kristali

Tališče	$T_{TAL} = 135\text{-}137 \text{ }^{\circ}\text{C}$
TLC	$R_f = 0,41$ (MF: EtOAc)
Izkoristek	10,4 %
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6)	δ (ppm) = 2,77 (s, 6H), 7,69 (s, 1H), 1H od COOH je izmenjan.

4.5.2. Sinteza 4-(*N,N*-dimetisulfamoil)benzojske kisline (**6**)



Slika 15: Reakcijska shema sinteze spojine **6**.

Sintezo spojine **6** smo izvedli iz 4-(klorosulfonil)benzojske kisline (2,74 g, 12,4 mmol, 1,0 ekv.), CH_2Cl_2 (20 ml), Et_3N (5,18 ml, 37,2 mmol, 3,0 ekv.) in dimetilaminijevega klorida (1,52 g, 18,6 mmol, 1,5 ekv.) po sinteznem postopku A.

IUPAC ime	4-(<i>N,N</i> -dimetisulfamoil)benzojska kislina (6)
Videz	Beli kristali
Tališče	$T_{TAL} = 190\text{-}192 \text{ }^{\circ}\text{C}$
TLC	$R_f = 0,28$ (MF: EtOAc)
Izkoristek	85,3 %
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6)	δ (ppm) = 2,64 (s, 6H), 7,65-7,67 (dt, $J_1 = 8,6 \text{ Hz}$, $J_2 = 2,0 \text{ Hz}$, 1H), 7,51 (d, $J = 8,4 \text{ Hz}$, 2H), 7,73 (d, $J = 8,4 \text{ Hz}$, 2H), 1H od COOH je izmenjan.

4.6. SINTEZNI POSTOPEK B: REDUKCIJA KISLINE V ALKOHOL

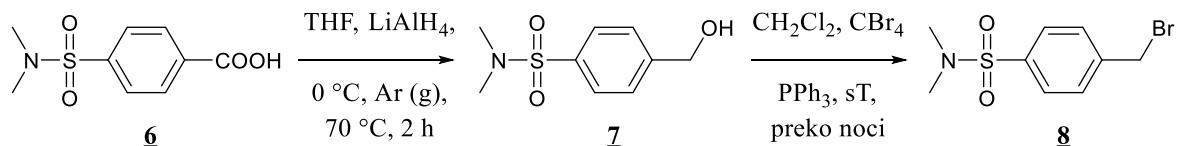
Ustrezno izhodno kislino (1,0 ekv.) smo natehtali v bučko in jo raztopili v predhodno pripravljenem brezvodnem THF (50 ml). Bučko smo ohladili na 0 °C ter previdno pod argonovo atmosfero dodali LiAlH_4 (2,0 ekv.). Reakcijsko zmes smo segrevali na oljni kopeli pri temperaturi refluksa ($T_{\text{REF}} = 70 \text{ }^{\circ}\text{C}$) 2 uri. Nato smo bučko ohladili in vanjo izmenično dodajali prečiščeno vodo (50 ml) in 15% vodno raztopino NaOH (50 ml), dokler se reakcijska zmes ni nehala peniti. Opravili smo ekstrakcijo z Et_2O (2 x 100 ml), združene

organske faze sušili nad NaSO₄ in odstranili organsko topilo z rotavapiranjem. Brez dodatnega čiščenja smo dobljeni produkt takoj uporabili v naslednji stopnji reakcije (slika 16, 17 in 18).

4.7. SINTEZNI POSTOPEK C: SINTEZA ALKIL BROMIDOV

Ustrezni izhodni alkohol (1,0 ekv.) smo natehtali v bučko, raztopili v CH₂Cl₂ (50 ml) in ohladili na 0 °C. Nato smo previdno dodali CBr₄ (1,5 ekv.) in trifenilfosfin (1,5 ekv.). Reakcijsko zmes smo mešali na sobni temperaturi preko noči. Naslednji dan smo produkt očistili s kolonsko kromatografijo. Uporabili smo mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 1/3.

4.7.1. Sinteza 4-(hidroksimetil)-N,N-dimetilbenzensulfonamida (**7**) in 4-(bromometil)-N,N-dimetilbenzensulfonamida (**8**)



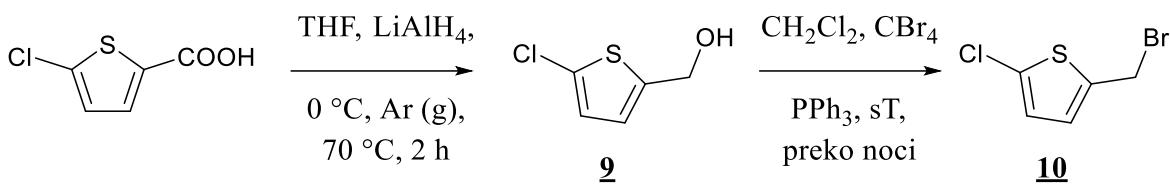
Slika 16: Reakcijska shema sinteze spojin **7** in **8**.

Sintezo spojine **7** smo izvedli iz spojine **6** (2,38 g, 10,4 mmol, 1,0 ekv.) in LiAlH₄ (0,79 g, 20,8 mmol, 2,0 ekv.) po sinteznem postopku B. Tako smo nadaljevali s sintezo spojine **8**, iz spojine **7** (1,30 g, 6 mmol, 1 ekv.), CBr₄ (2,99 g, 9 mmol, 1,5 ekv.) in trifenilfosfina (2,36 g, 9 mmol, 1,5 ekv.) po sinteznem postopku C.

IUPAC ime	4-(hidroksimetil)-N,N-dimetilbenzensulfonamid (7)
Videz	Rumena oljnata snov
TLC	R _f = 0,48 (MF: EtOAc)
Izkoristek	58,5 %

IUPAC ime	4-(bromometil)-N,N-dimetilbenzensulfonamid (8)
Videz	Beli kristali
Tališče	T _{TAL} = 95-97 °C
TLC	R _f = 0,28 (MF: EtOAc/n-heksan = 1/3)
Izkoristek	51,3 %

4.7.2. Sinteza (5-klorotiofen-2-il)metanola (**9**) in 2-(bromometil)-5-klorotiofena (**10**)



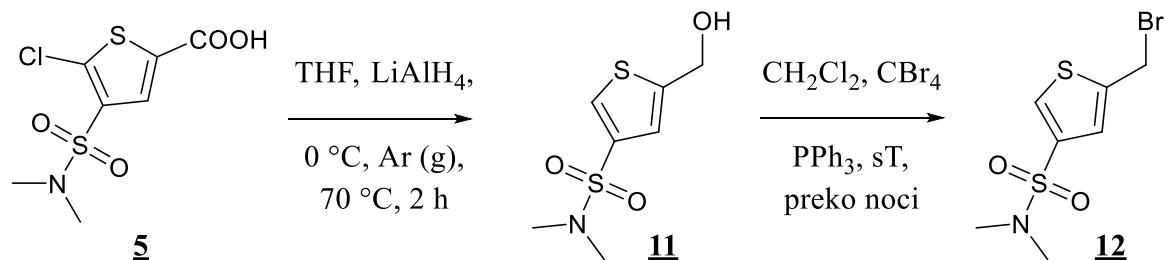
Slika 17: Reakcijska shema sinteze spojin **9** in **10**.

Sintezo spojine **9** smo izvedli iz 5-klorotiofen-2-karboksilne kisline (2,44 g, 15 mmol, 1,0 ekv.), LiAlH₄ (1,14 g, 30 mmol, 2,0 ekv.) po sinteznem postopku B. Takoj smo nadaljevali s sintezo spojine **10** iz spojine **9** (1,80 g, 12,3 mmol, 1,0 ekv.), CBr₄ (6,12 g, 18,45 mmol, 1,5 ekv.) in trifenilfosfina (4,84 g, 18,45 mmol, 1,5 ekv.) po sinteznem postopku C.

IUPAC ime	(5-klorotiofen-2-il)metanol (9)
Videz	Rumena oljnata snov
TLC	R _f = 0,51 (MF: EtOAc)
Izkoristek	81,9 %

IUPAC ime	2-(bromometil)-5-klorotifen (10)
Videz	Rjavkasta amorfna snov
TLC	R _f = 0,27 (MF: EtOAc/n-heksan = 1/3)
Izkoristek	51,3 %

4.7.3. Sinteza 5-(hidroksimetil)-N,N-dimetiltiofen-3-sulfonamida (**11**) in 5-(bromometil)-N,N-dimetiltiofen-3-sulfonamida (**12**)



Slika 18: Reakcijska shema sinteze spojine **11** in **12**.

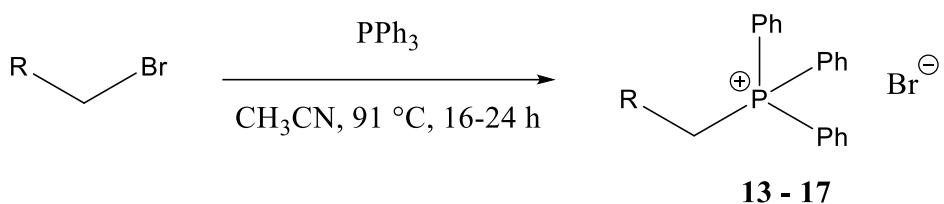
Sintezo spojine **11** smo izvedli iz spojine **5** (0,94 g, 3,5 mmol, 1,0 ekv.) in LiAlH₄ (0,27 g, 7 mmol, 2,0 ekv.) po sinteznem postopku B. Pri produktu smo na podlagi spektra NMR opazili, da je poleg redukcije potekla tudi odstranitev klora iz aromatskega obroča. Takoj

smo nadaljevali s sintezo spojine **12** iz spojine **11** (0,44 g, 1,73 mmol, 1,0 ekv.), CBr₄ (0,861 g, 2,60 mmol, 1,5 ekv.) in trifenilfosfina (0,681 g, 2,6 mmol, 1,5 ekv.) po sinteznem postopku C.

IUPAC ime	5-(hidroksimetil)-N,N-dimetiltiofen-3-sulfonamid (11)
Videz	Rumena oljnata snov
TLC	R _f = 0,55 (MF: EtOAc)
Izkoristek	49,6 %

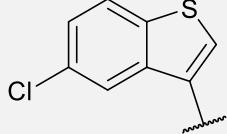
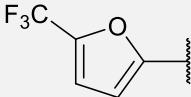
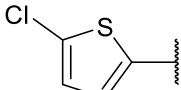
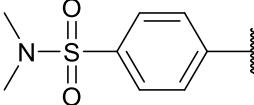
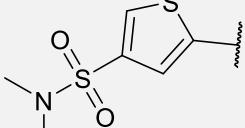
IUPAC ime	5-(bromometil)-N,N-dimetiltiofen-3-sulfonamida (12)
Videz	Beli kristali
Tališče	T _{TAL} = 83-84 °C
TLC	R _f = 0,25 (MF: EtOAc/n-heksan = 1/3)
Izkoristek	28,0 %
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 2,76 (s, 6H), 4,67 (d, J = 0,7 Hz, 2H), 7,26-7,27 (m, 1H), 7,88 (d, J = 1,5 Hz, 1H).

4.8. SINTEZNI POSTOPEK D: SINTEZA WITTIGOVIH REAGENTOV



Slika 19: Reakcijska shema sinteze spojin **13 - 17**. Substituenti R so predstavljeni v preglednici I. V reakcijsko zmes ustreznega bromida (1,0 ekv.) raztopljenega v CH₃CN (30 ml) smo pri sobni temperaturi dodali trifenilfosfin (1,0 ekv.). Reakcijsko zmes smo mešali na oljni kopeli pri 90 °C 16-24 ur. Nato smo v bučko dodali Et₂O (50 ml) in odnučali oborjeni produkt. Oborino smo spirali z Et₂O (50 ml) in sušili preko noči na sobni temperaturi. Produkt smo brez dodatnega čiščenja uporabili v naslednji reakcijski stopnji.

Preglednica I: Substituenti v izhodnih in končnih spojinah sinteze Wittigovih reagentov.

Spojina	R	Spojina	R
<u>13</u>		<u>14</u>	
<u>15</u>		<u>16</u>	
<u>17</u>			

4.8.1. Sinteza ((5-klorobenzo[b]tiofen-3-il)metil)trifenilfosfonijevega bromida (13)

Sintezo spojine 13 smo izvedli iz spojine 3-(bromometil)-5-klorobenzo[b]tiofena (2,62 g, 10,00 mmol, 1,0 ekv.) in trifenilfosfina (2,65 g, 10,00 mmol, 1,0 ekv.) po sinteznem postopku D. Izkoristek reakcije je bil 47,6 %.

4.8.2. Sinteza trifenil((5-(trifluorometil)furan-2-il)metil)fosfonijevega bromida (14)

Sintezo spojine 14 smo izvedli iz spojine 2-(bromometil)-5-(trifluorometil)furana (1,40 g, 5,36 mmol, 1,0 ekv.) in trifenilfosfina (1,23 g, 5,36 mmol, 1,0 ekv.) po sinteznem postopku D. Izkoristek reakcije je bil 93,0 %.

4.8.3. Sinteza ((5-klorotiofen-2-il)metil)trifenilfosfonijevega bromida (15)

Sintezo spojine 15 smo izvedli iz spojine 10 (1,80 g, 12,30 mmol, 1,0 ekv.) in trifenilfosfina (3,23 g, 12,3 mmol, 1,0 ekv.) po sinteznem postopku D. Izkoristek reakcije je bil 30,2 %.

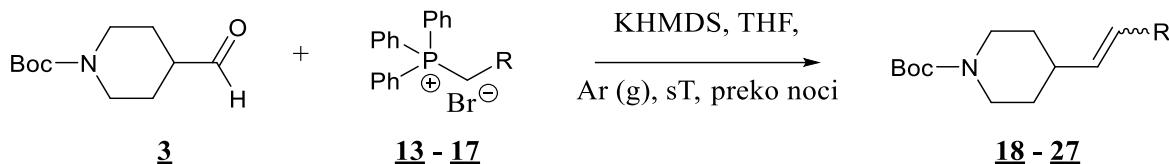
4.8.4. Sinteza (4-(N,N-dimetilsulfamoil)benzil)trifenilfosfonijevega bromida (16)

Sintezo spojine 16 smo izvedli iz spojine 8 (0,86 g, 3,10 mmol, 1,0 ekv.) in trifenilfosfina (0,81 g, 3,10 mmol, 1,0 ekv.) po sinteznem postopku D. Izkoristek reakcije je bil 85,0 %.

4.8.5. Sinteza ((5-kloro-4-(N,N-dimetilsulfamoil)tiufen-2-il)metil)trifenilfosfonijevega bromida (17)

Sintezo spojine 17 smo izvedli iz spojine 12 (0,31 g, 0,98 mmol, 1,0 ekv.) in trifenilfosfina (0,26 g, 0,98 mmol, 1,0 ekv.) po sinteznem postopku D. Izkoristek reakcije je bil 85,8 %.

4.9. SINTEZNI POSTOPEK E: WITTIGOVA REAKCIJA



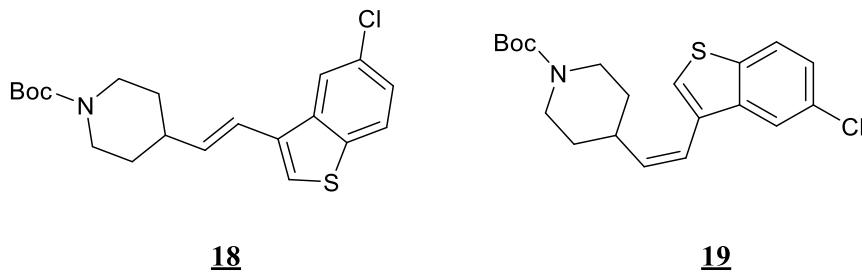
Slika 20: Reakcijska shema sinteze spojin 18 - 27. Substituenti R v reagentih in produktih so predstavljeni v preglednici II.

Ustrezni Wittigov reagent 13 - 17 (1,1 ekv.) smo raztopili v brezvodnem THF (30 ml) pod argonovo atmosfero. K reakcijski zmesi smo dodali bazo KHMDS (1,05 ekv.) in mešali pri sobni temperaturi 30 minut. Nato smo po kapljicah dodali spojino 3 (1,0 ekv.), ki je bila predhodno raztopljena v brezvodnem THF (10 ml), in pustili mešati preko noči. Naslednji dan smo odparili topilo pod znižanim tlakom in opravili ekstrakcijo z enakimi volumi EtOAc (2 x 50 ml) in nasičene raztopine NaHCO₃ (2 x 50 ml). Združene organske faze smo spirali z nasičeno raztopino NaCl (100 ml), sušili nad NaSO₄ in odparili topilo pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s pomočjo kolonske kromatografije in ločili izomera *cis* in *trans*.

Preglednica II: Substituenti v reagentih in produktih Wittigove reakcije.

Spojina	R	Spojina	R
<u>13</u> , <u>18</u> in <u>19</u>		<u>14</u> , <u>20</u> in <u>21</u>	
<u>15</u> , <u>22</u> in <u>23</u>		<u>16</u> , <u>24</u> in <u>25</u>	
<u>17</u> , <u>26</u> in <u>27</u>			

4.9.1. Sinteza *terc*-butil (*E/Z*)-4-(2-(5-klorobenzo[b]tiofen-3-il)vinil)piperidin-1-karboksilata (18** in **19**)**



Slika 21: Spojini **18** in **19**.

Sintezo spojin **18** in **19** smo izvedli iz spojine **13** (2,12 g, 4,78 mmol, 1,1 ekv.), KHMDS (0,85 g, 4,04 mmol, 1,05 ekv.) in spojine **3** (0,78 g, 3,67 mmol, 1,0 ekv.) po sinteznem postopku E ter dobili zmes izomera *cis* in *trans*. Izomera smo ločili s pomočjo kolonske kromatografije z mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 1/10. Celokupni izkoristek reakcije (izomera *cis* in *trans*) je znašal 18,0 %.

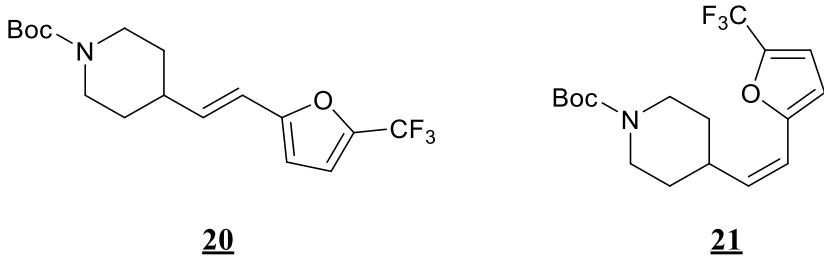
IUPAC ime	<i>terc</i> -butil (<i>E</i>)-4-(2-(5-klorobenzo[b]tiofen-3-il)vinil)piperidin-1-karboksilat (18)
Videz	Brezbarvna oljnata snov
TLC	R _f = 0,19 (MF: EtOAc/n-heksan = 1/10)
Delež	57,8 %
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,50 (s, 9H), 1,55-1,64 (m, 4H), 2,33-2,42 (m, 1H), 2,81-2,86 (m, 2H), 4,12-4,22 (m, 2H), 6,22 (dd, J ₁ = 16,0 Hz, J ₂ = 6,9 Hz, 1H), 6,61 (d, J = 16,0 Hz, 1H), 7,26-7,39 (m, 2H), 7,70-7,71 (m, 1H), 7,78 (d, J = 1,8 Hz, 1H).
MS (ESI)	Izračunano za C ₂₀ H ₂₄ ClNNaO ₂ S: 400,11 [M+Na] ⁺ Izmerjeno: 400,14 [M+Na] ⁺

IUPAC ime	<i>terc</i> -butil (<i>Z</i>)-4-(2-(5-klorobenzo[b]tiofen-3-il)vinil)piperidin-1-karboksilat (19)
Videz	Rumena oljnata snov
TLC	R _f = 0,28 (MF: EtOAc/n-heksan = 1/10)
Delež	42,2 %

¹H NMR (400

MHz, CDCl₃	2,83 (m, 2H), 4,11-4,16 (m, 2H), 6,19 (dd, $J_1 = 11,2$ Hz, $J_2 = 2,0$ Hz, 1H), 6,42 (d, $J = 11,4$ Hz, 1H), 7,26-7,34 (m, 2H), 7,70-7,81 (m, 2H).
MS (ESI)	Izračunano za C ₂₀ H ₂₄ ClNNaO ₂ S: 400,11 [M+Na] ⁺ Izmerjeno: 400,14 [M+Na] ⁺

4.9.2. Sinteza *terc*-butil (*E/Z*)-4-(2-(trifluorometil)furan-2-il)vinil)piperidin-1-karboksilata (**20** in **21**)



Slika 22: Spojini **20** in **21**.

Sintezo spojin **20** in **21** smo izvedli iz spojine **14** (2,57 g, 5,24 mmol, 1,1 ekv.), KHMDS (1,03 g, 5,50 mmol, 1,05 ekv.) in spojine **3** (1,02 g, 4,76 mmol, 1,0 ekv.) po sinteznem postopku E ter dobili zmes izomera *cis* in *trans*. Izomera smo ločili s pomočjo kolonske kromatografije z mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 1/10. Celokupni izkoristek reakcije (izomera *cis* in *trans*) je znašal 23,4 %.

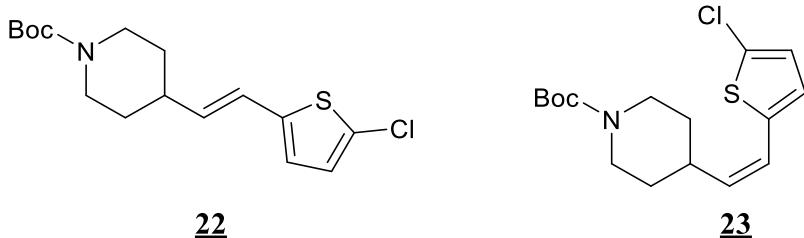
IUPAC ime	<i>terc</i> -butil (<i>E</i>)-4-(2-(trifluorometil)furan-2-il)vinil)piperidin-1-karboksilat (20)
Videz	Rumena oljnata snov
TLC	R _f = 0,28 (MF: EtOAc/n-heksan = 1/10)
Delež	89,9 %
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,37-1,40 (m, 2H), 1,49 (s, 9H), 1,75-1,78 (m, 2H), 2,27-2,35 (m, 1H), 2,80 (t, $J_1 = 11,4$ Hz, 2H), 4,08-4,19 (m, 2H), 6,19-6,23 (m, 2H), 6,31 (dd, $J_1 = 16,1$ Hz, $J_2 = 6,6$ Hz, 1H), 6,75-6,76 (m, 1H).
MS (ESI)	Spojina ni dala masnega pika v tehniki ESI.

IUPAC ime	<i>terc</i> -butil (<i>Z</i>)-4-(2-(trifluorometil)furan-2-il)vinil)piperidin-1-karboksilat (21)
Videz	Rumena oljnata snov

TLC	$R_f = 0,28$ (MF: EtOAc/n-heksan = 1/10)
Delež	10,1 %
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)	δ (ppm) = 1,36-1,38 (m, 2H), 1,48 (s, 9H), 1,78-1,81 (m, $J_1 = 12,2$ Hz, 2H), 2,29-2,36 (m, 1H), 2,80 (t, $J = 10,9$ Hz, 2H), 4,35-4,39 (m, 2H), 6,25-6,29 (m, 2H), 6,32 (d, $J = 11,1$ Hz, 1H), 6,72-6,78 (m, 1H).
MS (ESI)	Spojina ni dala masnega pika v tehniki ESI.

4.9.3. Sinteza *terc*-butil (*E/Z*)-4-(2-(5-klorotiofen-2-il)vinil)piperidin-1-karboksilata

(22 in 23)



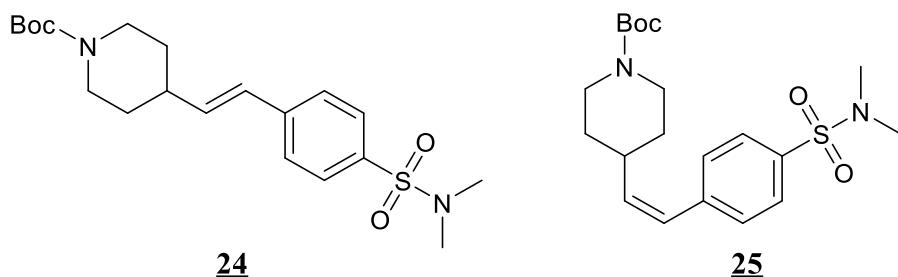
Slika 23: Spojini 22 in 23.

Sintezo spojin 22 in 23 smo izvedli iz spojine 15 (1,01 g, 2,56 mmol, 1,0 ekv.), KHMDS (0,54 g, 2,69 mmol, 1,05 ekv.) in spojine 3 (0,60 g, 2,82 mmol, 1,1 ekv.) po sinteznem postopku E ter dobili zmes izomera *cis* in *trans*. Izomera smo ločili s pomočjo kolonske kromatografije z mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 1/10. Celokupni izkoristek reakcije (izomera *cis* in *trans*) je znašal 15,2 %.

IUPAC ime	<i>terc</i> -butil (<i>E</i>)-4-(2-(5-klorotiofen-2-il)vinil)piperidin-1-karboksilat (<u>22</u>)
Videz	Oranžna amorfna snov
Tališče	$T_{TAL} = 52-54^\circ\text{C}$
TLC	$R_f = 0,24$ (MF: EtOAc/n-heksan = 1/10)
Delež	74,2 %
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)	δ (ppm) = 1,26-1,34 (m, 2H), 1,46 (s, 9H), 1,70-1,73 (m, 2H), 2,21-2,34 (m, 1H), 2,72-2,78 (m, 2H), 4,08-4,14 (m, 2H), 5,86 (dd, $J_1 = 15,8$ Hz, $J_2 = 6,8$ Hz, 1H), 6,35 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H), 6,62 (d, $J = 3,8$ Hz, 1H), 6,74 (d, $J_1 = 3,8$ Hz, 1H).
MS (ESI)	Izračunano za $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{ClKNO}_2\text{S}$: 366,07 $[\text{M}+\text{K}]^+$ Izmerjeno: 366,09 $[\text{M}+\text{K}]^+$

IUPAC ime	terc-butil (Z)-4-(2-(5-klorotiofen-2-il)vinil)piperidin-1-karboksilat (23)
Videz	Oranžna oljnata snov
TLC	$R_f = 0,28$ (MF: EtOAc/n-heksan = 1/10)
Delež	25,8 %
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)	δ (ppm) = 1,32-1,36 (m, 2H), 1,47 (s, 9H), 1,69-1,73 (m, 2H), 2,72-2,85 (m, 3H), 4,09-4,15 (m, 2H), 5,35 (dd, $J_1 = 11,5$ Hz, $J_2 = 1,8$ Hz, 1H), 6,34 (d, $J = 11,5$ Hz, 1H), 6,71 (d, $J_1 = 3,9$ Hz, 1H), 6,81 (d, $J = 3,85$ Hz, 1H).
MS (ESI)	Izračunano za $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{ClKNO}_2\text{S}$: 366,07 $[\text{M}+\text{K}]^+$ Izmerjeno: 366,09 $[\text{M}+\text{K}]^+$

4.9.4. Sinteza *terc*-butil (*E/Z*)-4-(4-(*N,N*-dimetilsulfamoil)stiril)piperidin-1-karboksilata (24 in 25)



Slika 24: Spojini 24 in 25.

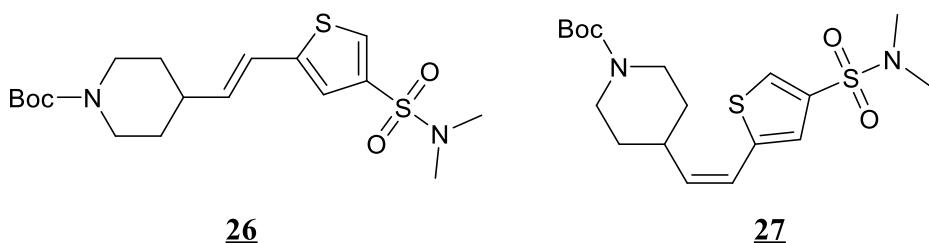
Sintezo spojin 24 in 25 smo izvedli iz spojine 16 (1,21 g, 2,63 mmol, 1,0 ekv.), KHMDS (0,55 g, 2,76 mmol, 1,05 ekv.) in spojine 3 (0,62 g, 2,89 mmol, 1,1 ekv.) po sinteznem postopku E ter dobili zmes izomera *cis* in *trans*. Izomera smo ločili s pomočjo kolonske kromatografije z mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 1/3. Celokupni izkoristek reakcije (izomera *cis* in *trans*) je znašal 32,4 %.

IUPAC ime	<i>terc</i>-butil (<i>E</i>)-4-(4-(<i>N,N</i>-dimetilsulfamoil)stiril)piperidin-1-karboksilat (<u>24</u>)
Videz	Beli kristali
Tališče	$T_{TAL} = 89-91$ °C
TLC	$R_f = 0,19$ (MF: EtOAc/n-heksan = 1/3)

Delež	72,3 %
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3)	δ (ppm) = 1,36-1,43 (m, 2H), 1,48 (s, 9H), 1,77-1,79 (m, 2H), 2,33-2,36 (m, 1H), 2,70 (s, 6H), 2,74-2,82 (m, 2H), 4,12-4,16 (m, 2H), 6,33 (dd, J_1 = 16,0 Hz, J_2 = 6,7 Hz, 1H), 6,44 (d, J = 16,0 Hz, 1H), 7,49 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,71 (d, J = 8,4 Hz, 2H).
MS (ESI)	Izračunana za $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{NaO}_4\text{S}$: 417,18 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ Izmerjena: 417,30 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

IUPAC ime	terc-butil (<i>Z</i>)-4-(4-(<i>N,N</i> -dimetilsulfamoil)stiril)piperidin-1-karboksilat (25)
Videz	Brezbarvna oljnata snov
TLC	R_f = 0,28 (MF: EtOAc/n-heksan = 1/3)
Delež	27,7 %
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3)	δ (ppm) = 1,24-1,41 (m, 2H), 1,47 (s, 9H), 1,51-1,69 (m, 2H), 2,39-2,44 (m, 1H), 2,74 (s, 6H), 3,96-4,13 (m, 4H), 5,62 (dd, J_1 = 11,7 Hz, J_2 = 1,5 Hz, 1H), 6,41 (d, J = 11,8 Hz, 1H), 7,39 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,75 (d, J = 8,4 Hz, 1H).
MS (ESI)	Izračunana za $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{NaO}_4\text{S}$: 417,18 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ Izmerjena: 417,30 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

4.9.5. Sinteza *terc*-butil (*E/Z*)-4-(2-(*N,N*-dimetilsulfamoil)tofen-2-il)vinil)piperidin-1-karboksilata (**26** in **27**)



Slika 25: Spojini **26** in **27**.

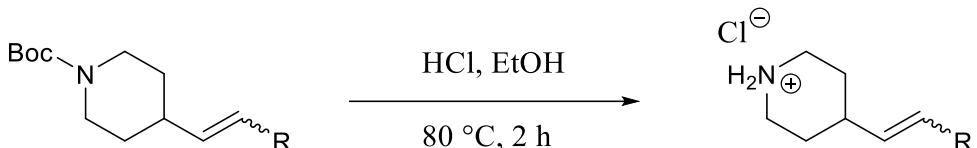
Sintezo spojin **26** in **27** smo izvedli iz spojine **17** (0,42 g, 0,84 mmol, 1,0 ekv.), KHMDS (0,18 g, 0,88 mmol, 1,05 ekv.) in spojine **3** (0,20 g, 0,92 mmol, 1,1 ekv.) po sinteznem postopku E ter dobili zmes izomera *cis* in *trans*. Izomera smo ločili s pomočjo kolonske kromatografije z mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 1/3. Celokupni izkoristek reakcije (izomera *cis* in *trans*) je znašal 22,8 %.

IUPAC ime	<i>terc</i> -butil (<i>E</i>)-4-(2-(4-(<i>N,N</i> -dimetilsulfamoil)tiofen-2-il)vinil)piperidin-1-karboksilat (26)
Videz	Beli kristali
Tališče	$T_{TAL} = 53\text{-}55 \text{ }^{\circ}\text{C}$
TLC	$R_f = 0,19$ (MF: EtOAc/n-heksan = 1/3)
Delež	81,8 %
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)	δ (ppm) = 1,31-1,41 (m, 2H), 1,47 (s, 9H), 1,72-1,77 (m, 2H), 2,24-2,33 (m, 1H), 2,74 (s, 6H), 2,74-2,82 (m, 2H), 4,10-4,20 (m, 2H), 6,08 (dd, $J_1 = 15,9 \text{ Hz}$, $J_2 = 6,7 \text{ Hz}$, 1H), 6,6 (d, $J = 15,9 \text{ Hz}$, 1H), 7,04 (d, $J = 1,2 \text{ Hz}$, 1H), 7,66-7,67 (m, 1H).
MS (ESI)	Spojina ni dala masnega pika v tehniki ESI.

IUPAC ime	<i>terc</i> -butil (<i>Z</i>)-4-(2-(4-(<i>N,N</i> -dimetilsulfamoil)tiofen-2-il)vinil)piperidin-1-karboksilat (27)
Videz	Beli kristali
Tališče	$T_{TAL} = 34\text{-}37 \text{ }^{\circ}\text{C}$
TLC	$R_f = 0,28$ (MF: EtOAc/n-heksan = 1/3)
Delež	19,2 %
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)	δ (ppm) = 1,32-1,42 (m, 2H), 1,46 (s, 9H), 1,69-1,76 (m, 2H), 2,74 (s, 6H), 2,76-2,85 (m, 3H), 4,05-4,19 (m, 2H), 5,54 (dd, $J_1 = 11,6 \text{ Hz}$, $J_2 = 9,9 \text{ Hz}$, 1H), 6,42 (dt, $J_1 = 11,5 \text{ Hz}$, $J_2 = 0,8 \text{ Hz}$, $J_3 = 0,8 \text{ Hz}$, 1H), 7,08-7,09 (m, 1H), 7,78-7,79 (m, 1H).
MS (ESI)	Spojina ni dala masnega pika v tehniki ESI.

4.10. SINTEZNI POSTOPEK F: ODSTRANITEV BOC ZAŠČITNE

SKUPINE



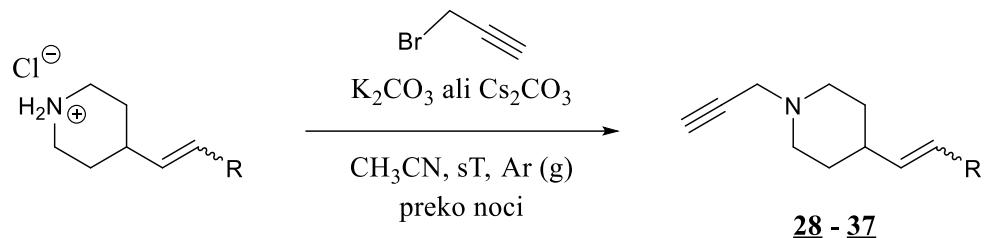
18 - 27

Slika 26: Reakcijska shema odstranitve zaščitne skupine Boc. Substituenti R v izhodnih spojinah **18 - 27** so predstavljeni v preglednici III.

Izhodno spojino, ustrezno zaščiteno z Boc (1,0 ekv.) smo v bučki raztopili v EtOH (50 ml)

in s pipeto dodali koncentrirano HCl (15 ekv.). Reakcijsko zmes smo mešali 2 h na oljni kopeli pri temperaturi 80 °C. Nastalemu produktu smo odstranili organsko topilo z rotavapiranjem, ga spirali z Et₂O in še enkrat odparili topilo pod znižanim tlakom. Suhi produkt smo takoj uporabili v naslednji stopnji. Predpostavili smo 100 % izkoristek.

4.11. SINTEZNI POSTOPEK G: ALKILACIJA PIPERIDINSKEGA DUŠIKA



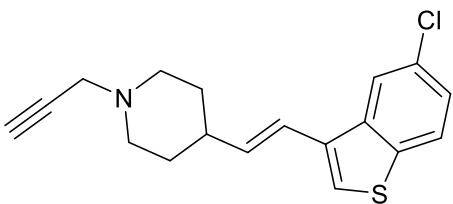
Slika 27: Reakcijska shema sinteze končnih spojin **28 - 37**. Substituenti R so predstavljeni v preglednici III.

Ustrezni odščiteni intermediat (1,0 ekv.) smo raztopili v bučki z CH₃CN (30 ml) pri sobni temperaturi. Dodali smo bazo K₂CO₃ ali Cs₂CO₃ (3,0 ekv.) in nato še propargil bromid (1,3 ekv., 80 % raztopina v toluenu) pod argonovo atmosfero ter zaščitili bučke pred svetlobo. Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi preko noči. Naslednji dan smo z rotavaporjem odstranili organsko topilo in opravili ekstrakcijo z enakimi volumni (100 ml) EtOAc in nasičene vodne raztopine NaHCO₃. Združene organske faze smo spirali z nasičeno raztopino NaCl (50 ml), sušili nad Na₂SO₄ in uparili pod znižanim tlakom. Končni produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo.

Preglednica III: Substituenti v izhodnih in končnih spojinah reakcij odstranitve zaščitne skupine Boc in alkilacije piperidinskega dušika.

Spojina	R	Spojina	R
18, 19 in 28		20, 21 in 29, 30	
22, 23 in 31, 32		24, 25 in 33, 34	
26, 27 in 35, 36			

4.11.1. Sinteza (*E*)-4-(2-(5-klorobenzo[b]tiofen-3-il)vinil)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (28)



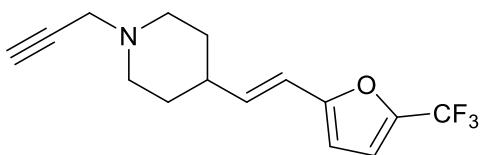
28

Slika 28: Končna spojina **28**.

Sintezo končne spojine **28** smo izvedli iz spojine **18** (0,14 g, 0,38 mmol, 1,0 ekv.), koncentrirane HCl (0,17 ml, 5,72 mmol, 15,0 ekv.), K₂CO₃ (0,16 g, 1,14 mmol, 3,0 ekv.) in propargil bromida (80 % raztopina v toluenu, 0,05 ml, 0,62 mmol, 1,3 ekv.) po sinteznem postopku F in sinteznem postopku G. Za izvedbo kolonske kromatografije smo uporabili mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 1/2.

IUPAC ime	(<i>E</i>)-4-(2-(5-klorobenzo[b]tiofen-3-il)vinil)-1-(prop-2-en-1-il)piperidin (28)
Videz	Beli kristali
Tališče	T _{TAL} = 36-38 °C
TLC	R _f = 0,25 (MF: EtOAc/n-heksan = 1/2)
Izkoristek	4,2 %
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,56-1,67 (m, 2H), 1,85-1,90 (m, 2H), 2,16-2,25 (m, 1H), 2,27 (t, J = 2,4 Hz, 1H), 2,28-2,35 (m, 2H), 2,94-3,00 (m, 2H), 3,35 (d, J = 2,4 Hz, 2H), 3,95 (s, 2H), 4,23-4,25 (m, 2H), 6,22 (dd, J ₁ = 16,0 Hz, J ₂ = 7,0 Hz, 1H), 6,58 (d, J ₁ = 15,9 Hz, 1H), 7,31 (dd, J ₁ = 8,5 Hz, J ₂ = 1,8 Hz, 1H), 7,41 (s, 1H), 7,75 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 7,83 (d, J = 1,9 Hz, 1H).
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 31,42; 38,44; 46,40; 51,47; 75,51; 79,56; 119,38; 121,33; 123,37; 124,46; 124,59; 129,63; 133,12; 137,38; 138,85.
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₈ H ₁₉ NCls: 316,0921 [M+H] ⁺ Izmerjeno: 316,0918 [M+H] ⁺
HPLC	t _R = 7,73 min

4.11.2. Sinteza (*E*)-1-(prop-2-in-1-il)-4-(2-(5-(trifluorometil)furan-2-il)vinil)piperidina (29)



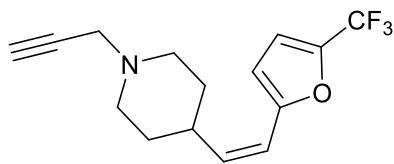
29

Slika 29: Končna spojina **29**.

Sintezo končne spojine **29** smo izvedli iz spojine **20** (0,35 g, 1,01 mmol, 1,0 ekv.), koncentrirane HCl (0,31 ml, 10,10 mmol, 10,0 ekv.), K₂CO₃ (0,42 g, 3,03 mmol, 3,0 ekv.) in propargil bromida (80 % raztopina v toluenu, 0,14 ml, 1,64 mmol, 1,3 ekv.) po sinteznem postopku F in sinteznem postopku G. Za izvedbo kolonske kromatografije smo uporabili mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 1/2.

IUPAC ime	(<i>E</i>)-1-(prop-2-in-1-il)-4-(2-(5-(trifluorometil)furan-2-il)vinil)piperidin (29)
Videz	Rumena oljnata snov
TLC	R _f = 0,21 (MF: EtOAc/n-heksan = 1/2)
Izkoristek	13,0 %
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,53 (dt, <i>J</i> ₁ = 12,0 Hz, <i>J</i> ₂ = 3,8 Hz, 1H), 1,56 (dt, <i>J</i> ₁ = 12,4 Hz, <i>J</i> ₂ = 3,8 Hz, 1H), 1,78-1,84 (m, <i>J</i> = 13,5 Hz, 2H), 2,07-2,17 (m, 2H), 2,26 (t, <i>J</i> = 2,4 Hz, 2H), 2,28 (dt, <i>J</i> ₁ = 11,7 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,4 Hz, 1H), 2,91-2,96 (m, 2H), 3,33 (d, <i>J</i> = 2,4 Hz, 2H), 6,17-6,21 (m, 2H), 6,30 (dd, <i>J</i> ₁ = 16,1 Hz, <i>J</i> ₂ = 6,6 Hz, 1H), 6,72-6,73 (m, 1H).
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 31,53; 38,53; 47,18; 52,08; 73,02; 78,93; 106,50; 112,96 (q, <i>J</i> _{C,F} = 2,9 Hz); 115,89; 119,17 (q, <i>J</i> _{C,F} = 266,5 Hz); 137,43; 140,09 (q, <i>J</i> _{C,F} = 42,3 Hz); 155,43 (d, <i>J</i> _{C,F} = 1,3 Hz).
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₅ H ₁₇ NOF ₃ : 284,1257 [M+H] ⁺ Izmerjeno: 284,1254 [M+H] ⁺
HPLC	t _R = 6,73 min

4.11.3. Sinteza (Z)-1-(prop-2-in-1-il)-4-(2-(5-(trifluorometil)furan-2-il)vinil)piperidina (30)



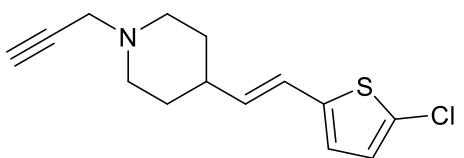
30

Slika 30: Končna spojina **30**.

Sintezo končne spojine **30** smo izvedli iz spojine **21** (0,04 g, 0,11 mmol, 1,0 ekv.), koncentrirane HCl (0,04 ml, 1,13 mmol, 10,0 ekv.), K₂CO₃ (0,05 g, 0,34 mmol, 3,0 ekv.) in propargil bromida (80 % raztopina v toluenu, 0,02 ml, 0,18 mmol, 1,3 ekv.) po sinteznem postopku F in sinteznem postopku G. Za izvedbo kolonske kromatografije smo uporabili mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 1/2.

IUPAC ime	(Z)-1-(prop-2-in-1-il)-4-(2-(5-(trifluorometil)furan-2-il)vinil)piperidin (30)
Videz	Rumena oljnata snov
TLC	R _f = 0,27 (MF: EtOAc/n-heksan = 1/2)
Izkoristek	10,5 %
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,49-1,59 (m, 2H), 1,77-1,84 (m, 2H), 2,26 (t, <i>J</i> = 2,4 Hz, 1H), 2,27-2,33 (m, 2H), 2,74-2,84 (m, 1H), 2,92-2,97 (m, 2H), 3,32 (d, <i>J</i> = 2,4 Hz 1H), 5,60 (dd, <i>J</i> ₁ = 11,7 Hz, <i>J</i> ₂ = 9,5 Hz 1H), 6,13 (d, <i>J</i> = 11,8 Hz, 1H), 6,28 (d, <i>J</i> = 3,4 Hz, 1H), 6,76-6,78 (m, 1H).
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆)	δ (ppm) = 31,19; 35,41; 46,40; 51,18; 75,52; 79,43; 110,05; 114,52 (q, <i>J</i> _{C,F} = 2,7 Hz); 115,06; 119,13 (q, <i>J</i> _{C,F} = 266,5 Hz); 138,36 (q, <i>J</i> _{C,F} = 41,8 Hz); 139,28; 154,86 (q, <i>J</i> _{C,F} = 1,7 Hz).
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₅ H ₁₇ NOF ₃ : 284,1257 [M+H] ⁺ Izmerjeno: 284,1255 [M+H] ⁺
HPLC	t _R = 6,65 min

4.11.4. Sinteza (*E*)-4-(2-(5-klorotiofen-2-il)vinil)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (**31**)



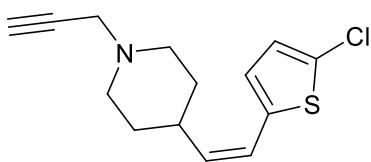
31

Slika 31: Končna spojina **31**.

Sintezo končne spojine **31** smo izvedli iz spojine **22** (0,09 g, 0,27 mmol, 1,0 ekv.), koncentrirane HCl (0,13 ml, 4,11 mmol, 15,0 ekv.), Cs₂CO₃ (0,26 g, 0,81 mmol, 3,0 ekv.) in propargil bromida (80 % raztopina v toluenu, 0,04 ml, 0,45 mmol, 1,3 ekv.) po sinteznem postopku F in sinteznem postopku G. Za izvedbo kolonske kromatografije smo uporabili mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 1/2.

IUPAC ime	(<i>E</i>)-4-(2-(5-klorotiofen-2-yl)vinil)-1-(prop-2-en-1-yl)piperidin (31)
Videz	Oranžna amorfna snov
Tališče	T _{TAL} = 32-33 °C
TLC	R _f = 0,30 (MF: EtOAc/n-heksan = 1/2)
Izkoristek	11,3 %
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,45-1,57 (m, 2H), 1,75-1,81 (m, 2H), 2,02-2,12 (m, 1H), 2,25 (t, J = 2,4 Hz, 1H), 2,26 (dt, 2H, J ₁ = 11,7 Hz, J ₂ = 2,6 Hz), 2,89-2,94 (m, 2H), 3,32 (d, J = 2,4 Hz, 2H), 5,89 (dd, J ₁ = 15,8 Hz, J ₂ = 6,9 Hz, 1H), 6,36 (dd, J = 15,8 Hz, J ₂ = 1,3 Hz, J ₃ = 0,6 Hz, 1H), 6,63 (d, J = 3,8 Hz, 1H), 6,73 (d, J = 3,8 Hz, 1H).
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 31,75; 38,56; 47,21; 52,14; 73,00; 78,99; 121,31; 123,81; 126,27; 127,52; 135,00; 141,73.
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₄ H ₁₇ NCls: 266,0765 [M+H] ⁺ Izmerjeno: 266,0763 [M+H] ⁺
HPLC	t _R = 6,75 min

4.11.5. Sinteza (Z)-4-(2-(5-klorotiofen-2-il)vinil)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina (32)



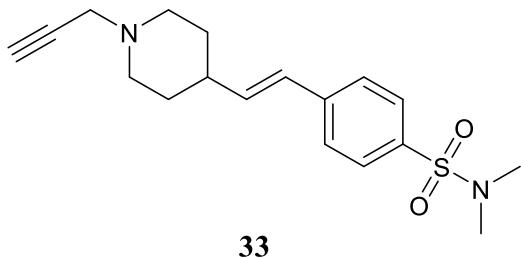
32

Slika 32: Končna spojina 32.

Sintezo končne spojine 32 smo izvedli iz spojine 23 (0,03 g, 0,09 mmol, 1,0 ekv.), koncentrirane HCl (0,05 ml, 1,35 mmol, 15,0 ekv.), Cs₂CO₃ (0,09 g, 0,27 mmol, 3,0 ekv.) in propargil bromida (80 % raztopina v toluenu, 0,01 ml, 0,15 mmol, 1,3 ekv.) po sinteznem postopku F in sinteznem postopku G. Za izvedbo kolonske kromatografije smo uporabili mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 1/2.

IUPAC ime	(Z)-4-(2-(5-klorotiofen-2-il)vinil)-1-(prop-2-en-1-il)piperidin (<u>32</u>)
Videz	Rjava oljnata snov
TLC	R _f = 0,33 (MF: EtOAc/n-heksan = 1/2)
Izkoristek	6,3 %
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,48-1,58 (m, 2H), 1,76-1,82 (m, 2H), 2,27 (t, <i>J</i> = 2,4 Hz, 1H), 2,32 (dt, <i>J</i> ₁ = 11,7 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,4 Hz, 2H), 2,58-2,68 (m, 1H), 2,90-2,95 (m, 2H), 3,32 (d, <i>J</i> = 2,4 Hz, 2H), 5,40 (dd, <i>J</i> ₁ = 11,5 Hz, <i>J</i> ₂ = 9,8 Hz, 1H), 6,32 (d, <i>J</i> ₁ = 11,5 Hz, 1H), 6,71 (d, <i>J</i> ₁ = 3,8 Hz, 1H), 6,81 (d, <i>J</i> ₁ = 3,8 Hz, 1H).
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆)	δ (ppm) = 31,13; 35,52; 46,40; 51,22; 75,60; 79,48; 120,48; 126,79; 127,56; 127,71; 135,26; 138,37.
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₄ H ₁₇ NCIS: 266,0765 [M+H] ⁺ Izmerjeno: 266,0762 [M+H] ⁺
HPLC	t _R = 6,63 min

4.11.6. Sinteza (E)-N,N-dimetil-4-(2-(1-(prop-2-in-1-il)piperidin-4-il)vinil)benzensulfonamida (33)

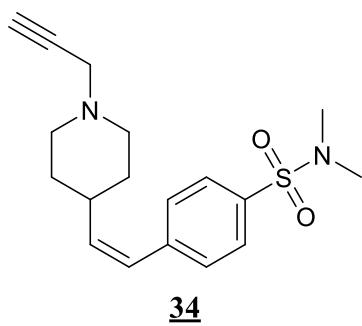


Slika 33: Končna spojina 33.

Sintezo končne spojine **33** smo izvedli iz spojine **24** (0,20 g, 0,51 mmol, 1,0 ekv.), koncentrirane HCl (0,24 ml, 7,65 mmol, 15,0 ekv.), Cs₂CO₃ (0,50 g, 1,53 mmol, 3,0 ekv.) in propargil bromida (80 % raztopina v toluenu, 0,07 ml, 0,83 mmol, 1,3 ekv.) po sinteznem postopku F in sinteznem postopku G. Za izvedbo kolonske kromatografije smo uporabili mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 2/1.

IUPAC ime	(E)-N,N-dimetil-4-(2-(1-(prop-2-in-1-il)piperidin-4-il)vinil)benzensulfonamida (33)
Videz	Beli kristali
Tališče	T _{TAL} = 87-88 °C
TLC	R _f = 0,32 (MF: EtOAc/n-heksan = 2/1)
Izkoristek	15,9 %
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,56 (dt, J ₁ = 12,4 Hz, J ₂ = 3,4 Hz, 1H), 1,59 (dt, J ₁ = 12,0 Hz, J ₂ = 3,4 Hz, 1H), 1,81-1,85 (m, 2H), 2,14-2,23 (m, 1H), 2,27 (t, J = 2,4 Hz, 1H), 2,27-2,32 (m, 2H), 2,69 (s, 6H), 2,93-2,97 (m, 2H), 3,33 (d, J = 2,4 Hz, 2H), 6,33 (dd, J ₁ = 16,0 Hz, J ₂ = 6,7 Hz, 1H), 6,43 (d, J = 16,1 Hz, 1H), 7,48-7,51 (m, 2H), 7,68-7,71 (m, 2H).
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 31,80; 37,96; 38,97; 47,24; 52,16; 73,09; 79,01; 126,40; 126,88; 128,09; 133,24; 138,77; 142,13.
HRMS (ESI+)	Izračunano za C ₁₈ H ₂₅ O ₂ N ₂ S: 333,1631 [M+H] ⁺ Izmerjeno: 333,1627 [M+H] ⁺
HPLC	t _R = 5,56 min

4.11.7. Sinteza (*Z*)-*N,N*-dimetil-4-(2-(1-(prop-2-in-1-il)piperidin-4-il)vinil)benzensulfonamida (34**)**

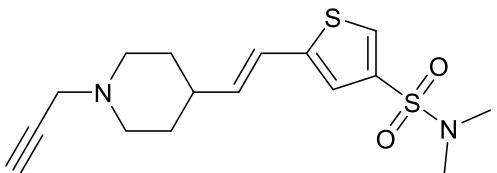


Slika 34: Končna spojina **34**.

Sintezo končne spojine **34** smo izvedli iz spojine **25** (0,10 g, 0,25 mmol, 1,0 ekv.), koncentrirane HCl (0,12 ml, 3,75 mmol, 15,0 ekv.), Cs₂CO₃ (0,25 g, 0,75 mmol, 3,0 ekv.) in propargil bromida (80 % raztopina v toluenu, 0,04 ml, 0,41 mmol, 1,3 ekv.) po sinteznem postopku F in sinteznem postopku G. Za izvedbo kolonske kromatografije smo uporabili mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 2/1.

IUPAC ime	(<i>Z</i>)- <i>N,N</i> -dimetil-4-(2-(1-(prop-2-in-1-il)piperidin-4-il)vinil)benzenesulfonamida (34)
Videz	Brezbarvna oljnata snov
TLC	R _f = 0,29 (MF: EtOAc/n-heksan = 2/1)
Izkoristek	3,6 %
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,53 (m, 2H), 1,72-1,76 (m, 2H), 2,24 (dt, J_1 = 11,6 Hz, J_2 = 2,5 Hz, 2H), 2,25 (t, J = 2,4 Hz, 1H), 2,47-2,57 (m, 1H), 2,74 (s, 6H), 2,88-2,93 (m, 2H), 3,32 (d, J = 2,4 Hz, 2H), 5,65 (dd, J_1 = 11,7 Hz, J_2 = 10,3 Hz, 1H), 6,40 (d, J = 11,8 Hz, 1H), 7,37-7,40 (m, 2H), 7,73-7,76 (m, 2H).
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 32,13; 34,66; 37,96; 47,25; 51,75; 73,13; 78,88; 126,60; 127,81; 128,95; 133,40; 139,97; 142,19.
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₈ H ₂₅ O ₂ N ₂ S: 333,1631 [M+H] ⁺ Izmerjeno: 333,1626 [M+H] ⁺
HPLC	t _R = 5,66 min

4.11.8. Sinteza (*E*)-*N,N*-dimetil-5-(2-(1-(prop-2-in-1-il)piperidin-4-il)vinil)tiofen-3-sulfonamida (35)



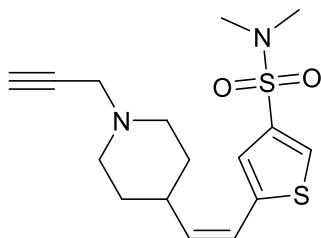
35

Slika 35: Končna spojina 35.

Sintezo končne spojine 35 smo izvedli iz spojine 26 (0,10 g, 0,23 mmol, 1,0 ekv.), koncentrirane HCl (0,11 ml, 3,45 mmol, 15,0 ekv.), K₂CO₃ (0,10 g, 0,69 mmol, 3,0 ekv.) in propargil bromida (80 % raztopina v toluenu, 0,03 ml, 0,37 mmol, 1,3 ekv.) po sinteznem postopku F in sinteznem postopku G. Za izvedbo kolonske kromatografije smo uporabili mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 2/1.

IUPAC ime	(<i>E</i>)- <i>N,N</i> -dimetil-5-(2-(1-(prop-2-in-1-il)piperidin-4-il)vinil)tiofen-3-sulfonamid (<u>35</u>)
Videz	Brezbarvna oljnata snov
TLC	R _f = 0,35 (MF: EtOAc/n-heksan = 2/1)
Izkoristek	3,3 %
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,53 (dt, <i>J</i> ₁ = 12,2 Hz, <i>J</i> ₂ = 3,5 Hz, 1H), 1,56 (dt, <i>J</i> ₁ = 12,3 Hz, <i>J</i> ₂ = 3,5 Hz, 1H), 1,78-1,83 (m, 2H), 2,08-2,18 (m, 1H), 2,26 (t, <i>J</i> = 2,3 Hz, 1H), 2,27-2,31 (m, 2H), 2,74 (s, 6H), 2,91-2,96 (m, 1H), 3,33 (d, <i>J</i> = 2,3 Hz, 2H), 6,10 (dd, <i>J</i> ₁ = 15,8 Hz, <i>J</i> ₂ = 6,8 Hz, 1H), 6,44 (d, <i>J</i> = 15,9 Hz, 1H), 7,04 (s, 1H), 7,65-7,66 (m, 1H).
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 31,59; 37,90; 38,62; 47,17; 52,04; 73,17; 78,86; 120,42; 122,21; 128,15; 135,52; 137,64; 145,19.
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₆ H ₂₃ O ₂ N ₂ S ₂ : 339,1195 [M+H] ⁺ Izmerjeno: 339,1193 [M+H] ⁺
HPLC	t _R = 5,46 min

4.11.9. Sinteza (*Z*)-*N,N*-dimetil-5-(2-(1-(prop-2-in-1-il)piperidin-4-il)vinil)tiofen-3-sulfonamida (**36**)



36

Slika 36: Končna spojina **36**.

Sintezo končne spojine **36** smo izvedli iz spojine **27** (0,10 g, 0,23 mmol, 1,0 ekv.), koncentrirane HCl (0,11 ml, 3,45 mmol, 15,0 ekv.), K₂CO₃ (0,10 g, 0,69 mmol, 3,0 ekv.) in propargil bromida (80 % raztopina v toluenu, 0,03 ml, 0,37 mmol, 1,3 ekv.) po sinteznem postopku F in sinteznem postopku G. Za izvedbo kolonske kromatografije smo uporabili mobilno fazo EtOAc/n-heksan = 2/1.

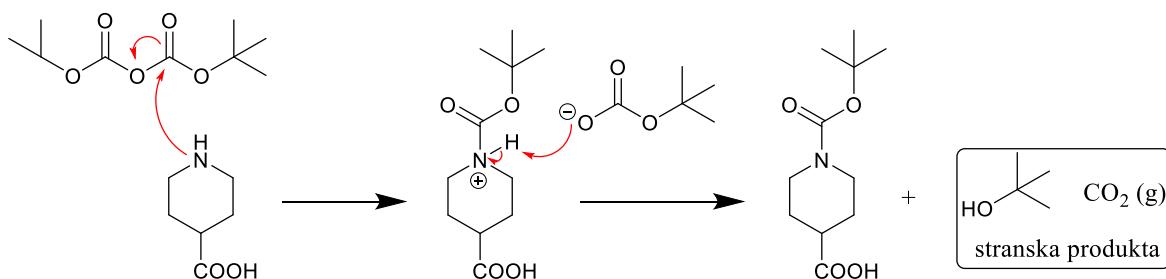
IUPAC ime	(<i>Z</i>)- <i>N,N</i> -dimetil-5-(2-(1-(prop-2-in-1-il)piperidin-4-il)vinil)tiofen-3-sulfonamid (36)
Videz	Brezbarvna oljnata snov
TLC	R _f = 0,24 (MF: EtOAc/n-heksan = 2/1)
Izkoristek	1,7 %
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,52-1,62 (m, 2H), 1,78-1,83 (m, 2H), 2,27 (t, J = 2,4 Hz, 1H), 2,31 (dt, J ₁ = 12,0 Hz, J ₂ = 2,1 Hz, 2H), 2,64-2,72 (m, 1H), 2,76 (s, 6H), 2,91-2,96 (m, 2H), 3,34 (d, J = 2,4 Hz, 2H), 5,59 (dd, J ₁ = 11,5 Hz, J ₂ = 10,0 Hz, 1H), 6,42 (d, J = 11,6 Hz, 1H), 7,08-7,09 (m, 1H) 7,08-7,09 (d, J = 1,1 Hz, 1H).
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆)	δ (ppm) = 31,00; 35,50; 37,47; 46,38; 51,14; 75,68; 79,31; 119,95; 125,82; 131,22; 134,13; 137,13; 141,57.
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₆ H ₂₃ O ₂ N ₂ S ₂ : 339,1195 [M+H] ⁺ Izmerjeno: 339,1192 [M+H] ⁺
HPLC	t _R = 5,55 min

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV

5.1.1. UVEDBA ZAŠČITNE SKUPINE BOC

V prvi stopnji reakcijske poti smo uvedli *terc*-butiloksikarbonilno (Boc) zaščitno skupino na aminski del izhodne komercialno dostopne spojine piperidin-4-karboksilne kisline. To smo storili zaradi večje selektivnosti pri nadalnjem poteku reakcij in se tako izognili nastanku neželenih produktov, saj smo tako zmanjšali reaktivnost nukleofilnega aminskega centra v spojini. Zaščitno skupino Boc smo uporabili, ker jo enostavno uvedemo, se enostavno odščiti pri kislih pogojih in je obstojna v širokem območju pH (39). Zaščito smo izvedli z di-*terc*-butil dikarbonatom (Boc_2O), ki smo ga dodali raztopljeni piperidin-4-karboksilni kislini v zmesi 1,4-dioksana in 1 M NaOH. Potekla je reakcija nukleofilne adicije amina na elektrofilno karbonilno skupino Boc_2O (slika 38), eliminiral pa se je *terc*-butilni alkohol.



Slika 37: Mehanizem uvedbe zaščitne skupine Boc. Nastaneta tudi stranska produkta *terc*-butanol in CO_2 . Pritejeno po (40).

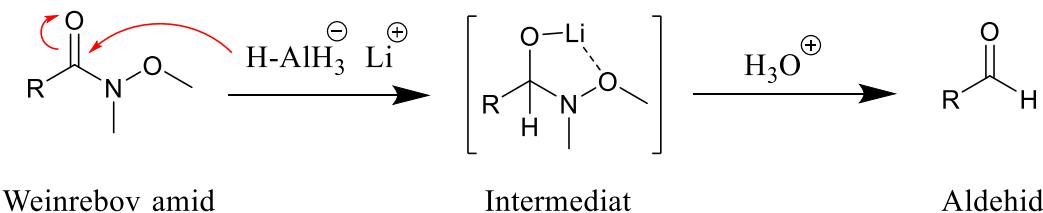
Po poteku reakcije smo organsko topilo odparili ter nakisali vodno fazo z 1 M HCl, da smo natrijevo sol produkta pretvorili v neionizirano obliko. Tu smo morali paziti, da nismo vodne faze nakisali preveč, saj bi tako lahko potekla odščita skupine Boc. Oborjeni produkt smo odfiltrirali z odsesavanjem pod znižanim tlakom. Izkoristek reakcije je bil zelo visok (87,5 %).

5.1.2. SINTEZA WEINREBOVEGA AMIDA IN REDUKCIJA DO ALDEHIDA

V naslednji stopnji naše reakcijske poti smo iz zaščitene karboksilne spojine **1** sintetizirali Weinrebov amid (spojina **2**). Pri reakciji smo uporabili *N,O*-dimetilhidroksilaminijev klorid, ki se že dolgo uporablja v organski kemiji za sintezo aldehydov in ketonov. Ker je karbonilni ogljik slab elektrofil in je skupina OH slabo izstopajoča skupina smo za potek reakcije uporabili sklopitveni reagent TBTU in tako zagotovili bolj elektrofilno karboksilno skupino.

Za začetek reakcije s TBTU je z odcepom protona iz karboksilne kisline poskrbela baza Et₃N. Reakcija je potekla brez večjih posebnosti, izkoristek je znašal 72,3 %.

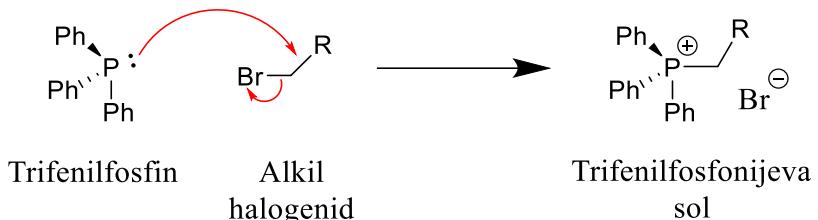
Nato smo v drugi stopnji reakcije Weinrebov amid (spojina **2**) reducirali do aldehyda z uporabo močno nukleofilnega reducenta LiAlH₄. Ker LiAlH₄ burno reagira z vodo, smo reakcijo izvajali v brezvodnem THF pod argonovo atmosfero. Po kapljicah smo dodali nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ in tako ustavili reakcijo. Ker smo uporabili karboksilno kislino, ki smo jo predhodno pretvorili v Weinrebov amid, smo dosegli uspešno redukcijo do aldehyda (spojina **3**). Če bi namesto Weinrebovega amida uporabili druge derivate karboksilne kisline, bi zaradi boljše elektrofilnosti aldehyda od preostalega derivata karboksilne kisline, aldehyd reagiral z LiAlH₄ do alkohola. Pri Weinrebovem amidu je to onemogočeno s stabilizacijo reakcijskega intermediata. Šele po dodatku vode le-ta razpade in reakcijo lahko posledično ustavimo na stopnji aldehyda (41, 42).



Slika 38: Mehanizem redukcije Weinrebovega amida do aldehida z uporabo LiAlH₄. Pritejeno po (41).

5.1.3. SINTEZA WITTIGOVIH REAGENTOV

Našo reakcijsko pot smo nadaljevali s sintezo Wittigovih reagentov, ki so skupaj z aldehydom (spojina **3**) vstopali v Wittigovo reakcijo. Wittigovi reagenti so največkrat trifenilfosfonijeve soli različnih alkil halogenidov, pri katerih reakcija poteka preko mehanizma nukleofilne substitucije (slika 41). Reakcije naših derivatov smo pustili potekati preko noči na refluksu ($90\text{ }^{\circ}\text{C}$).



Slika 39: Mehanizem nastanka trifenilfosfonijeve soli. Pritejeno po (43).

Pri sintezi nekaterih fosfonijevih soli smo morali pred vstopom v reakcijo ustreznou pripraviti izhodne spojine. Reakcija spojine **4** je potekla s klorsulfonsko kislino in izhodno spojino 5-klorotiofen-2-karboksilno kislino po mehanizmu elektrofilne aromatske substitucije do sulfonil klorida. Pri tej reakciji moramo biti izredno previdni, saj je klorsulfonska kislina jedka, povzroča draženje kože in oči, ter burno reagira z vodo do sulfonske kisline in klorovodikove kisline (44). Izkoristek reakcije je bil 74,2 %.

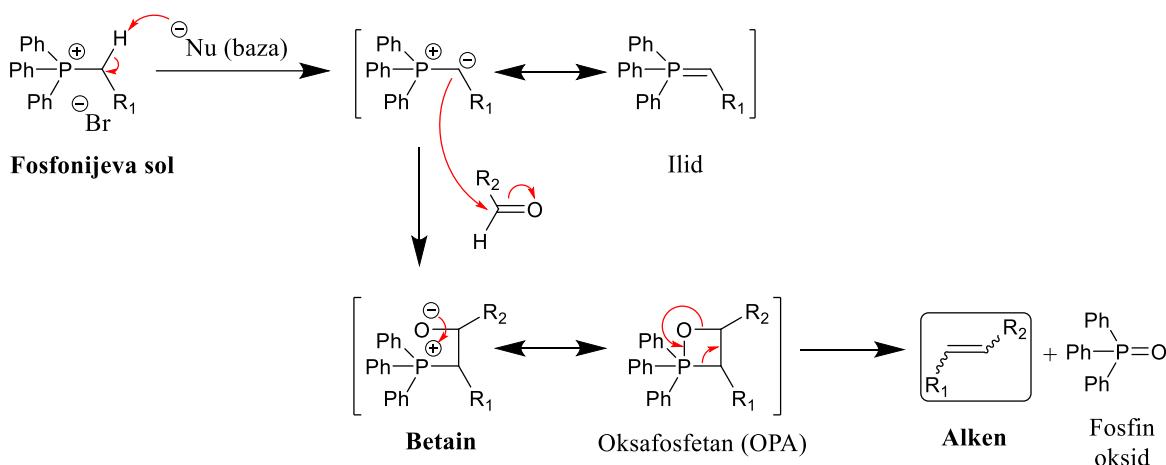
Spojini **5** in **6** smo sintetizirali z dodatkom dimetilaminijevega klorida po sinteznem postopku A in tako tvorili sulfonamid iz izhodnih sulfonil kloridov. Reakcija je potekla po mehanizmu nukleofilne substitucije. Pri spojini **6** je bil izkoristek reakcije 85,3 %, medtem ko je bil izkoristek reakcije pri spojini **5** samo 10,4 %. To bi lahko razložili z nastankom stranskih produktov na mestu 2 spojine **4**.

Nato smo spojine **5**, **6** in izhodno spojino 5-klorotiofen-2-karboksilno kislino reducirali z LiAlH₄ do alkoholov. Pri tem nas je presenetilo, da je pri spojini **5** poleg redukcije potekla tudi odstranitev klora iz aromatskega obroča. Produkte smo brez dodatnega čiščenja natehtali v bučko, jih raztopili v diklorometanu in v reakcijsko zmes dodali tetrabromometan ter trifenilfosfin. Prišlo je do zamenjave hidroksilne skupine z bromom po mehanizmu nukleofilne substitucije. Končne alkil bromidne produkte smo očistili s kolonsko kromatografijo. Izkoristka spojine **8** in **10** sta bila približno 50 %, izkoristek spojine **12**, kateremu izhodni reagent je bila spojina **5**, pa le 28,0 %.

Po končani reakciji za pripravo Wittigovih reagentov smo soli izolirali brez večjih težav. Najprej smo v reakcijsko bučko dodali dietileter, kar je povzročiloobarjanje produkta, ki smo ga nato odfiltrirali z odsesavanjem pod znižanim tlakom in posušili preko noči pri sobni temperaturi. Vse soli (spojine **13-17**) so imele zelo visoke izkoristke (okoli 90 %), razen pri spojini **13** in **15** je bil izkoristek nižji zaradi neznanih razlogov.

5.1.4. WITTIGOVA REAKCIJA

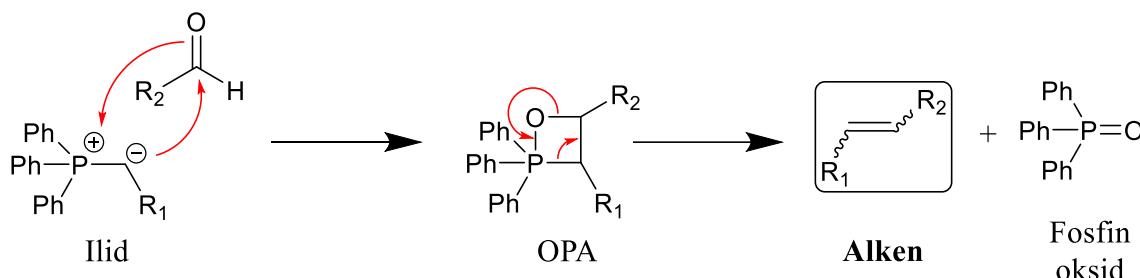
Wittigova reakcija je ključna stopnja naše sintezne poti in je ena od najbolj uporabljenih metod za sintezo alkenov. Uporablja se predvsem zato, ker je regiospecifična, poteka pod milimi reakcijskimi pogoji, izhodni materiali za pripravo fosfonijevih ilidov pa so lahko dostopni (46). Wittigova reakcija poteka med karbonilno skupino (po navadi aldehid ali keton) in fosfonijevim (po navadi trifenilfosfonijevim) ilidom do alkena in stranskega produkta fosfin oksida. Skozi leta je bilo predlaganih več možnih mehanizmov reakcij. Prvi mehanizem je predlagal sam Wittig s sodelavci leta 1953 in je predstavljen na sliki 41.



Slika 40: Mehanizem Wittigove reakcije preko betainskega intermediata. Pritejeno po (45, 46).

Za začetek reakcije in nastanek trifenilfosfonijevega ilida je potrebna baza, katera odcepi proton metilenske skupine trifenilfosfonijeve soli. To smo lahko opazili tudi sami, saj so se takrat naše reakcijske zmesi obarvale v kombinacije rdečih, rumenih ali oranžnih barv. Ilid nato napade karbonilno skupino po mehanizmu nukleofilne adicije, kar povzroči nastanek intermediata betaina, kateri se kasneje ciklizira do oksafosfetana (OPA), ki na koncu razпадne do končnih produktov Wittigove reakcije, alkena in fosfin oksida. Kljub številnim dokazom, da predlagani mehanizem preko betaina ni pravilen, se še vedno pogosto pojavlja v literaturi (45, 46).

Danes sodobno razumevanje Wittigove reakcije temelji na mehanizmu, ki sta ga predlagala Vedejs in Snoble (45). Ta poteka preko direktne irreverzibilne [2+2] cikloadicije ilida in aldehida do OPA, katerega obroč se nato irreverzibilno in stereoselektivno odpre, kar pripelje do nastanka alkena in fosfin oksida. Mehanizem reakcije je predstavljen na sliki 42.



Slika 41: Danes veljaven mehanizem Wittigove reakcije. Prijeljeno po (45).

Za stereoselektivnost Wittigove reakcije pa je pomembna reaktivnost posameznega ilida, ki je odvisna od substituenta R vezanega na α -ogljik. Ločimo nestabilizirane ilide, pri katerih je R substituiran z alkilno skupino, semistabilizirane ilide, katere smo uporabili pri našem delu in imajo R substituiran z arilno ali alkenilno skupino, ter stabilizirane ilide, pri katerih je R substituiran z elektron privlačno skupino, kot je na primer karbonilna skupina. Nestabilizirani ilidi dajejo pretežno *cis* (*Z*) izomere, stabilizirani ilidi *trans* (*E*) izomere, medtem ko so semistabilizirani ilidi neselektivni, zato smo pri našem delu dobili oba izomera produkta (42, 45).

Ker se izomera med seboj razlikujeta po fizikalno-kemijskih lastnostih, smo jih lahko ločili z uporabo kolonske kromatografije. Pri vseh spojinah je imel izomer *trans* nižji R_f kot izomer *cis*. Prisotnost različnih izomerov pa smo tudi potrdili s spektroskopijo NMR, pri kateri je pri spektrih ^1H sklopitvena konstanta protonov ob dvojni vezi izomerov *trans* višja kot pri izomerih *cis*. Pri vseh spojinah nam je uspelo izolirati izomere *cis* in *trans*. Količinsko gledano je prevladoval izomer *trans*, kar lahko razložimo z bolj sterično ugodno razporeditvijo substituentov ob dvojni vezi. Izkoristki vseh spojin (18 - 27) so bili relativno slabi, vrednost le-teh se je gibala med 15,2 % in 32,4 %, saj verjetno piperidinski obroč, na katerega je vezan aldehid, sterično ovira dostop C-nukleofila fosfonijeve soli.

5.1.5. ODSTRANITEV ZAŠČITNE SKUPINE BOC

Po Wittigovi reakciji je sledila odščita *tert*-butilkarbamatne zaščitne skupine piperidinskih intermedirov. Raztopljeni spojni v etanolu smo dodali koncentrirano HCl , potekla je acidoliza karbamata. Potez reakcije smo spremljali s tankoplastno kromatografijo, saj spojine v obliki soli ne potujejo po ploščici TLC. Po odstranitvi organskega topila smo produkte spirali z dietil etrom, ter se tako znebili prebitne HCl . Končne spojine smo brez dodatnega čiščenja takoj uporabili v naslednji stopnji reakcije. Tukaj bi bilo verjetno bolje,

da bi produkte še dodatno posušili preko noči v sušilniku in se na ta način znebili morebitne zaostale kisline, ter tako vplivali na boljši izkoristek v zadnji reakcijski stopnji.

5.1.6. ALKILACIJA PIPERIDINSKEGA DUŠIKA

V zadnji stopnji reakcijske poti smo izvedli alkilacijo piperidinskega dušika in tako na odščiteni amin pripeli propargilno skupino, ki je ključna za zaviralno delovanje MAO. Pri tem je nastala kovalentna vez med atomom dušika in propargilno skupino po mehanizmu nukleofilne substitucije. Za potek reakcije smo uporabili bazo K_2CO_3 ali Cs_2CO_3 , ki je služila tudi pri nevtralizaciji sproščene kisline. Ker je propargil bromid občutljiv na svetlobo, smo reakcijsko bučko ovili v aluminijasto folijo (47). Sam potek reakcije smo spremljali na ploščici TLC, po kateri naš produkt potuje, medtem ko nezreagirana izhodna sol ostane na dnu. Pri spojinah (**30** - **32**) smo opazili, da je na začetku ploščice TLC ostalo še veliko izhodne soli, zato smo dodali še polovične količine propargil bromida in baze. Kljub temu pa so bili izkoristki vseh reakcij zelo slabi, saj so se gibali med 1,7 % in 15,9 %, večina jih je bila pod 10 %. Zaradi zelo slabega izkoristka reakcije pri analogu *cis* končne spojine **28**, smo lahko izolirali samo 0,40 mg te spojine, kar ni bilo dovolj za biološko testiranje. Pri ostalih spojinah smo uspeli očistiti in izolirati vsaj nekaj miligramov le-teh, kar je bilo dovolj za nadaljnja testiranja.

Sumimo, da je vzrok majhnih izkoristkov alkilacije v reagentu, propargil bromidu, ki je bil sicer hranjen v hladilniku, vendar je bil že večkrat uporabljen. Ker pa je propargil bromid občutljiv na svetlobo, je verjetno to vplivalo na zmanjšanje kakovosti reagenta. Do manjših izkoristkov te reakcije pa je lahko prišlo tudi že zaradi relativno slabih izkoristkov Wittigove reakcije. Zaradi tega smo delali z manjšimi količinami, kar je lahko vplivalo na dodatne izgube produkta pri čiščenju končnih spojin s kolonsko kromatografijo.

5.2. REZULTATI IN KOMENTAR BIOLOŠKEGA VREDNOTENJA

Na človeških encimih hMAO-A in hMAO-B je bilo testiranih 9 končnih spojin. Kot je že bilo omenjeno analoga *cis* spojine **28** nismo uspeli sintetizirati v dovolj veliki količini, da bi lahko izvedli biološko testiranje. Vsem ostalim spojinam smo uspešno določili rezidualno aktivnost (RA) encima pri $100 \mu M$ zaviralca. RA je razmerje med aktivnostjo encima ob prisotnosti zaviralca in njegovi odsotnosti, torej nam pove, kako močan zaviralec encima je neka določena spojina. Manjša vrednost RA pomeni, da je spojina močnejši zaviralec.

Spojinam, ki so imele RA nižjo od 50 %, smo izračunali tudi srednjo zaviralno koncentracijo (IC_{50}). IC_{50} predstavlja koncentracijo spojine, ki je potrebna za 50 % zaviranje encima *in vitro*. Rezultati biološkega testiranja so predstavljeni v Preglednici IV.

Preglednica IV: Rezultati biokemijskega testiranja končnih sintetiziranih spojin. Krepko tiskano so označene vrednosti IC_{50} , poševno tiskano so označeni rezultati RA.

Oznaka spojine	Struktura spojine	hMAO-A IC_{50} [μM] ali RA [%] pri 100 μM	hMAO-B IC_{50} [μM] ali RA [%] pri 100 μM
<u>28</u>		$64.6 \pm 1.8\%$	$18,358 \pm 1,412 \mu M$
<u>29</u>		$60.6 \pm 1.5\%$	$0,992 \pm 0,068 \mu M$
<u>30</u>		$0,463 \pm 0,013 \mu M$	$10,756 \pm 0,759 \mu M$
<u>31</u>		$67.3 \pm 0.2\%$	$0,137 \pm 0,010 \mu M$
<u>32</u>		$1,595 \pm 0,491 \mu M$	$0,833 \pm 0,049 \mu M$
<u>33</u>		$56.2 \pm 7.0\%$	$0,022 \pm 0,003 \mu M$

34		$81.5 \pm 1.5\%$	1,900 ± 0,129 μM
35		$64.6 \pm 5.0\%$	0,698 ± 0,052 μM
36		$64.4 \pm 5.2\%$	18,848 ± 3,528 μM

Iz rezultatov biološkega testiranja smo ugotovili, da so vse naše spojine močnejši zaviralci izoforme MAO-B kot MAO-A, razen spojine **30**. Izmed 9 spojin sta samo 2 spojini (**30** in **32**) dovolj zavirali MAO-A, da smo jima lahko izračunali IC₅₀. Če pogledamo spojini **30** in **32**, lahko sklepamo, da je za vezavo v aktivno mesto MAO-A encima ugodnejša konformacija spojine *cis*, katera ima na svojo strukturo vezane tudi halogene, ki lahko tvorijo dodatne interakcije v aktivnem mestu encimov.

Pri zaviranju MAO-B so se najbolje odrezali analogi spojin *trans*. Te so vsaj 10-krat močneje zavirali encim, kot njihovi analogi *cis*. Najbolje se je odrezala spojina **33**, ki v obliki *trans* za kar 100-krat močneje zavira izoformo MAO-B kot njen izomer *cis*. Njena IC₅₀ je 22 nM, kar je vsaj en velikostni razred manj kot IC₅₀ ostalih izoliranih spojin, ki so tudi izkazovale močno zaviranje izoforme MAO-B in je njihova IC₅₀ še vedno v nanomolarnem območju. Te spojine so **29**, **31**, **32**, **35**, njihove IC₅₀ pa so 992 nM, 137 nM, 833 nM in 698 nM. Daleč najslabše sta se odrezali spojini **28** in **36**. Iz tega lahko sklepamo, da večji, bolj voluminozni substituenti niso primerni za vezavo v aktivno mesto MAO-B, ker sterično ovirajo vezavo ali pa tvorijo manj interakcij z aktivnim mestom encima, kar potrjujejo tudi literaturni podatki.

Če primerjamo delovanje različnih substituentov naših izomerov spojin *trans* na izoformo MAO-B, vidimo, da ne prihaja do velikih razlik pri zavirальнem delovanju. Vsi izomeri *trans* (**29**, **31**, **35**) imajo IC₅₀ med 0,1 in 1 μM, razen že prej omenjenih dveh izjem: spojina **28**, ki

ima velik klorobenzotiofenski substituent in je izkazovala eno najšibkejših zaviralnih aktivnosti na MAO-B, ter spojina **33**, z 4-(dimetilsulfamoil)fenilnim substituentom, ki je izkazovala najmočnejše zaviralno delovanje na izoformo MAO-B. Razlike med ostalimi substituenti, kot so furan s trifluorometilno skupino (spojina **29**), klorotiofenski (spojina **31**) in tiofensulfonamidni substituent (spojina **35**) pa so primerljive z našo izhodno spojino s fluorostirilnim substituentom.

6. SKLEP

Pri eksperimentalnem delu naše magistrske naloge smo uspešno sintetizirali benzenske, furanske in tiofenske derivate na osnovi že znanih zaviralcev 4-(4-fluorostiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina in 4-(4-(metilsulfonil)stiril)-1-(prop-2-in-1-il)piperidina, kateri so izkazovali zaviralno delovanje na encimu MAO. Na podlagi rezultatov biokemičnega testiranja zaviralne aktivnosti na človeških encimih MAO-A in MAO-B smo sklepali o odnosu med strukturo in delovanjem sintetiziranih spojin.

Sintezna pot je obsegala večstopenjsko sintezo, pri kateri smo sintetizirati izomere spojin *cis* in *trans* z Wittigovo reakcijo med trifenilfosfonijevimi solmi iz različnih arilmetil bromidov in aldehidom, kar je privedlo do željenih alkenov. Zaradi steričnega oviranja voluminoznih substituentov soli in aldehida je med reakcijo nastalo več izomera *trans*.

Rezultati biokemičnega vrednotenja so potrdili, da so izomeri *trans* močnejši zaviralci MAO-B in izomeri *cis* močnejši zaviralci MAO-A. To tudi sovpada z literurnimi podatki o oblikih aktivnih mest izoform MAO. Med sintetiziranimi spojinami je imela najmočnejšo zaviralno delovanje na MAO-A spojina **30**, analog *cis*, ki ima v svoji strukturi furan s trifluorometilno skupino. Najmočnejši zaviralec izoforme MAO-B pa je bil izomer *trans* z 4-(dimetilsulfamoil)fenilnim substituentom (spojava **33**) z IC₅₀ 22 nM. Ostali benzenski, furanski in tiofenski derivati (spojine **29**, **31** in **35**) so po zaviranju MAO-B primerljivi z našo izhodno spojino s 4-fluorofenilnim fragmentom in imajo IC₅₀ v območju 137-992 nM.

Rezultati magistrskega dela predstavljajo pomemben prispevek pri razumevanju, načrtovanju in razvoju novih zaviralcev MAO, predvsem izoforme MAO-B. Spojava (*E*)-*N,N*-dimetil-4-(2-(1-(prop-2-in-1-il)piperidin-4-il)vinil)benzensulfonamid (**33**) predstavlja dobro izhodišče za nadaljnji razvoj novih nanomolarnih zaviralcev MAO-B kot potencialnih zdravilnih učinkovin v terapiji nevrodegenerativnih bolezni.

7. LITERATURA

1. Gaweska H, Fitzpatrick P: Structures and Mechanism of the Monoamine Oxidase Family. *BioMolecular Concepts* 2011; 2 (5): 365-377.
2. Slotkin TA: Mary Bernheim and the discovery of monoamine oxidase. *Brain Research Bulletin* 1999; 50 (5-6): 373.
3. Reyes-Parada M, Fierro A, Iturriaga-Vásquez P, Cassels BK: Monoamine Oxidase Inhibition In the Light of New Structural Data. *Current Enzyme Inhibition* 2005; 1 (1): 85-95.
4. Youdim MBH, Edmondson D, Tipton KF: The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nature Reviews Neuroscience* 2006; 7 (4): 295-309.
5. Wang CC, Billett E, Borchert A, Kuhn Hartmut, Ufer C: Monoamine oxidases in development. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2013; 70: 599-630.
6. Youdim MBH, Bakhle YS: Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. *British Journal of Pharmacology* 2006; 147: 287–296.
7. Upadhyay, AK, Borbat, PP, Wang J, Freed JH, Edmondson, DE. Determination of the oligomeric states of human and rat monoamine oxidases in the outer mitochondrial membrane and octyl beta-D-glucopyranosidemicelles using pulsed dipolar electron spin resonance spectroscopy. *Biochemistry* 2008; 47 (6): 1554–1566.
8. Edmondson DE, Binda C, Mattevi A: The FAD Binding Sites of Human Monoamine Oxidases A and B. *Neurotoxicology* 2004; 25 (1-2): 63-72.
9. Binda C, Newton-Vinson P, Hubalek F, Edmondson DE, Mattevi A: Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders. *Nature structural biology* 2002; 9 (1): 22-26.
10. Finberg JPM: 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 (2): 133-152.
11. Edmondson DE, Binda C, Mattevi A: Structural insights into the mechanism of amine oxidation by monoamine oxidases A and B. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2007; 464 (2): 269-276.
12. Edmondson DE, Mattevi A, Binda C, Li M, Hubalek F: Structure and mechanism of monoamine oxidase. *Current Medicinal Chemistry* 2004; 11 (15): 1983-1993.

13. Tipton KF, Boyce S, O'Sullivan J, Davey GP, Healy J: Monoamine oxidases: certainties and uncertainties. *Current Medicinal Chemistry* 2004; 11 (15): 1965-82.
14. Shulman KI, Herrmann N, Walker SE: Current Place of Monoamine Oxidase Inhibitors in the Treatment of Depression. *CNS Drugs* 2013; 27 (10): 789–797.
15. Finberg JPM, Rabey JM: Inhibitors of MAO-A and MAO-B in Psychiatry and Neurology. *Frontiers in Pharmacology* 2016; 7: 340.
16. Boyer EW, Shannon M: The serotonin syndrome. *New England Journal of Medicine* 2005; 352 (11): 1112-1120.
17. Gillman PK: Advances Pertaining to the Pharmacology and Interactions of Irreversible Nonselective Monoamine Oxidase Inhibitors. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 2011; 31 (1): 66-74.
18. Youdim MB, Weinstock M: Therapeutic applications of selective and non-selective inhibitors of monoamine oxidase A and B that do not cause significant tyramine potentiation. *NeuroToxicology* 2004; 25 (1-2): 243-250.
19. Grady MM, Stahl SM: Practical guide for prescribing MAOIs: debunking myths and removing barriers. Cambridge University Press 2012; 17: 2-10.
20. Beverly J. McCabe-Sellers BJ, Staggs CG, Bogle ML: Tyramine in foods and monoamine oxidase inhibitor drugs: A crossroad where medicine, nutrition, pharmacy, and food industry converge. *Journal of Food Composition and Analysis* 2006; 19: 58-65.
21. [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/B9ED00A5FCF83737C12579C2003F575A/\\$File/s-017567.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/B9ED00A5FCF83737C12579C2003F575A/$File/s-017567.pdf) (Povzetek glavnih značilnosti zdravila: Aurorix. JAZMP 2016; dostopano 23. 6. 2018)
22. Frieling H, Bleich S: Tranylcypromine - New perspectives on and “old” drug. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 2006; 256 (5): 268-273.
23. [http://www.cbz.si/zzzs/pao/bazazdr2.nsf/o/245057FDE2BADA52C12579C2003F537B/\\$File/s-007906.pdf](http://www.cbz.si/zzzs/pao/bazazdr2.nsf/o/245057FDE2BADA52C12579C2003F537B/$File/s-007906.pdf) (Povzetek glavnih značilnosti zdravila: Jumex. JAZMP 2010; dostopano 24. 6. 2018)
24. http://www.ema.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000574/WC500030048.pdf (Povzetek glavnih značilnosti zdravila: Azilect. EMA 2009; dostopano 24. 6. 2018)

25. Finberg JPM, Youdim MBH: Pharmacological properties of the anti-Parkinson drug rasagiline; modification of endogenous brain amines, reserpine reversal, serotonergic and dopaminergic behaviours. *Neuropharmacology* 2002; 43 (7): 1110-1118.
26. Weinreb O, Amit T, Bar-Am O, Chillag-Talmor O, Youdim MBH: Novel Neuroprotective Mechanism of Action of Rasagiline Is Associated with Its Propargyl Moiety: Interaction of Bcl-2 Family Members with PKC Pathway. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2005; 1053: 348-55.
27. Zindo FT, Joubert J, Malan SF: Propargylamine as functional moiety in the design of multifunctional drugs for neurodegenerative disorders: MAO inhibition and beyond. *Future Medicinal Chemistry* 2015; 7 (5): 609–629.
28. Carradori S, Silvestri R: New Frontiers in Selective Human MAO-B Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 2015; 58 (17): 6717-6732.
29. Riederer P, Lachenmayer L, Laux G: Clinical Applications of MAO-Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry* 2004; 11: 2033-2043.
30. Zisook SE: Clinical overview of monoamine oxidase inhibitors. *Psychosomatics* 1985; 26: 240–251.
31. Houtsmuller EJ, Thornton JA, Stitzer ML: Effects of selegiline (l-deprenyl) during smoking and short-term abstinence. *Psychopharmacology* 2002; 163; 213–220.
32. Živin M, Šket D: Temelji patološke fiziologije, 3. izdaja, UL MF Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2014: 295-313.
33. Drukarch B, van Muiswinkel FL: Drug Treatment of Parkinson's Disease: Time for phase II. *Biochemical Pharmacology* 2000; 59: 1023-1031.
34. Cai Z: Monoamine oxidase inhibitors: Promising therapeutic agents for Alzheimer's disease (Review). *Molecular Medicine Reports* 2014; 9 (5): 1533-1541.
35. Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H: Alzheimer's disease. *Lancet* 2006; 368 (9533): 387-403.
36. Huremović D: Načrtovanje in sinteza derivatov N-propargilpiperidina kot potencialnih zaviralcev monoaminoooksidaze tipa B in butiholinesteraze. Magistrska naloga; Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani; 2016.
37. Kojc P: Sinteza in vrednotenje potencialnih zaviralcev monoamin oksidaze tipa A in B z 1-propargilazetidinskim in 4-stiril-1-propargilpiperidinskim osnovnim skeletom. Magistrska naloga; Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani; 2017.

38. Dębski D, Smulik R, Zielonka J, Michałowski B, Jakubowska M, Dębowska K, Adamus J, Marcinek A, Kalyanaraman B, Sikora A: Mechanism of oxidative conversion of Amplex® Red to resorufin: Pulse radiolysis and enzymatic studies. Free Radic Biol Med. 2016; 95: 323-32.
39. Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, Pečar S: Farmacevtska kemija III: Vaje in Seminarji. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2010.
40. http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_Mech.htm (Common Organic Chemistry. Boc protection mechanism; dostopano 27. 6. 2018)
41. Nahm S, Weinreb SM: N-methoxy-N-methylamides as effective acylating agents. Tetrahedron Letters 1981; 22 (39): 3815-3818.
42. Bruckner R: Organic Mechanisms: Reactions, Stereochemistry and Synthesis, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1. izdaja, 2010: 311-312, 457-467, 795-800.
43. [http://www.chemtube3d.com/Nucleophilic%20substitution%20at%20the%20carbonyl%20group%20-%20Wittig%20reaction%20\(Ylid%20formation\).html](http://www.chemtube3d.com/Nucleophilic%20substitution%20at%20the%20carbonyl%20group%20-%20Wittig%20reaction%20(Ylid%20formation).html) (Phosphonium Ylid Formation; dostopano 28. 6. 2018)
44. <https://www.sigmadralich.com/catalog/product/sial/571024?lang=en®ion=SI> (Sigma-Aldrich, Chlorosulfonic acid; dostopano 29. 6. 2018)
45. Byrne PA, Gilheany DG: The modern interpretation of the Wittig reaction mechanism. Chemical Society Reviews 2013; 42 (16): 6670-6696.
46. Edmonds M, Abell A: Modern Carbonyl Olefination: The Wittig reaction, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2003: 1-17.
47. http://www.apolloscientific.co.uk/downloads/msds/OR01606_msds.pdf (Safety data sheet. Propargyl Bromide, 80 % solution in toluene. 2015; dostopano 3. 7. 2018)