

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**ALJA JANKOVIĆ**

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA KOVALENTNIH  
ZAVIRALCEV IMUNOPROTEASOMA**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF COVALENT  
IMMUNOPROTEASOME INHIBITORS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Magistrsko naložko sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm.

Masno spektroskopske meritve so bile opravljene na Inštitutu Jožef Štefan, ostale spektroskopske meritve pa na Fakulteti za farmacijo. Biokemijsko testiranje je izvedla asist. dr. Martina Gobec, mag. farm. s Katedre za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo.

### **Zahvala**

Zahvaljujem se prof. dr. Stanislavu Gobcu, mag. farm. in Damijanu Knezu, mag. farm. za strokovno pomoč in nasvete pri delu v laboratoriju ter končni izdelavi magistrske naloge.

Posebna zahvala gre moji družini, mami Andreji, očetu Miroljubu, bratu Alenu in babici Tereziji za vso podporo in pomoč tekom študija.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko naložko samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm.

Alja Janković

Ljubljana, 2016

# VSEBINA

1.	UVOD .....	1
1.1.	Proteasom in ubikvitin-proteasomska pot.....	1
1.2.	Struktura (imuno)proteasoma .....	2
1.2.1.	Imunoproteasom .....	5
1.3.	Zaviralci proteasoma.....	6
1.3.1.	Bortezomib (PS-341).....	9
1.3.2.	Druga generacija zaviralcev proteasoma .....	10
1.3.2.1.	Carfilzomib (PR-171) in oprozomib (ONX-0912).....	10
1.3.2.2.	Delanzomib (CEP-18770) in ixazomib (MLN9708) .....	11
1.3.2.3.	Marizomib (NPI-0052, salinsporamid A) .....	12
1.3.3.	Selektivni zaviralci imunoproteasoma.....	12
1.3.3.1.	$\beta$ 1i selektivni zaviralci (UK-101 in IPSI-001).....	13
1.3.3.2.	$\beta$ 5i selektivni zaviralci (ONX-0914 in PR-924) .....	13
2.	NAMEN DELA.....	15
3.	MATERIALI IN METODE .....	17
3.1.	Materiali.....	17
3.2.	Metode .....	17
3.2.1.	Kromatografske metode .....	17
3.2.2.	Ekstrakcije in spiranja .....	18
3.2.3.	Prekristalizacija .....	18
3.2.4.	Spektroskopske metode .....	18
3.2.5.	Določanje temperature tališč .....	18
3.2.6.	Poimenovanje in risanje spojin.....	18
3.2.7.	Biokemijsko testiranje .....	19
4.	EKSPERIMENTALNO DELO IN REZULTATI ANALIZ .....	20

4.1.	Sinteza 6-amino-5-metil-3-fenil-7 <i>H</i> -furo[3,2- <i>g</i> ]kromen-7-ona ( <b>3f</b> ).....	20
4.1.1.	Sinteza etil 2-(hidroksiimin)-3-oksobutanoata ( <b>3a</b> ) .....	20
4.1.2.	Sinteza etil 2-acetamid-3-oksobutanoata ( <b>3b</b> ).....	21
4.1.3.	Sinteza <i>N</i> -(7-hidroksi-4-metil-2-okso-2 <i>H</i> -kromen-3-il)acetamida ( <b>3c</b> ).....	21
4.1.4.	Sinteza <i>N</i> -(4-metil-2-okso-7-(2-okso-2-feniletoksi)-2 <i>H</i> -kromen-3-il)acetamida ( <b>3d</b> ) .....	22
4.1.5.	Sinteza <i>N</i> -(5-metil-7-okso-3-fenil-7 <i>H</i> -furo[3,2- <i>g</i> ]kromen-6-il)acetamida ( <b>3e</b> ).....	23
4.1.6.	Sinteza 6-amino-5-metil-3-fenil-7 <i>H</i> -furo[3,2- <i>g</i> ]kromen-7-ona ( <b>3f</b> ) .....	24
4.2.	Sinteza 6-(aminometil)-5-metil-3-fenil-7 <i>H</i> -furo[3,2- <i>g</i> ]kromen-7-ona ( <b>4</b> ) .....	25
4.3.	Sinteza 2-ciano- <i>N</i> -(5-metil-7-okso-3-fenil-7 <i>H</i> -furo[3,2- <i>g</i> ]kromen-6-il)acetamida ( <b>5</b> ).....	26
4.4.	Sinteza 2-ciano- <i>N</i> -((5-metil-7-okso-3-fenil-7 <i>H</i> -furo[3,2- <i>g</i> ]kromen-6-il)metil)acetamida ( <b>6</b> ) .....	28
4.5.	Sinteza ( <i>E</i> )- <i>N</i> -(5-metil-7-okso-3-fenil-7 <i>H</i> -furo[3,2- <i>g</i> ]kromen-6-il)but-2-enamida ( <b>7</b> ).....	29
4.6.	Sinteza ( <i>E</i> )- <i>N</i> -((5-metil-7-okso-3-fenil-7 <i>H</i> -furo[3,2- <i>g</i> ]kromen-6-il)metil)but-2-enamida ( <b>8</b> ) .....	31
4.7.	Sinteza <i>N</i> -(5-metil-7-okso-3-fenil-7 <i>H</i> -furo[3,2- <i>g</i> ]kromen-6-il)akrilamida ( <b>9</b> ) ....	33
4.8.	Sinteza <i>N</i> -((5-metil-7-okso-3-fenil-7 <i>H</i> -furo[3,2- <i>g</i> ]kromen-6-il)metil)akrilamida ( <b>10</b> ).....	34
5.	REZULTATI IN RAZPRAVA .....	36
5.1.	Komentar sinteznih postopkov .....	36
5.1.1.	Pechmannova kondenzacija.....	36
5.1.2.	Modificirana Curtiusova reakcija .....	37
5.1.3.	Sinteza cianoacetamida.....	38
5.1.4.	Sinteza derivatov s <i>trans</i> -krotonatom.....	39
5.1.5.	Sinteza akrilamidov .....	39

5.2. Rezultati in razprava biokemijskega vrednotenja .....	39
6. SKLEP .....	42
7. LITERATURA .....	43
7.1. Viri slikovnega gradiva .....	44

# SLIKOVNO KAZALO

Slika 1: Ubikvitin-proteasomska pot (prirejeno po (8)) .....	2
Slika 2: Oblike proteasoma (prirejeno po (7)).....	3
Slika 3: 20S proteasom: $\alpha$ -podenote, ki tvorijo dva zunanja obroča, so prikazane zeleno in $\beta$ -podenote, ki tvorijo notranja obroča, so prikazane modro (prirejeno po (1a) in (2a)).....	4
Slika 4: Aldehydi in mehanizem reakcije (prirejeno po (9)).....	7
Slika 5: Vinil sulfoni in mehanizem reakcije (prirejeno po(9)).....	7
Slika 6: Vinil amidi in mehanizem reakcije (prirejeno po (9)).....	8
Slika 7: Boronati in mehanizem reakcije (prirejeno po (9)).....	8
Slika 8: $\alpha',\beta'$ -epoksiketoni in $\alpha$ -ketoaldehydi ter mehanizem reakcije (prirejeno po (9))....	9
Slika 9: $\beta$ -laktoni in mehanizem reakcije (prirejeno po (9)) .....	9
Slika 10: Bortezomib .....	10
Slika 11: Carfilzomib in oprozomib .....	11
Slika 12: Delanzomib in MLN2238 .....	12
Slika 13: Marizomib .....	12
Slika 14: UK-101 in IPSI-001 .....	13
Slika 15: ONX-0914 in PR-924 .....	14
Slika 16: Spojina zadetek .....	15
Slika 17: Optimiziranje spojine zadetka .....	16
Slika 18: Uvedba elektrofilnih bojnih glav na amino skupino .....	16
Slika 19: Pechmannova kondenzacija (prirejeno po (3a)).....	36
Slika 20: Modificirana Curtiusova reakcija (prirejeno po (17)) .....	37
Slika 21: Klasična Curtiusova prenestitev in hidroliza do amina .....	38
Slika 22: Sinteza acil kloridov .....	38
Slika 23: Alkalna hidroliza estra (prirejeno po (20)).....	39
Tabela 1: Rezultati biokemijskega vrednotenja.....	40

## POVZETEK

Proteasom je multikatalitični proteazni kompleks odgovoren za razgradnjo večine znotrajceličnih proteinov. Ima pomembno vlogo pri ohranjanju normalne celične homeostaze, regulira pa tudi številne druge celične procese. Konstitutivni proteasom je prisoten v praktično vseh tipih celic, imunoproteasom pa pretežno v celicah imunskega izvora. Zaradi udeleženosti tega encimskega kompleksa pri številnih boleznih predstavljata proteasom in še posebej imunoproteasom privlačno tarčo za nova zdravila. Leta 2003 in 2012 je Ameriška agencija za hrano in zdravila FDA odobrila prva zaviralca proteasoma, *bortezomib* in *carfilzomib*, ki ciljata tako konstitutivno obliko kot tudi imunoproteasom. Študije znanih zaviralcev proteasoma so potrdile, da selektivno zaviranje imunoproteasoma vodi v obetajočo terapijo za zdravljenje avtoimunskih in nevrodegenerativnih bolezni ter različnih rakavih obolenj.

V magistrski nalogi smo se posvetili načrtovanju in sintezi potencialnih kovalentnih zaviralcev humanega imunoproteasoma. Na osnovi spojine zadetek (**2**) smo sintetizirali dva osnovna psoralenska gradnika (**3f** in **4**). Spojino **3f** smo sintetizirali po večstopenjski sintezni shemi. S Pechmannovo kondenzacijo med resorcinolom in etil 2-acetamid-3-oksobutanoatom, ki je bil predhodno pripravljen iz etil 3-oksobutanoata, smo sintetizirali izhodni *N*-acetil zaščiten 3-amino-7-hidroksi-4-metil-kumarin. Sledila je nukleofilna substitucija z 2-bromo-1-feniletanonom in intramolekularna ciklizacija spojine. Nastalemu psoralenskemu intermediatu smo na koncu odstranili še acetamidno zaščitno skupino. Spojino **4** smo sintetizirali po objavljeni modificirani Curtiusovi reakciji. Predhodno pripravljeno 2-(5-metil-7-okso-3-fenil-7*H*-furo[3,2-*g*]kromen-6-il)ocetno kislino smo pretvorili v izocianat in le-tega hidrolizirali z raztopino kalijevega trimetilsilanolata v THF. Nastalima spojinama **3f** in **4** smo nato na amino skupino pripenjali različne elektrofilne bojne glave. Sintetizirali smo cianometilamidna derivata (**5** in **6**) in štiri alil/vinil amide (**7–10**). V biokemijskem vrednotenju na izolirani  $\beta$ 5i podenoti imunoproteasoma se je izkazalo, da uvedba različnih bojnih glav ni izboljšala aktivnosti izhodne spojine **2**.

**Ključne besede:** imunoproteasom, zaviralec, derivati psoralena

## ABSTRACT

The proteasome is a multicatalytic proteinase complex responsible for the degradation of most intracellular proteins, and plays an important role in maintaining normal cell homeostasis and regulation of many other cellular processes. Constitutive proteasome is present in almost all cell types whereas immunoproteasome is found mainly in cells of immune origin. Involvement of the enzyme complex in numerous diseases places proteasome and especially the immunoproteasome as an attractive target for new drugs. In 2003 and 2012 US Food and Drug Administration (FDA) approved first two proteasome inhibitors, *bortezomib* and *carfilzomib*, which are targeted at both the constitutive proteasome as well as immunoproteasome. Studies of the known proteasome inhibitors have confirmed that selective inhibition of immunoproteasome leads to a promising therapy for the treatment of autoimmune and neurodegenerative diseases as well as various cancers.

In the master thesis we have focused on the design and synthesis of potential covalent inhibitors of human immunoproteasome. Based on the virtual screening hit (**2**) we have synthesized two psoralene building blocks (**3f** and **4**). Compound **3f** was synthesized in several steps. Pechmann condensation between resorcinol and ethyl-2-acetamide-3-oxobutanoate, which was previously synthesized from ethyl 3-oxobutanoate, afforded *N*-acetyl protected 3-amino-7-hydroxy-4-methylcoumarine. The condensation was followed by nucleophilic substitution with 2-bromo-1-phenyletanone, and intramolecular cyclization of the compound. In the last step the acetamide protecting group was removed. Compound **4** was synthesized according to the published modified Curtius reaction. 2-(5-Methyl-7-oxo-3-phenyl-7*H*-furo[3,2-*g*]chromen-6-yl)acetic acid was converted to the isocyanate, which was further hydrolyzed with a solution of potassium trimethylsilanolate in THF. Various electrophilic »warheads« were introduced on the amino group of the resulting compounds **3f** and **4**. Two compounds with a nitrile-based electrophiles (**5** and **6**) and four vinylamide-based compounds (**7–10**) were synthesized. Evaluation on the isolated  $\beta$ 5*i* subunit of the immunoproteasome showed that the introduction of various electrophilic »warheads« does not enhance the inhibitory activity compared to the parent compound **2**.

**Key words:** immunoproteasome, inhibitor, psoralene derivatives

## SEZNAM OKRAJŠAV

ATR	oslabljeni popolni odboj
br s	široki singlet
CDCl <sub>3</sub>	devteriran kloroform
d	dublet
dd	dublet dubleta
DKM	diklorometan
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DPPA	difenilfosforil azid
dq	kuartet dubleta
ekviv.	molarni ekvivalent
Et <sub>3</sub> N	<i>N,N,N</i> -trietylamin
Et <sub>2</sub> O	dietil eter
EtOAc	etyl acetat
EtOH	etanol
ESI	ionizacija z razprševanjem raztopin v električnem polju
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HRMS	masna spektroskopija visoke ločljivosti
IR	infrardeča spektroskopija
m	multiplet
MeOH	metanol
MF	mobilna faza
MHz	megahertz

NMR	jedrska magnetna resonanca
NaOH	natrijev hidroksid
Pd/C	paladij na ogljiku
q	kvartet
RA	rezidualna aktivnost
Rf	retencijski faktor
s	singlet
SD	standardna deviacija
t	triplet
THF	tetrahidrofuran
Thr	treonin
TLC	tankoplastna kromatografija
TMS	tetrametilsilan
$t_R$	retencijski čas
tt	triplet tripleta
$\delta$	kemijski premik

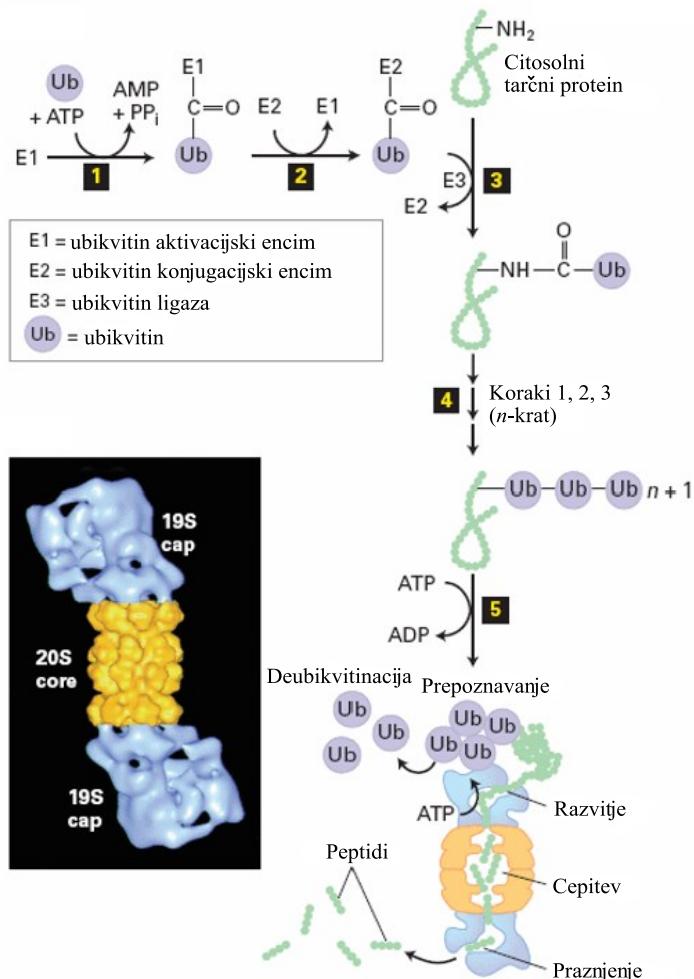
## 1. UVOD

### 1.1. Proteasom in ubikvitin-proteasomska pot

Proteasom je velik, multikatalitičen proteazni kompleks, ki ga najdemo v treh domenah življenja: v arhejah, nekaterih bakterijah in v vseh evkariontih (1, 2). V evkariontih se nahaja tako v citosolu kot v jedru celic. Proteasom je del reguliranega, strogo nadzorovanega in zapletenega ubikvitin proteasomskega sistema, s katerim celice razgradijo več kot 80% normalnih in nepravilno zvitih oziroma poškodovanih znotrajceličnih proteinov in uravnava koncentracije določenih proteinov, kot so ciklini in transkripcijski faktorji vključno s tumor-supresorjem p53 in NF-κB. Glavna naloga proteasoma je torej proteolitična razgradnja večine nepotrebnih oziroma poškodovanih proteinov. Igra pomembno vlogo pri ohranjanju normalne celične homeostaze in regulira številne druge celične procese, kot so proliferacija, diferenciacija, imunski in vnetni odziv, odziv telesa na stres, predstavitev antigenov in apoptoza. Razgradnja nefunkcionalnih proteinov je nujna tudi za recikliranje aminokislin. Motnje v tem procesu so tako povezane z različnimi boleznimi pri ljudeh, kar poudarja pomembnost proteasomskega sistema za vzdrževanje celične integritete (3–6).

Proteasom razgrajuje vse proteine, ki so označeni z majhnim proteinom - ubikvitinom, ki je sestavljen iz 76 aminokislin. Ubikvitinacija proteinov poteka v treh zaporednih korakih (slika 1). Najprej se v ATP odvisni reakciji ubikvitin aktivira preko ubikvitin aktivacijskega encima E1. Tvorí se tiolna estrska vez med terminalnim karboksilom ubikvitina in cisteinskim ostankom aktivacijskega encima E1. Ubikvitin se nato prenese na ubikvitin konjugacijski encim E2. V zadnjem koraku pa ena izmed ubikvitin ligaz E3 prepozna specifičen protein, ki je poškodovan, odvečen, toksičen ali kakorkoli drugače neuporaben za celico, in katalizira prenos ubikvitina iz E2 na ta tarčni protein. Vezava ene same molekule ubikvitina na takšen protein je znak za ostale ubikvitin ligaze E3, da vežejo na isti protein še več molekul ubikvitina. S tem se tvori poliubikvitinska veriga vezana na molekulo proteina. 26S proteasom prepozna protein kot označen, če so nanj vezane vsaj štiri molekule ubikvitina. Poliubikvitinirani proteini se vežejo na podenote v 19S regulatornem kompleksu proteasoma, kjer se v energetsko odvisni reakciji proteini deubikvitinirajo in razvijejo. Iz tarčnega proteina se odstrani poliubikvitinska oznaka in tako dobimo proste ter ponovno uporabne molekule ubikvitina. Razviti proteini se prenesejo v katalitično osrednjo votljino jedrnega delca 20S proteasoma,

kjer se razgradijo na peptide velike od 3 do 22 aminokislin. Tako razceppljeni peptidi izstopijo na nasprotni strani proteasoma in se lahko nadalje razgrajujejo preko citosolnih peptidaz, uporabijo za sintezo novih peptidov ali pa se prenesejo v endoplazmatski retikulum, kjer se vežejo na glavni histokompatibilnosti kompleks (MHC-I) (5, 7, 8).



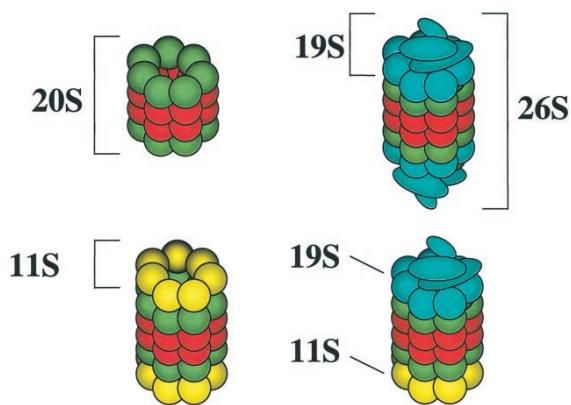
Slika 1: Ubikvitin-proteasomska pot (prirejeno po (8))

## 1.2. Struktura (imuno)proteasoma

Proteasom je sestavljen iz jedrnega 20S dela (CP), ki lahko ima na enem ali obeh koncih vezane regulatorne 19S dele. V evkariontih najdemo različne oblike proteasoma. Proteolitična aktivnost proteasoma je vezana na jedrni del, makromolekulo, ki lahko že sama po sebi razgradi nekatere kratkotrajne regulatorne proteine in tvori tudi aktivno proteolitično jedro treh drugih kompleksov (slika 2). V kombinaciji z 11S oziroma PA28 (20S: imunoproteasom) ali 19S oziroma PA700 (20S: konstitutivni proteasom) regulatornim delom na enem ali obeh koncih, je proteolitična vloga proteasoma

spremenjena. Dvojno poimenovanje regulatornih delov 11S (PA28) in 19S (PA700) izhaja iz prvotnega poimenovanja le-teh. 11S regulatorni del je definiran kot aktivator peptidazne aktivnosti 20S proteasoma (zato kratica PA), ki je sestavljen z enako količino dveh različnih, vendar povezanih 28kDa podenot (PA28). Podobno velja za poimenovanje regulatornega dela 19S (PA700). Števili 11S in 19S pa se isto kot za 20S proteasom nanašajo na enoto za sedimentacijo Svedberg.

Regulatorni kompleksi povečajo proteolitično cepitev substratov v ubikvitin in ATP-odvisnem načinu (19S) oziroma v ubikvitin in ATP-neodvisnem načinu (11S). Ko sta na oba konca jedrnega dela 20S vezana regulatorna 19S dela, tvori 20S jedro proteasoma 26S, ki igra ključno vlogo pri ubikvitin-proteasomski poti (opisana v prejšnjem poglavju), kot tudi v ubikvitin-neodvisni proteolizi (7).



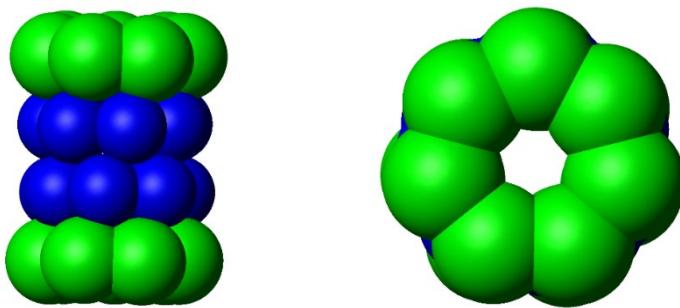
Slika 2: Oblike proteasoma (prirejeno po (7))

Pri vretenčarjih poznamo 3 glavne vrste jedrnega dela (CP):

- *konstitutivni proteasom (cCP)*, ki se nahaja v vseh tipih celic,
- *imunoproteasom (iCP)*, ki se nahaja pretežno v imunske celiceh, torej monocitih in limfocitih, med akutnim vnetjem in odgovorom na stres pa citokini, kot so interferon  $\gamma$  in tumor nekrotizirajoči faktor (TNF)  $\alpha$ , inducirajo tvorbo imunoproteasoma tudi v celicah, ki niso krvotvornega izvora, ter
- *timoproteasom (tCP)*, ki se nahaja izključno v kortikalnih timičnih epiteličnih celicah (4, 9, 10).

Evkariotske celice vsebujejo konstitutivno obliko, ki sestoji iz 20S jedrnega dela z vsaj tremi različnimi proteolitskimi aktivnostmi. Proteasom je sestavljen iz 14 različnih podenot, ki jih lahko glede na podobnost njihovega zaporedja razdelimo na  $\alpha$ - in  $\beta$ -tip

podenote. Podenote so razporejene v štiri sedemčlenske obroče, pri čemer  $\alpha$ -tip podenot tvori dva zunanja obroča, ki zagotavlja strukturno celovitost proteasoma in sodeluje pri prepoznavanju substrata, in  $\beta$  podenot, ki tvorita notranja obroča in sta nosilca proteolitične aktivnosti. Tako sestavljene podenote tvorijo kompleks sodčaste oblike, ki meri 15 nm v dolžino in ima premer 11 nm. Kompleks obdaja tri notranje votline, ki jih omejujejo štiri ozka grla. Osrednjo katalitično votlino tvorita dva sosedna  $\beta$ -obroča, obe zunanjih votlin pa en  $\alpha$ - in en  $\beta$ -obroč (1–3).



*Slika 3: 20S proteasom:  $\alpha$ -podenote, ki tvorijo dva zunanja obroča, so prikazane zeleno in  $\beta$ -podenote, ki tvorijo notranja obroča, so prikazane modro (prirejeno po (1a) in (2a))*

Kristalna struktura jedrnega dela 20S razkriva, da je središče  $\alpha$ -obroča skoraj popolnoma zaprto zaradi N-terminalnih ostankov  $\alpha$ -tipa podenot, kar proteinom preprečuje dostop v osrednjo katalitično votlino dveh sosednjih  $\beta$ -obročev, kjer se nahajajo proteolitično aktivna mesta proteasoma (11).

Izmed sedmih  $\beta$ -podenot evkariontskega proteasoma, ki tvorijo notranji  $\beta$ -obroč, zgolj tri ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2 in  $\beta$ 5) nosijo proteolitično aktivnost. Ker je vsaka od njih v dveh kopijah, imamo v osrednji votlini 6 aktivnih mest. Govorimo lahko o kimotripsinu- (ChT-L), tripsinu- (T-L) in kaspazi-podobnih (C-L) aktivnostih (1, 3). Kimotripsinu-podobno aktivnost posedujejo  $\beta$ 5 podenote, ki cepijo peptidne vezi za hidrofobnimi ostanki, tripsinu-podobno aktivnost  $\beta$ 2 podenote, ki cepijo peptidne vezi v bližini bazičnih ostankov, in kaspazi-podobno aktivnost  $\beta$ 1 podenote, ki cepijo peptidne vezi kislih ostankov. Kot član družine N-terminalnih nukleofilnih hidrolaz (Ntn hidrolaz), ima proteasom edinstven katalitični mehanizem, saj uporablja N-terminalni treoninski (Thr1) ostanek katalitičnih  $\beta$ -podenot kot proton akceptor ( $-\text{NH}_2$ ) in nukleofil ( $-\text{OH}$ ), da izvede hidrolizo peptidnih vezi, kar ga loči od drugih celičnih proteaz (11, 12, 13).

Regulatorni del proteasoma opravlja pomembne naloge pri delovanju samega proteasoma. Razdelimo ga lahko na dva dela, pokrov (ang. lid) in osnovo (ang. base).

Osnova vsebuje 6 različnih AAA+ ATPaznih podenot (Rpt1–Rpt6) in 3 ne ATPazne podenote (Rpn1, Rpn2 in Rpn13), medtem ko pokrov sestavlja 9 ne ATPaznih podenot (Rpn3, 5–9, 11, 12 in 15). Glavna naloga pokrova regulatornega dela proteasoma je deubikvitinacija proteinov, osnova pa ima kar tri naloge: spodbuja razvitje proteinov, odpre kanal v zaprtem  $\alpha$ -obroču in prenese proteine v osrednjo katalitično votlino jedrnega dela, kjer se proteini nato razgradijo (11).

### 1.2.1. Imunoproteasom

Imunoproteasom se od konstitutivnega proteasoma razlikuje v tem, da so pri imunoproteasomu proteolitične podenote  $\beta$ 5,  $\beta$ 2 in  $\beta$ 1 nadomeščene z  $\beta$ 5i (LMP-7),  $\beta$ 2i (LMP-10, MECL1) in  $\beta$ 1i (LMP-2) podenotami, ki tako tvorijo jedro imunoproteasoma 20Si. Ta oblika proteasoma, ki vsebuje tudi različne regulatorne podenote znane kot 11S ali PA28, je izražena v krvotvornih celicah (vranica, timus, kostni možeg, bezgavke), manjše koncentracije 20Si pa najdemo tudi v možganih, pljučih, črevesnem epiteliju, jetrih in očesnih lečah. V jetrih in očesnih lečah je izražanje 20Si povezano s specifičnimi bolezenskimi stanji, ki vodijo do proizvodnje vnetnih citokinov, ti pa inducirajo tvorbo 20Si. V primerjavi s konstitutivnim proteasomom ima imunoproteasom večjo afiniteto za cepitev peptidov s hidrofobnimi in bazičnimi ostanki, kar kaže na povečano kimotripsinu-(ChT-L) in tripsinu-podobno (T-L) aktivnost ter zmanjšano kaspazi-podobno (C-L) aktivnost. Imunoproteasom tako ustvarja hidrofobne ali bazične peptidne fragmente s C-terminalnimi ostanki, ki so bolj primerni za predstavitev na glavnem histokompatibilnostnem kompleksu (MHC I). 20Si sodeluje pri mnogih konstitutivnih proteolitskih procesih, hkrati pa lahko tudi 20S sodeluje v nekaterih primerih generiranja imunogenih epitopov (3, 4, 14).

Vloga, ki jo ima imunoproteasom zunaj imunskega sistema, še ni povsem pojasnjena. Glede na njegovo visoko stopnjo izraženosti, je imunoproteasom povezan z več bolezenskimi stanji. Povečano izražanje 20Si je bilo ugotovljeno pri Huntingtonovi in Alzheimerjevi bolezni ter degeneraciji rumene pege kot tudi pri boleznih povezanih z abnormalnim imunskim odzivom, kot sta vnetna črevesna bolezen in revmatoidni artritis. Povečano izražanje 20Si je lahko posledica vnetnih citokinov, kot sta tumor nekrotizirajoči faktor (TNF)  $\alpha$  in interferon- $\gamma$ , ki inducirata izražanje in prednostno vključitev  $\beta$ 1i,  $\beta$ 2i in  $\beta$ 5i v proteasom. Preferenčno izražanje 20Si je bilo opazno tudi pri multiplem mielomu in

nekaterih drugih rakavih obolenjih, kar kaže, da je lahko specifičen zaviralec immunoproteasoma obetavna terapevtska strategija (14).

### 1.3. Zaviralci proteasoma

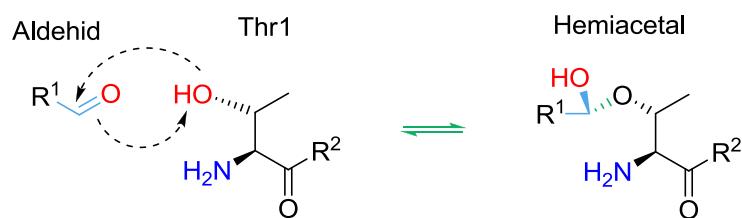
Proteasom predstavlja privlačno tarčo za zdravila, ki je bila obsežno raziskana v zadnjem desetletju. Za večino danes znanih zaviralcev, naravnih in sintetičnih, se je izkazalo, da imajo protitumorsko in protivnetno delovanje, vendar ciljajo tako na konstitutivni proteasom kot tudi imunoproteasom. Tako lahko ti zaviralci vplivajo na skoraj vsako celico. V nasprotju s temi pa selektivni zaviralci imunoproteasoma vplivajo le na imunske celice, ki v večji meri izražajo imunoproteasom, medtem ko naj ne bi imeli učinkov na celice, ki v glavnini izražajo konstitutivni proteasom. Številne študije s selektivnimi zaviralci humanega imunoproteasoma so dokazale terapevtsko korist takšnega pristopa predvsem pri zdravljenju avtoimunskih bolezni. 20S proteasom je izredno pomemben za znotrajcelično homeostazo proteinov. Zaviranje proteasoma tako vodi v kopičenje nepravilno zvitih proteinov kot tudi reaktivnih kisikovih spojin. Zaviralci proteasoma preprečijo razgradnjo tumorskih supresorjev, kot je zaviralec ciklin kinaze p27kip1, in zmanjšajo število provnetnih poti (NF-κB) in njihovih antiapoptotičnih ciljnih genov. Hitro deleče maligne celice so veliko bolj občutljive na zaviranje proteasoma, saj takšne celice potrebujejo proteasom za spopadanje z nakopičenimi nepravilno zvitimi proteini. Študije so dokazale terapevtsko učinkovito zaviranje proteasoma tudi pri zdravljenju številnih rakavih obolenj. Zaviranje proteasoma primarno povzroči celično smrt neoplastičnih celic, zdrave mirujoče celice pa ta stres prenašajo lažje (6, 9).

Povečana koncentracija proteasoma je splošna značilnost tumorskih celic, povečana aktivnost imunoproteasoma pa je povezana z razvojem in napredovanjem nevirodegenerativnih bolezni, avtoimunskih bolezni in nekaterih oblik raka. Potrebne bodo dodatne raziskave, ki bodo razložile povezavo med povišano aktivnostjo imunoproteasoma in napredovanjem bolezni (9).

Glavno skupino zaviralcev proteasoma predstavljajo peptidni zaviralci, ki posnemajo vezavo naravnih substratov v substrat vezavnem kanalu aktivnega mesta proteasoma. Specifičnost in ustrezna zaviralna moč teh spojin je vezana na njihovo reaktivno funkcionalno skupino, ki se bodisi irreverzibilno ali reverzibilno veže na Thr1 ostanek katalitično aktivnih  $\beta$  podenot preko tvorbe kovalentne vezi. Nekatere od teh zelo

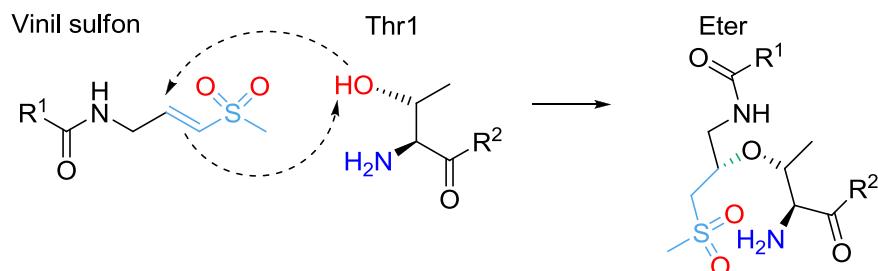
reaktivnih funkcionalnih skupin imajo povečano zaviralo moč in citotoksičnost, vendar zmanjšano selektivnost. Glede na njihov elektrofilni center, lahko zaviralce proteasoma razdelimo v več razredov (9):

- *aldehydi* – Njihov elektrofilni karbonilni C atom reagira z N-terminalnim Thr $1O^\gamma$  ostankom proteolitično aktivnih  $\beta$  podenot in s tem tvori reverzibilni tetraedrični hemiacetal. Aldehydi ne zavirajo samo proteasoma, reagirajo lahko tudi s serinskimi in cisteinskimi proteazami. Ker se zlahka oksidirajo in s tem inaktivirajo, imajo zgolj omejen terapevtski potencial. Primer učinkovine: IPSI-001.



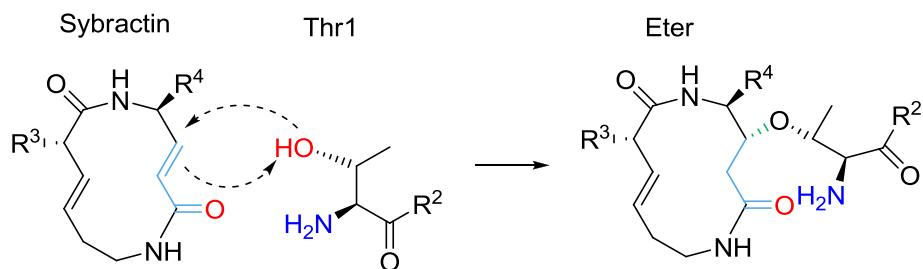
Slika 4: Aldehydi in mehanizem reakcije (prirejeno po (9))

- *vinil sulfoni* – Peptidi z vinil sulfonsko funkcionalno skupino reagirajo s proteasomskim Thr $1O^\gamma$  ostankom po mehanizmu 1,4-Michaelove adicije. S tem tvorijo ireverzibilno etsko vez. Zaradi njihovega nespecifičnega reakcijskega mehanizma ciljajo tudi tiolne skupine cisteinskih proteaz.



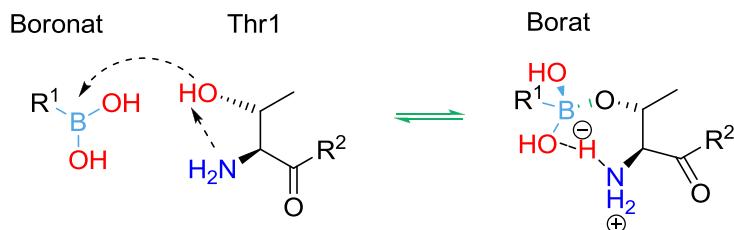
Slika 5: Vinil sulfoni in mehanizem reakcije (prirejeno po(9))

- *vinil amidi* – Tako kot vinil sulfoni, tudi spojine z vinil amidno funkcionalno skupino reagirajo po mehanizmu 1,4-Michaelove adicije in s Thr $1O^\gamma$  tvorijo makrolaktamski obroč.



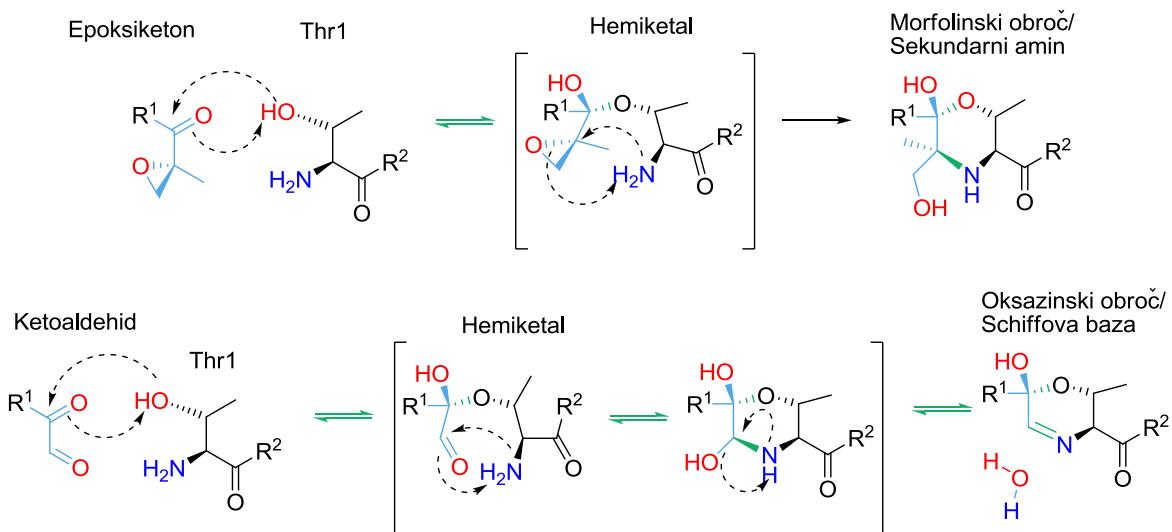
Slika 6: Vinil amidi in mehanizem reakcije (prirejeno po (9))

- *boronati* – Farmakofor boronske kisline je tipičen za najbolj pomemben razred zaviralcev proteasoma. Boronati tvorijo reverzibilno tetraedrično prehodno stanje z nukleofilnim  $\text{Thr1O}^\gamma$  ostankom, ki je stabilizirano z vodikovimi vezmi med hidroksilnimi skupinami boronatov in oksianionsko luknjo (amidna NH skupina Gly47) kot tudi Thr1N. Primeri učinkovin: bortezomib, delanzomib, ixazomib.



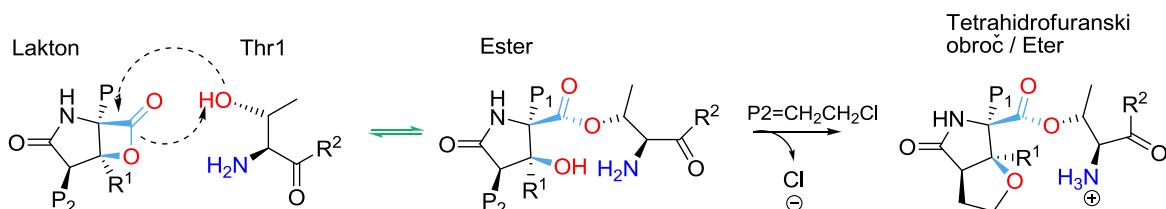
Slika 7: Boronati in mehanizem reakcije (prirejeno po (9))

- $\alpha',\beta'$ -epoksiketoni in  $\alpha$ -ketoaldehidi – Tako  $\alpha',\beta'$ -epoksiketoni kot tudi  $\alpha$ -ketoaldehidi reagirajo po dvostopenjskem mehanizmu s  $\text{Thr1O}^\gamma$  in Thr1N. V prvi stopnji se tvori hemiketal med  $\text{Thr1O}^\gamma$  in ketonsko skupino. V drugi stopnji pa Thr1N reagira z epoksidno skupino pri  $\alpha',\beta'$ -epoksiketonih oziroma aldehidno skupino pri  $\alpha$ -ketoaldehidih.  $\alpha',\beta'$ -epoksiketoni tako tvorijo ireverzibilni morfolinski obroč preko tvorbe sekundarnega amina,  $\alpha$ -ketoaldehidi pa reverzibilni oksazinski obroč (Schiffova baza). Zaradi bivalentnega načina vezave, ki vključuje tako  $\text{Thr1O}^\gamma$  kot Thr1N proteasomski aktivni mesti, veljajo  $\alpha',\beta'$ -epoksiketoni in  $\alpha$ -ketoaldehidi za najbolj specifične funkcionalne skupine danes znanih zaviralcev proteasoma. Primeri učinkovin: carfilzomib, oprozomib, UK-101, ONX-0914, PR-924.



Slika 8:  $\alpha,\beta$ -epoksiketoni in  $\alpha$ -ketoaldehidi ter mehanizem reakcije (prirejeno po (9))

- $\beta$ -laktoni –  $\beta$  laktoni predstavljajo obetajoče farmakofore v razvoju zdravil. Thr1O $^{\gamma}$  napade karbonilni C atom  $\beta$ -laktona, kar povzroči odprtje  $\beta$ -laktonskega obroča in tvorbo hidroksilne skupine ter acil-encimskega estra. Čeprav se nukleofilna molekula vode premakne iz svojega normalnega položaja v aktivnem mestu te reakcije, se lahko katalitsko aktivna Thr1O $^{\gamma}$  obnovi s počasno hidrolizo acil-encimskega kompleksa. V primeru marizomiba, najbolj učinkovitega  $\beta$ -laktona, drugi del reakcije poteče tako, da P2 kloroetilni del marizomiba reagira z na novo nastalo hidroksilno skupino, pri čemer se sprosti klor in ireverzibilno tvori tetrahidrofuranski obroč.

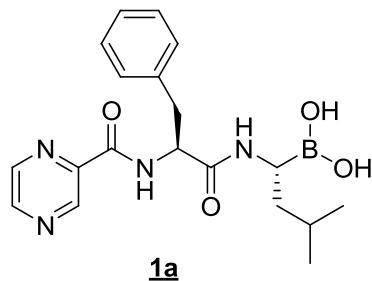


Slika 9:  $\beta$ -laktoni in mehanizem reakcije (prirejeno po (9))

### **1.3.1. Bortezomib (PS-341)**

Bortezomib (PS-341, **1a**) je dipeptid boronske kisline, ki ga je leta 2003 Ameriška agencija za hrano in zdravila FDA odobrila kot prvega selektivnega, reverzibilnega zaviralca proteasoma v terapiji bolnikov z multiplim mielomom oziroma pri pacientih, katerim se je bolezen ponovila ali je neodzivna na zdravljenje s konvencionalnimi terapijami, in pri pacientih z ne-Hodgkinovim limfomom. Bortezomib se kovalentno, reverzibilno veže na Thr1 ostanek proteasoma in zavira katalitično aktivnost tako

konstitutivnega proteasoma kot imunoproteasoma. Primarno deluje predvsem na kimotripsinu- ( $\beta 5$ ,  $\beta 5i$ ) in kaspazi-podobno ( $\beta 1$ ,  $\beta 1i$ ) aktivnost in minimalno na tripsinu-podobno ( $\beta 2$ ,  $\beta 2i$ ) aktivnost proteasoma. Aplicira se intravensko v 3 do 5 sekundah in ima biološki razpolovni čas približno 24 ur. Terapija z bortezomibom ima več slabosti, vključno z načinom aplikacije in omembe vrednimi stranskimi učinki, kot so trombocitopenija in nevtropenija, prebavne motnje in utrujenost. Veliko število pacientov, ki so se zdravili z bortezomibom, je utrpelo tudi hude, vendar reverzibilne nevrodegenerativne učinke, kot so nevrotoksičnost, tremor in zmanjšana hitrost živčne prevodnosti. Dodatna skrb je postal tudi velik del na novo diagnosticiranih pacientov, ki se niso odzivali na zdravljenje z bortezomibom ali so imeli veliko verjetnost ponovitve bolezni po zdravljenju z bortezomibom. Tendenca bortezomiba za inhibicijo drugih encimov: serinskih proteaz izraženih v nevronih, in posledične toksičnosti, pogosto zahteva zmanjšanje odmerka ali prekinitve terapije, kar pa je vodilo v razvoj druge generacije zaviralcev proteasoma (4, 9, 12, 15).



Slika 10: Bortezomib

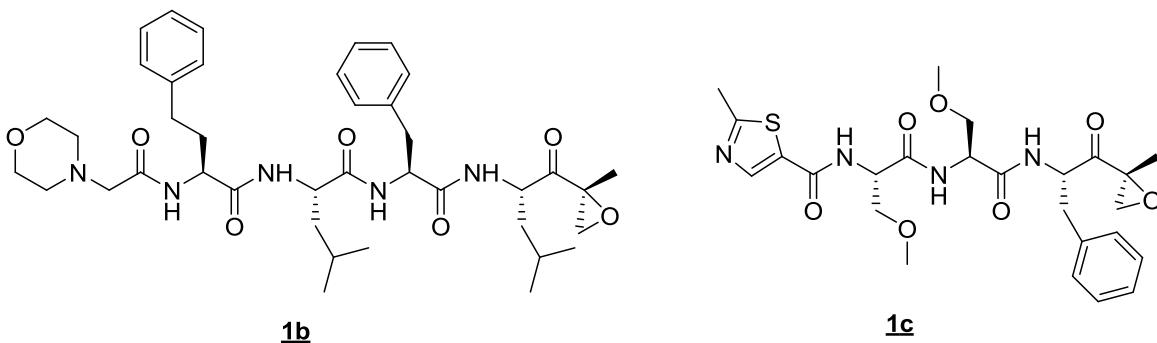
### 1.3.2. Druga generacija zaviralcev proteasoma

Številni zavirci proteasomov so trenutno v kliničnem preskušanju in kažejo spodbudno učinkovitost proti hematopoetskim oblikam raka kot monoterapija ali v kombinaciji z drugimi zdravili. Kljub raznolikosti teh zaviralcev druge generacije, je potrebno njihove specifične tarče in mehanizme, preko katerih delujejo protirakovo, še dodatno raziskati. Nadaljnje raziskave so potrebne zlasti pri tistih, ki kažejo selektivno, zaviralno delovanje na imunoproteasomu (9).

#### 1.3.2.1. Carfilzomib (PR-171) in oprozomib (ONX-0912)

Carfilzomib (PR-171, **1b**) je kot drugi zaviralec proteasoma FDA odobrila leta 2012. Gre za tetrapeptidni derivat naravnega produkta epoksomicina, ki sodi v veliko  $\alpha`,\beta`$ -epoksiketonko družino peptidov. Carfilzomib in ostali epoksiketoni so selektivni za

Ntn hidrolaze. Preko tvorbe morfolinskega obroča med C-terminalnim epoksiketonom in katalitičnim Thr1 ostankom proteasoma ireverzibilno inaktivira kimutripsinu-podobno aktivnost ( $\beta 5$  in  $\beta 5i$ ) tako konstitutivnega proteasoma kot imunoproteasoma z veliko večjo selektivnostjo kot bortezomib, in zgolj minimalno vpliva na ostale katalitične podenote proteasoma. Trenutno se testira v kliničnih preskušanjih za zdravljenje multiplega mieloma (Faza III) in solidnih tumorjev (Faza I). Podobno kot pri bortezomibu, se lahko tudi pri carfilzomibu pojavita nevtropenia in trombocitopenija, ne pa tudi periferna nevrotoksičnost. Znani pomanjkljivosti carfilzomiba sta njegova slaba biološka uporabnost po peroralni aplikaciji, kar zahteva intravensko aplikacijo, in precej kratka razpolovna doba (manj kot 30 minut). Ravno te pomanjkljivosti carfilzomiba so vodile do razvoja prvega zaviralca proteasoma, ki se je lahko apliciral peroralno. Gre za tripeptidni epoksiketon oprozomib (ONX-0912, **1c**), ki tako kot carfilzomib, inducira apoptozo v mielomske celice. Trenutno je v kliničnih preskušanjih kot monoterapija za zdravljenje nekaterih solidnih tumorjev in hematoloških malignosti (4, 9, 12).

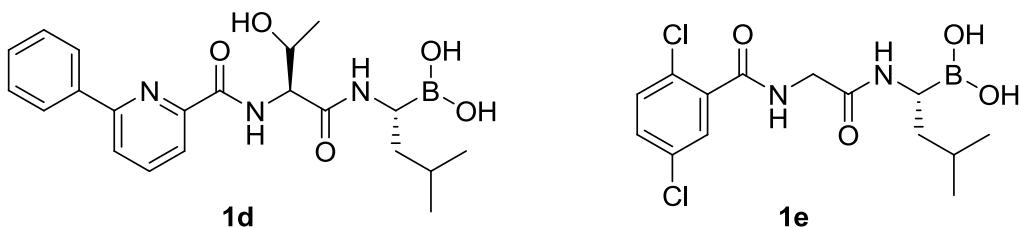


Slika 11: Carfilzomib in oprozomib

### 1.3.2.2. Delanzomib (CEP-18770) in ixazomib (MLN9708)

Delanzomib (CEP-18770, **1d**) se ireverzibilno veže na proteasom preko boronske kisline in močno zavira tako kimotripsinu-, kaspazi- kot tudi tripsinu-podobno aktivnost proteasoma. Ixazomib (MLN9708, **1e**) je esterificirano predzdravilo boronske kisline MLN2238, katerega tarča je v glavnem  $\beta 5$  podenota, pri višjih koncentracijah pa zavira tudi tripsinu- in kaspazi-podobno aktivnost konstitutivnega proteasoma. Oba izkazujeta v primerjavi s spojino **1a** izboljšano farmakokinetiko in farmakodinamiko kot tudi večjo protitumorsko aktivnost, in sta trenutno v kliničnih preskušanjih za zdravljenje hematoloških in solidnih tumorjev. Apliciramo ju lahko peroralno, kar je velika prednost pred spojino **1a** kot tudi **1b**. Še vedno pa ni povsem pojasnjeno, če druga generacija

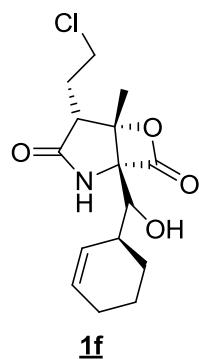
boronatov povzroča manj škodljivih učinkov in če je sposobna delovati v celicah, ki izkazujejo odpornost na spojino **1a** (4, 9).



Slika 12: Delanzomib in MLN2238

### 1.3.2.3. Marizomib (NPI-0052, salinsporamid A)

Marizomib (NPI-0052, salinsporamid A, **1f**) je spojina naravnega izvora, sekundarni metabolit morske aktinomicete *Salinisporea tropica*, in velja za najmanjši do danes znan zaviralec proteasoma. Je nepeptidni zaviralec z  $\beta$ -laktonsko- $\gamma$ -laktamsko biciklično obročno strukturo. Njegova edinstvena kemijska struktura vodi do bolj enakomernega zaviranja proteasoma (pretežno  $\beta$ 2 in  $\beta$ 5 podenot) v primerjavi z drugimi  $\beta$ -laktoni, in zato bolj verjetno do apoptoze. Marizomib veliko obeta v celičnih linijah odpornih na bortezomib in v kliničnih preskušanjih Faze I za zdravljenje multiplega mieloma, levkemije in solidnih tumorjev. Čeprav se ga lahko aplicira tako peroralno kot intravensko, precej kratka razpolovna doba manj kot 5 minut in sposobnost, da prehaja preko krvno-možganske pregrade, omejujeta njegovo terapevtsko uporabo (4, 9).



Slika 13: Marizomib

### 1.3.3. Selektivni zaviralci imunoproteasoma

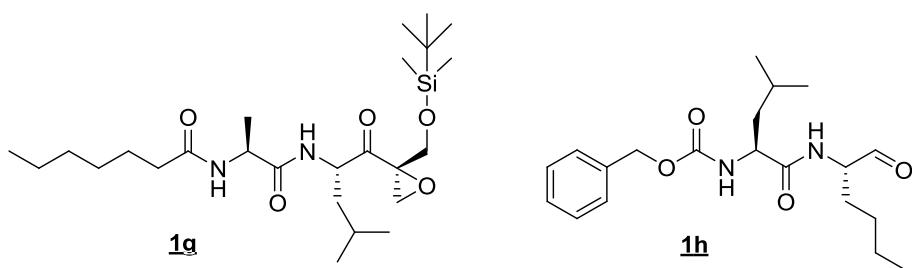
V zadnjih letih se veliko truda vlaga na področju razvoja selektivnih zaviralcev imunoproteasoma (IPSI) za uporabo v imunologiji in s tem v boju proti boleznim, kot so sistemski eritematozni lupus, vnetne črevesne bolezni, revmatoidni artritis in rak.

Selektivni zaviralcii imunoproteasoma so zasnovani tako, da bodisi specifično ciljajo celice, ki izražajo visoke ravni imunoproteasoma, kot v primeru rakavih bolezni, ali zavirajo signalne poti, kot je provnetna NF- $\kappa$ B pot pri avtoimunskih boleznih. Ker naj selektivni zaviralcii imunoproteasoma ne bi vplivali na delovanje konstitutivnega proteasoma, veljajo za manj toksične in imajo zmanjšano raven netarčnih stranskih učinkov v primerjavi z drugimi zaviralcii proteasoma širokega spektra, kot sta bortezomib in carfilzomib. Prisotnost 20Si proteasoma je omejena predvsem na organe in tkiva povezane z zorenjem limfocitov: vranico, timus, kostni mozeg in bezgavke. Glede na relativno omejeno izražanje 20Si v celicah limfatičnega izvora, selektivni zaviralcii imunoproteasoma ciljajo predvsem na hematološke malignosti, ki izvirajo iz limfatičnih celic, z minimalnim vplivom na druga tkiva. Večina zaviralcii imunoproteasoma selektivno cilja na posamezne podenote imunoproteasoma. Sedanje študije kažejo, da  $\beta$ 5i selektivne spojine (**1i**, **1j**) zagotavljajo večji terapevtski potencial pri avtoimunskih in vnetnih boleznih kot zaviranje drugih dveh aktivnih podenot imunoproteasoma (3, 4, 9, 10, 16).

### 1.3.3.1. $\beta$ 1i selektivni zaviralcii (UK-101 in IPSI-001)

UK-101 (**1g**) je peptidni epoksiketon in prvi znani  $\beta$ 1i selektivni zaviralec, ki kovalentno modificira  $\beta$ 1i podenoto. UK-101 inducira apoptočno smrt v celičnih linijah raka prostate, ki prekomerno izražajo  $\beta$ 1i podenote imunoproteasoma.

IPSI-001 (**1h**) je peptidni aldehyd in drugi znani  $\beta$ 1i selektivni zaviralec. Inducira apoptozo v hematoloških malignostih, ki imajo povišano raven imunoproteasomov, kot tudi v celicah, ki so odporne na spojino **1a**, in je bistveno manj citotoksičen v nemalignih celicah kot spojina **1a** (3, 4, 9, 14).



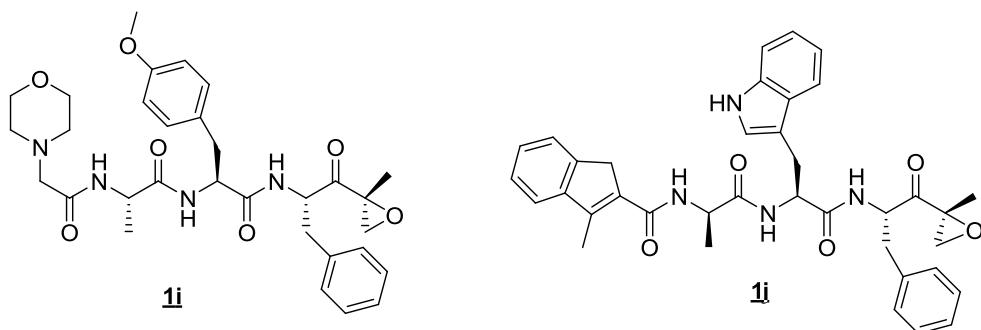
Slika 14: UK-101 in IPSI-001

### 1.3.3.2. $\beta$ 5i selektivni zaviralcii (ONX-0914 in PR-924)

ONX-0914 (**1i**) je tripeptidni  $\alpha,\beta$ -epoksiketon, prvi znani  $\beta$ 5i selektivni, irreverzibilni zaviralec. Njegova uporaba kaže na obetaven pristop selektivnega zaviranja

imunoproteasomov, zlasti pri vnetnih (revmatoidni artritis, eksperimentalni kolitis in sistemski eritematozni lupus) in avtoimunskeh boleznih. Spojina **1i** je terapevtsko učinkovita že pri koncentracijah daleč pod največjim dovoljenim odmerkom. Zmanjšuje izražanje receptorjev glavnega histokompatibilnostnega kompleksa (MHC-I) na površini tudi do 50%, kot tudi nastanek  $\beta$ 5i odvisnih MHC-I peptidov, kar modulira citotoksičen odziv T celic. Spojina **1i** močno zavira nastajanje protivnetnih citokinov, kot sta interlevkin 23 (IL-23) in tumor nekrotizirajoči faktor (TNF)  $\alpha$  v aktiviranih monocitih in blokira napredovanje bolezni ter zmanjša resnost simptomov bolezni.

PR-924 (**1i**) je tripeptidni ketoepoksid,  $\beta$ 5i selektivni, irreverzibilni zaviralec s strukturo podobno spojini **1i**. Povzroči selektivno celično smrt več vrst celic multiplega mieloma in je trenutno v Fazi III kliničnih preskušanj za zdravljenje multiplega mieloma (4, 9).

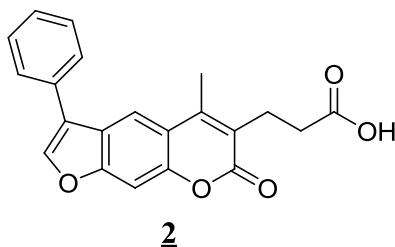


Slika 15: ONX-0914 in PR-924

S strukturnega vidika je večina trenutno znanih zaviralcev imunoproteasoma peptidnega izvora in so tako nagnjeni k slabi metabolični stabilnosti in nizki biološki uporabnosti. Poleg izboljšave do sedaj znanih peptidnih zaviralcev imunoproteasoma, je nujno, da se razvijejo zaviraleci z izboljšanimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi in s posledično boljšimi farmakokinetičnimi in farmakodinamičnimi profili (10).

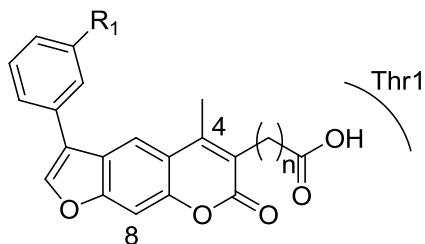
## 2. NAMEN DELA

V okviru magistrske naloge se bomo posvetili načrtovanju in sintezi potencialnih kovalentnih zaviralcev humanega imunoproteasoma. Izhajali bomo iz strukture znanega selektivnega reverzibilnega zaviralca  $\beta$ 5i podenote tega encima s psoralenskim skeletom, ki so ga na Fakulteti za farmacijo odkrili s pomočjo virtualnega rešetanja ZINC banke spojin (slika 16). Spojina zadetek (2) je pokazala selektivno zaviranje  $\beta$ 5i v primerjavi z  $\beta$ 2i in  $\beta$ 1i podenotama humanega imunoproteasoma, kakor tudi v primerjavi z vsemi tremi podenotami humanega konstitutivnega proteasoma.



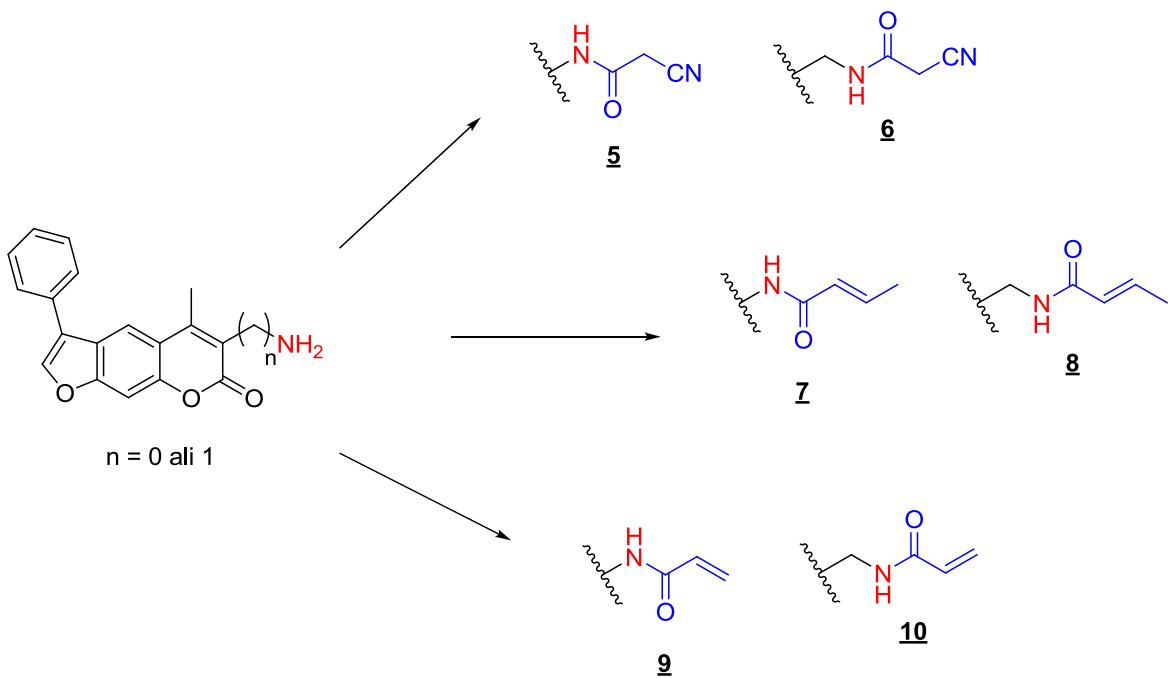
*Slika 16: Spojina zadetek*

Dolgotrajno zaviranje s kovalentnimi zaviralci je mogoče doseči le, kadar se spojina najprej nekovalentno veže na svojo tarčo, čemur sledi pozicioniranje elektrofilne bojne glave blizu želenega nukleofilnega aminokislinskega ostanka proteina. Ker spojina zadetek že sama po sebi izkazuje zaviralno aktivnost preko nekovalentnih interakcij z aktivnim mestom  $\beta$ 5i podenote humanega imunoproteasoma, bomo z modifikacijo spojine zadetek poskušali izboljšati zaviralno učinkovitost njenih analogov. Pri tem bomo skušali ujeti kovalentno interakcijo s katalitičnim treoninom (Thr1), ki se nahaja v aktivnem mestu imunoproteasoma, ter tako povečati zaviralno aktivnost spojin v nizko nM območje. Na podlagi dosedanjega dela je bilo ugotovljeno, da je fenilni substituent ( $R^1 = H$ ) na psoralenskem skeletu najbolj ugoden, metilna skupina na mestu 4 ni nujna za zaviranje, dodatna metilna skupina na mestu 8 psoralenskega skeleta pa povzroči zmanjšanje zaviranja (slika 17). Poleg tega pa je bilo na podlagi virtualnega rešetanja razvidno, da je veriga s kislino usmerjena proti N-terminalnemu treoninu 1, ki je tudi katalitični treonin te proteaze. Zaradi tega je smiselno ravno na tem mestu psoralenskega skeleta uvajati različne elektrofilne fragmente.



Slika 17: Optimiziranje spojine zadetka

Čeprav akrilamidna in ciano skupina nista ravno tipični bojni glavi za treoninske proteaze, pač pa za cisteinske, bomo kljub temu preverili ali to velja tudi za imunoproteasom. Da bi te bojne glave najbolj enostavno pripeli, bomo razvili sintezno pot, kjer bomo na amino skupini, vezani direktno na psoralenski skelet oziroma preko ene metilenske skupine, tvorili akrilamide in cianamide (slika 18). Vse končne spojine bomo biokemijsko ovrednotili z določitvijo zaviralne aktivnosti na izolirani  $\beta$ 5i podenoti imunoproteasoma. Morebitno aktivnim spojinam bomo določili IC<sub>50</sub> vrednosti ter njihovo selektivnost napram drugim aktivnim  $\beta$  podenotam.



Slika 18: Uvedba elektrofilnih bojnih glav na amino skupino

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1. Materiali

Pri eksperimentalnem delu v laboratoriju smo uporabljali reagente in topila proizvajalcev Acros organics, Fluka in Merck. Brezvodni tetrahidrofuran (THF) smo pripravili z destilacijo ob prisotnosti Na/benzofenona, kot sušilnega sredstva, tik pred uporabo topila.

#### 3.2. Metode

##### 3.2.1. Kromatografske metode

Tankoplastna kromatografija (TLC): TLC analizo smo uporabljali za sledenje poteka kemijskih reakcij in določevanje čistosti posameznih frakcij po čiščenju s »flash« kromatografijo. Uporabljali smo plošče TLC Silica gel 60 F254 proizvajalca Merck (0,20 mm silikagel na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem). Uporabljene mobilne faze so navedene pri opisih postopkov sinteze. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabili UV svetlobo pri dveh valovnih dolžinah (254 nm in 366 nm). Pod UV-svetlobo vidne in nevidne lise smo detektirali z raznimi vnaprej pripravljenimi orositvenimi reagenti (ninhidrin, bromkrezol zeleno in 2,4-dinitrofenilhidrazin).

Kolonska kromatografija: Za čiščenje končnih spojin smo uporabili »flash« kolonsko kromatografijo. Kot stacionarno fazo smo uporabljali silikagel 60 (velikost delcev 0,04–0,063 mm, proizvajalec Merck). Uporabljene mobilne faze so navedene pri opisih postopkov sinteze in čiščenja.

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC): Analitsko reverznofazno HPLC smo izvedli na sistemu Agilent 1100 LC z PDA detektorjem (220, 254 in 280 nm). Uporabili smo kolono Agilent Eclipse Plus C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm), termostatirano na 25 °C. Hitrost pretoka mobilne faze je bila 1,0 mL/min, volumen injiciranega vzorca pa 10 µL. Uporabljena mobilna faza je bila sestavljena iz mešanice 0,1% vodne raztopine trifluorocetne kisline in acetonitrila. Gradient je bil 40% do 90% acetonitrila v 20 minutah.

### 3.2.2. Ekstrakcije in spiranja

Za ekstrakcije in spiranja reakcijskih zmesi smo uporabljali sledeče raztopine oziroma organska topila: nasičeni vodni raztopini NaCl in NaHCO<sub>3</sub>, 1M vodno raztopino HCl, 4M vodno raztopino NaOH, DKM, EtOAc in Et<sub>2</sub>O.

### 3.2.3. Prekristalizacija

Prekristalizacijo smo izvajali z namenom, da še dodatno očistimo dobljeni produkt. Nezadostno čisto spojino smo raztopili v izbranem topilu (DKM, EtOAc in EtOH) ob segrevanju do vrelišča. Dobili smo nasičeno raztopino, ki smo jo nato počasi ohladili na sobno temperaturo. Prekristalizirane spojine smo nadalje analizirali s spektroskopskimi metodami.

### 3.2.4. Spektroskopske metode

Jedrska magnetna resonanca (NMR): NMR spektre smo posneli na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani na Bruker Avance III 400 MHz spektrometru. Vzorci so bili raztopljeni v devteriranih topilih (CDCl<sub>3</sub>, DMSO-d<sub>6</sub>) in TFA-d, kot interni standard je bil uporabljen TMS. Spektre smo obdelali s programom MestRe-C.

Infrardeča spektroskopija (IR): Spektre IR smo posneli na Thermo Nicolet FT-IR spektrometru (Fakulteta za farmacijo, Ljubljana) z uporabo ART tehnike (tehnika oslabljenega popolnega odboja).

Masna spektroskopija: Masne spektre so posneli na masnem spektrometru Q-TOF Premier proizvajalca Micromass, Waters (Manchester, Velika Britanija) z ESI metodo ionizacije v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

### 3.2.5. Določanje temperature tališč

Nekorigirane temperaturne intervale tališč čistih spojin smo določili s Kofflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico Leica.

### 3.2.6. Poimenovanje in risanje spojin

Za poimenovanje spojin in risanje reakcijskih shem ter kemijskih struktur smo uporabili računalniški program ChemBioDraw Ultra 11.0 proizvajalca Cambridge Soft.

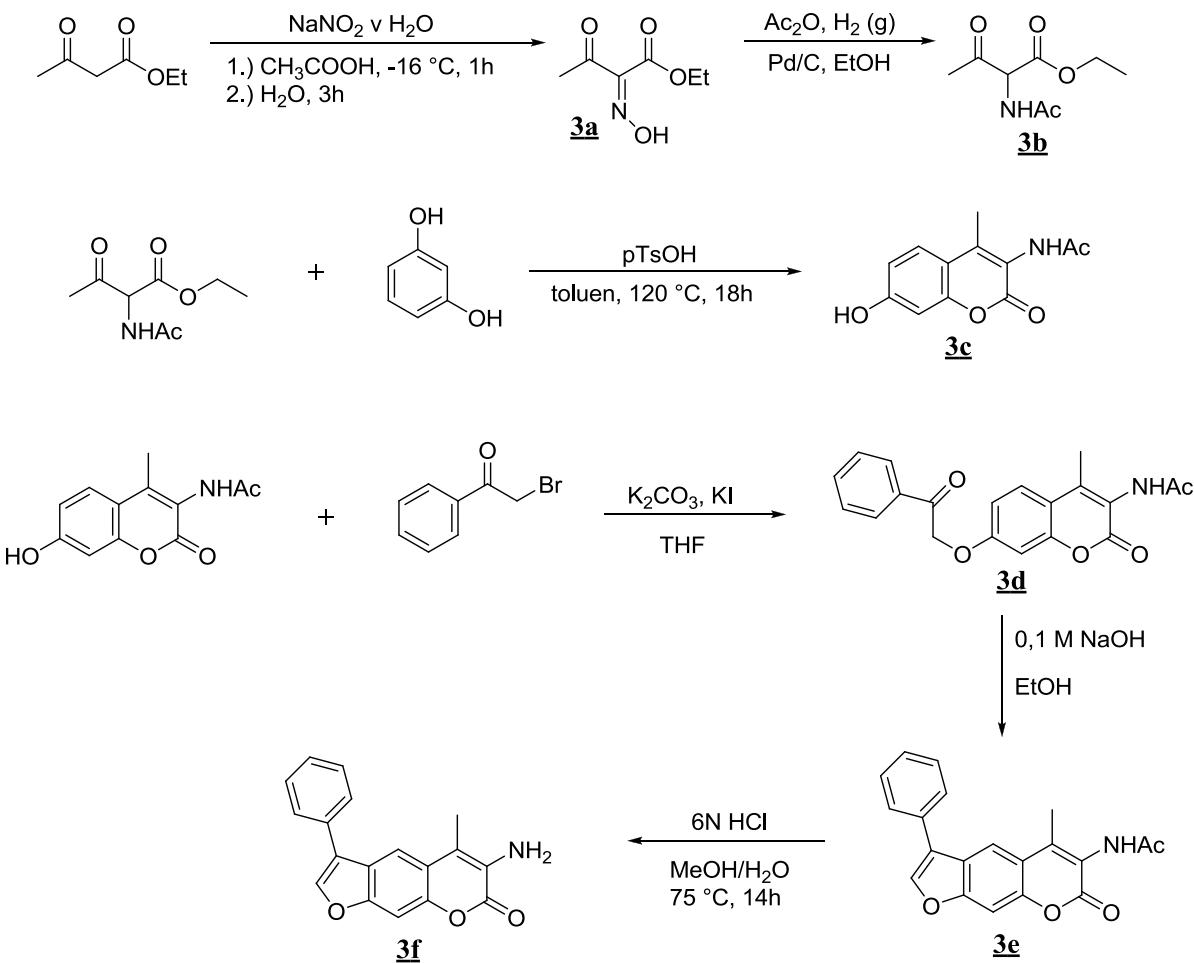
### 3.2.7. Biokemijsko testiranje

Preliminarno vrednotenje spojin je bilo izvedeno pri 10 µM končni koncentraciji spojine. K 50 µL spojine so dodali 25 µL 0,8 nM človeškega iCP (Boston Biochem, Inc., Cambridge/MA, ZDA). Po 30 minutah inkubacije pri temperaturi 37 °C so sprožili reakcijo z dodajanjem 25 µL 100 µM Suc-LLVY-AMC (substrat). Reakcijski pufer je vseboval 0,01% SDS, 50 mM Tris-HCl in 0,5 mM EDTA (pH 7,4). Potek reakcije so spremljali na BioTek Synergy HT mikrotitrskem čitalniku z merjenjem fluorescence pri 460 nm ( $\lambda_{ex} = 360$  nm) 120 min pri temperaturi 37 °C. Začetna linearna območja so bila uporabljena za izračun hitrosti in določitev rezidualne aktivnosti kimotripsinske podenote imunoproteasoma ob prisotnosti in odsotnosti posamezne preiskovane spojine.

Določanje zaviralne aktivnosti sintetiziranih spojin na imunoproteasomu je na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani izvedla asist.dr. Martina Gobec, mag. farm. s Katedre za klinično biokemijo.

## 4. EKSPERIMENTALNO DELO IN REZULTATI ANALIZ

### 4.1. Sinteza 6-amino-5-metil-3-fenil-7H-furo[3,2-g]kromen-7-ona (3f)



#### 4.1.1. Sinteza etil 2-(hidroksiimin)-3-oksobutanoata (3a)

Raztopino etil acetoacetata (20,000 mL, 0,157 mol, 1,00 ekviv.) v  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (12 mL) smo ohladili na zmesi ledu, vode in acetona na  $-16^\circ\text{C}$  ter po kapljicah dodali raztopino  $\text{NaNO}_2$  (11,90 g, 0,172 mol, 1,09 ekviv.) v mrzli vodi (30 mL). Reakcijsko zmes smo mešali 1 uro pri  $-16^\circ\text{C}$ . Nato smo dodali 80 mL hladne vode ( $0^\circ\text{C}$ ) in mešali še 3 ure pri sobni temperaturi. Zmes smo nato prenesli v ljij ločnik ter jo ekstrahirali z  $\text{Et}_2\text{O}$  ( $4 \times 100$  mL). Združene organske faze smo sprali z nasičeno vodno raztopino  $\text{NaHCO}_3$  ( $3 \times 100$  mL), sušili z brezvodnim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , prefiltirali in uparili topilo pri znižanem tlaku.

<b>Etil 2-(hidroksiimin)-3-oksobutanoat (3a)</b>		M = 159,14 g/mol
Izgled: bledo rumeno olje	T <sub>tal</sub> : [lit. 136,0–137,0 °C; (18)]	
TLC: Rf (EtOAc/n-hex = 1/1) = 0,61		
Izkoristek reakcije: 90%		
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ (ppm) = 1,34 (t, J = 7,2 Hz, 3H, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 2,40 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4,37 (q, J = 7,2 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 9,84 (s, 1H, OH)	
<sup>13</sup> C-NMR (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ (ppm) = 13,93; 25,33; 62,53; 151,05; 161,83; 194,11	

#### 4.1.2. Sinteza etil 2-acetamid-3-oksobutanoata (3b)

Raztopino etil 2-(hidroksiimin)-3-oksobutanoata (**3a**, 19,500 g, 0,123 mol, 1,00 ekviv.) v EtOH (100 mL) smo prepihali z argonom, dodali Ac<sub>2</sub>O (35,5 mL), ponovno prepihali z argonom in dodali še Pd/C (1,900 g, paladij na ogljiku, 10% (m/m) glede na izhodno spojino **3a**). Nastalo suspenzijo smo mešali čez noč pod H<sub>2</sub> atmosfero pri sobni temperaturi. Paladij na ogljiku smo odnučali skozi zbito plast peska in celita (Celite® 577 fine) ter filtratu uparili topilo pri znižanem tlaku. Spojino smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/n-hex = 1/1).

<b>Etil 2-acetamid-3-oksobutanoat (3b)</b>		M = 187,19 g/mol
Izgled: brezbarvno olje	T <sub>tal</sub> : [lit. 128,0–140,0 °C; (18)]	
TLC: Rf (EtOAc/n-hex = 1/1) = 0,15		
Izkoristek reakcije: 82%		
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ (ppm) = 1,26 (t, J = 7,2 Hz, 3H, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 2,03 (s, 3H, NHCOCH <sub>3</sub> ), 2,34 (s, 3H, COCH <sub>3</sub> ), 4,42 (dq, J <sub>1</sub> = 7,2 Hz, J <sub>2</sub> = 1,0 Hz, 1H, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 5,22 (d, J = 6,6 Hz, CH), 6,80 (d, J = 5,1 Hz, NH)	
<sup>13</sup> C-NMR (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ (ppm) = 13,87; 22,50; 28,01; 62,49; 63,03; 166,03; 169,82; 198,66	

#### 4.1.3. Sinteza *N*-(7-hidroksi-4-metil-2-okso-2*H*-kromen-3-il)acetamida (**3c**)

Raztopino resorcinola (4,270 g, 38,779 mmol, 1,00 ekviv.) in p-toluensulfonske kisline monohidrata (0,738 g, 3,880 mmol, 0,10 ekviv.) v brezvodnem toluenu (120 mL)

smo prepihali z argonom in ji pri sobni temperaturi s kapalko dodali etil 2-acetamid-3-oksobutanoat (**3b**, 10,900 g, 58,220 mmol, 1,50 ekviv.). Reakcijsko zmes smo mešali 18 ur pri 120 °C. Topilo smo uparili pri znižanem tlaku. Oranžen uparek smo prekristalizirali iz EtOH. Izpadla je bela oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem, sprali z EtOH in posušili v sušilniku pri 50 °C.

<b><i>N-(7-hidroksi-4-metil-2-okso-2H-kromen-3-il)acetamid (3c)</i></b>		M = 233,22 g/mol
<b>Izgled:</b> bela trdna snov	<b>T<sub>tal</sub>:</b> 260,0–263,0 °C	
<b>TLC:</b> Rf (DKM/MeOH = 9/1) = 0,40		
<b>Izkoristek reakcije:</b> 20% (računano na izpadlo oborino, velik del je najbrž ostal še v matičnici, zato je dejanski izkoristek reakcije precej večji)		
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)</b>	$\delta$ (ppm) = 2,04 (s, 3H, NHCOCH <sub>3</sub> ), 2,20 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 6,67 (d, <i>J</i> = 2,2 Hz, 1H, Ar-H), 6,77 (dd, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8,7 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 2,3 Hz, 1H, Ar-H), 7,49 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 1H, Ar-H), 9,32 (br s, 1H, NH), 10,26 (br s, 1H, OH)	
<b><sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)</b>	$\delta$ (ppm) = 14,28; 22,51; 101,98; 111,86; 113,19; 117,58; 126,98; 146,66; 152,82; 158,61; 160,59; 168,76	
<b>ESI-HRMS</b>	Izračunano za C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>4</sub> [M–H] <sup>–</sup> (m/z) = 232,0610, izmerjena vrednost: 232,0616	
<b>IR (ATR)</b>	3320, 3072, 3026, 2964, 2824, 2765, 1713, 1601, 1519, 1474, 1379, 1355, 1337, 1293, 1260, 1248, 1169, 1119, 1070, 846, 800, 771 cm <sup>–1</sup>	

#### 4.1.4. Sinteza ***N-(4-metil-2-okso-7-(2-okso-2-feniletoksi)-2H-kromen-3-il)acetamida (3d)***

*N*-(7-hidroksi-4-metil-2-okso-2H-kromen-3-il)acetamid (**3c**, 1,061 g, 4,550 mmol, 1,00 ekviv.) smo raztopili v 20 mL THF. Raztopino smo prepihali z argonom, ji dodali K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,257 g, 9,090 mmol, 2,00 ekviv.), KI (0,076 g, 0,455 mmol, 0,10 ekviv.) in 2-bromoacetofenon (1,358 g, 6,824 mmol, 1,50 ekviv.). Reakcijsko zmes smo mešali čez noč pod argonovo atmosfero pri 60 °C. THF smo uparili pri znižanem tlaku. Uparku smo dodali H<sub>2</sub>O (50 mL) in EtOAc (50 mL) ter prenesli dvofazni sistem v lij ločnik. Fazi smo ločili ter vodno fazo dodatno ekstrahirali z EtOAc (2 × 50 mL). Združeni organski fazi smo sprali z nasičeno vodno raztopino NaCl (50 mL), sušili z brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in uparili topilo pri znižanem tlaku. Spojino smo očistili s prekristalizacijo iz EtOAc.

<b><i>N-(4-metil-2-okso-7-(2-okso-2-feniletoksi)-2H-kromen-3-il)acetamid (3d)</i></b>		M = 351,35 g/mol
Izgled: bela trdna snov	T <sub>tal</sub> :	165,5–168,0 °C
<b>TLC:</b> R <sub>f</sub> (DKM/MeOH = 9/1) = 0,56		
<b>Izkoristek reakcije:</b> 82%		
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, TFA-d)</b>	$\delta$ (ppm) = 2,21 (s, 0,2H, CH <sub>3</sub> ), 2,47 (s, 2,8H, CH <sub>3</sub> ), 2,53 (s, 2,8H, CH <sub>3</sub> ), 2,63 (s, 0,2H, CH <sub>3</sub> ), 5,64 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 7,08 (d, <i>J</i> = 2,4 Hz, 1H, Ar-H), 7,25 (dd, <i>J</i> <sub>1</sub> = 9,0 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 2,4 Hz, 1H, Ar-H), 7,58 (d, <i>J</i> = 7,8 Hz, 2H, 2 × Ar-H), 7,74 (t, <i>J</i> = 7,4 Hz, 1H, Ar-H), 7,84 (d, <i>J</i> = 7,7 Hz, 1H, Ar-H), 8,09 (d, <i>J</i> = 7,7 Hz, 2H, Ar-H), NH izmenljiv	
<b><sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, TFA-d)</b>	$\delta$ (ppm) = 6,67; 13,81; 63,07; 94,81; 107,25; 108,13; 108,82; 120,55; 121,36; 122,26; 125,75; 129,14; 146,43; 147,79; 155,08; 156,34; 170,18; 191,86	
<b>ESI-HRMS</b>	Izračunano za C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>5</sub> [M+H] <sup>+</sup> (m/z) = 352,1185, izmerjena vrednost: 352,1182	
<b>IR (ATR)</b>	3320, 3257, 3058, 1702, 1691, 1678, 1608, 1515, 1426, 1382, 1360, 1331, 1302, 1257, 1226, 1181, 1163, 1124, 1076, 988, 972, 852, 820, 757 cm <sup>-1</sup>	

#### 4.1.5. Sinteza ***N-(5-metil-7-okso-3-fenil-7H-furo[3,2-g]kromen-6-il)acetamida (3e)***

Suspenziji spojine ***N-(4-metil-2-okso-7-(2-okso-2-feniletoksi)-2H-kromen-3-il)acetamid (3d***, 1,090 g, 3,105 mmol, 1,00 ekviv.) v 50 mL EtOH (96%) smo dodali 0,1 M NaOH (45 mL) in mešali 2 uri pri 85 °C. Reakcijski zmesi smo s koncentrirano HCl naravnali pH vrednost na 1, uparili topilo in ohladili na sobno temperaturo. Uparek smo ekstrahirali s EtOAc ter ločili fazi. Vodno fazo smo dodatno ekstrahirali z EtOAc (30 mL). Združeni organski fazi smo sprali z nasičeno vodno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (50 mL), nasičeno vodno raztopino NaCl (50 mL), sušili z brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in uparili topilo pri znižanem tlaku. Spojino smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = DKM/MeOH = 20/1).

<b><i>N-(5-metil-7-okso-3-fenil-7H-furo[3,2-g]kromen-6-</i></b>	M = 333,34 g/mol
---	------------------

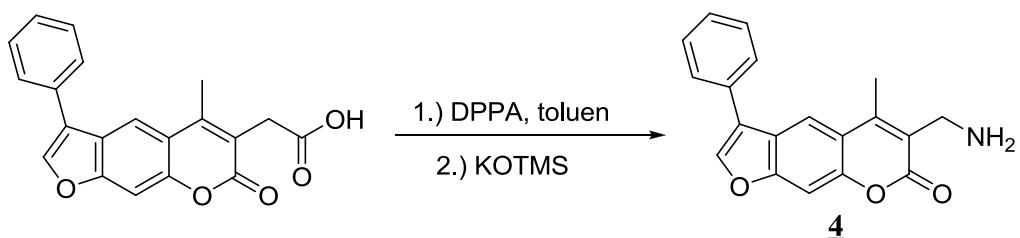
<b>il)acetamid (<u>3e</u>)</b>	
<b>Izgled:</b> beli kristali	<b>T<sub>tal</sub>:</b> 241,0–246,0 °C
<b>TLC:</b> Rf (DKM/MeOH = 20/1) = 0,30	
<b>Izkoristek reakcije:</b> 52%	
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)</b>	δ (ppm) = 2,08 (s, 3H, COCH <sub>3</sub> ), 2,40 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 7,42 (tt, J <sub>1</sub> = 7,6 Hz, J <sub>2</sub> = 1,6 Hz, 1H, Ar-H), 7,52–7,56 (m, 2H, Ar-H), 7,80–7,82 (m, 3H, Ar-H), 7,15 (s, 1H, Ar-H), 8,47 (s, 1H, Ar-H), 9,57 (br s, 1H, NHCO)
<b><sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)</b>	δ (ppm) = 14,86; 22,55; 99,59; 116,55; 116,90; 119,69; 121,18; 122,99; 127,17; 127,80; 129,16; 130,57; 144,38; 146,42; 149,23; 155,97; 158,21; 168,79
<b>ESI-HRMS</b>	Izračunano za C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>4</sub> [M+H] <sup>+</sup> (m/z) = 334,1079, izmerjena vrednost: 334,1082
<b>IR (ATR)</b>	3343, 3113, 1713, 1682, 1625, 1579, 1517, 1458, 1439, 1388, 1347, 1244, 1145, 1069 cm <sup>-1</sup>

#### 4.1.6. Sinteza 6-amino-5-metil-3-fenil-7*H*-furo[3,2-g]kromen-7-ona (**3f**)

N-(5-metil-7-okso-3-fenil-7*H*-furo[3,2-g]kromen-6-il)acetamid (**3e**) smo suspendirali v MeOH (30mL), dodali 6N HCl (30 mL) in segrevali 14 ur pri 75 °C. Reakcijsko zmes smo ohladili na sobno temperaturo ter jo naalkalili z nasičeno vodno raztopino NaHCO<sub>3</sub> do pH vrednosti 10. Metanol smo uparili pri znižanem tlaku, preostalo vodno raztopino pa ekstrahirali z DKM (3 × 50 mL). Združene organske faze smo sprali z nasičeno vodno raztopino NaCl (50 mL), sušili z brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in uparili topilo pri znižanem tlaku. Spojino smo očistili s prekristalizacijo iz EtOH.

<b>6-amino-5-metil-3-fenil-7H-furo[3,2-g]kromen-7-on (3f)</b>		M = 291,30 g/mol
Izgled: beli kristali	T <sub>tal</sub> :	236,0–239,0 °C
TLC: R <sub>f</sub> (EtOAc/n-hex = 1/1) = 0,50		
Izkoristek reakcije: 53%		
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)</b>	$\delta$ (ppm) = 2,30 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4,06 (br s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7,42 (tt, $J_1$ = 7,2 Hz, $J_2$ = 1,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,47 (s, 1H, Ar-H), 7,52 (t, $J$ = 7,6 Hz, 2H, Ar-H), 7,64–7,66 (m, 2H, Ar-H), 7,79 (s, 1H, Ar-H), 7,80 (s, 1H, Ar-H)	
<b><sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)</b>	$\delta$ (ppm) = 12,34; 99,67; 112,96; 118,42; 119,75; 122,02; 123,92; 127,49; 127,51; 127,77; 129,12; 131,45; 142,40; 146,95; 154,26; 159,17	
<b>ESI-HRMS</b>	Izračunano za C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>3</sub> [M+H] <sup>+</sup> (m/z) = 292,0974, izmerjena vrednost: 292,0982	
<b>IR (ATR)</b>	3472, 3365, 3097, 1694, 1619, 1602, 1569, 1468, 1437, 1285, 1270, 1157, 1093, 850, 829, 758 cm <sup>-1</sup>	

## 4.2. Sinteza 6-(aminometil)-5-metil-3-fenil-7H-furo[3,2-g]kromen-7-ona (4)

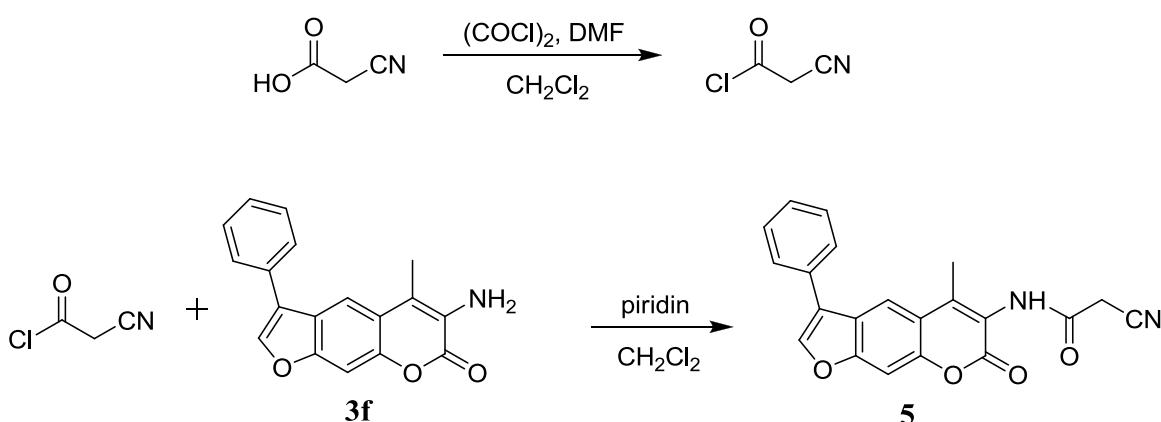


Raztopini 2-(5-metil-7-okso-3-fenil-7H-furo[3,2-g]kromen-6-il)acetne kisline (0,432 g, 1,290 mmol, 1,00 ekviv.) v toluenu (33 mL) smo dodali Et<sub>3</sub>N (0,215 mL, 1,550 mmol, 1,20 ekviv.) in difenilfosforil azid (0,278 mL, 1,290 mmol, 1,00 ekviv.) ter nastalo suspenzijo mešali 3 ure na oljni kopeli pri 120 °C. Reakcijsko zmes smo nato ohladili na 0 °C, ji dodali kalijev trimetilsilanolat (1 M raztopina v THF, 2,60 mL) ter jo pustili mešati 30 minut pri sobni temperaturi. Reakcijo smo prekinili z dodatkom 32 mL 5% (m/V) citronske kisline. Organska topila smo uparili pri znižanem tlaku. K preostanku smo dodali 1M HCl (40 mL) ter nastalo raztopino ekstrahirali z Et<sub>2</sub>O (2 × 40 mL). Organske faze smo zavrgli, vodni fazi pa smo s 4M NaOH naravnali pH vrednost na 12 ter jo ekstrahirali z DKM (3 × 40 mL). Združene organske faze smo sprali z nasičeno vodno raztopino NaCl

(50 mL), posušili z brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in uparili topilo pri znižanem tlaku. Surovi produkt smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = DKM/MeOH = 9/1).

<b>6-(aminometil)-5-metil-3-fenil-7H-furo[3,2-g]kromen-7-on (4)</b>	M = 305,33 g/mol
Izgled: oranžno-rjavi kristali	T <sub>tal</sub> : 123,0–125,0 °C
TLC: Rf (DKM/MeOH = 9/1) = 0,23	
Izkoristek reakcije: 62%	
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ (ppm) = 1,79 (br s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 2,54 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3,86 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 7,39–7,44 (m, 2H, Ar-H), 7,49–7,53 (m, 2H, Ar-H), 7,59–7,61 (m, 2H, Ar-H), 7,79 (s, 1H, Ar-H), 7,96 (s, 1H, Ar-H)
<sup>13</sup> C-NMR (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ (ppm) = 15,03; 38,87; 99,70; 115,98; 117,12; 122,15; 123,81; 125,09; 127,42; 127,94; 129,15; 130,93; 142,70; 146,94; 150,41; 156,41; 161,70
ESI-HRMS	Izračunano za C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>3</sub> [M+H] <sup>+</sup> (m/z) = 306,1130, izmerjena vrednost: 306,1121
IR (ATR)	3058, 1700, 1627, 1605, 1574, 1466, 1436, 1390, 1334, 1245, 1156, 1111, 1091, 1058, 1030, 900, 868, 843, 779, 760 cm <sup>-1</sup>

### 4.3. Sinteza 2-ciano-N-(5-metil-7-okso-3-fenil-7H-furo[3,2-g]kromen-6-il)acetamida (5)

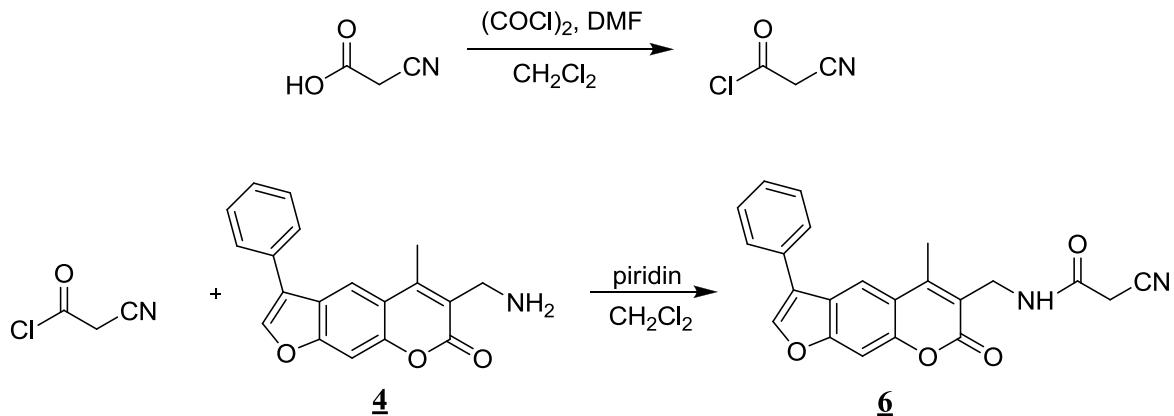


Raztopini 2-cianoocetne kisline (0,048 g, 0,570 mmol, 1,50 ekviv.) v DKM (10 mL) smo dodali oksalil klorid (0,145 mL, 1,710 mmol, 4,50 ekviv.) in 3 kapljice DMF ter reakcijsko zmes pustili mešati 1 uro pri sobni temperaturi. Reakcijski zmesi smo pri

znižanem tlaku uparili topilo. Dobljeni surovi 2-cianoacetil klorid smo sušili na vakuumski črpalki 30 minut. V drugo bučko smo zatehtali spojino **3f** (0,110 g, 0,380 mmol, 1,00 ekviv.), jo raztopili v 10 mL DKM in ob mešanju na ledeni kopeli dodali piridin (0,125 mL, 1,520 mmol, 4,00 ekviv.). Raztopini smo po kapljicah dodali raztopino predhodno pripravljenega surovega 2-cianoacetil klorida v 5 mL DKM. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 1 uro pri sobni temperaturi. Reakcijski zmesi smo nadalje dodali 30 mL DKM, jo prenesli v lij ločnik ter jo sprali z 1M HCl ( $3 \times 20$  mL), vodo (30 mL), nasičeno vodno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (30 mL), nasičeno vodno raztopino NaCl (30 mL), sušili z brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali ter uparili topilo pri znižanem tlaku. Spojino smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = DKM/MeOH = 20/1).

<b>2-ciano-N-(5-metil-7-okso-3-fenil-7H-furo[3,2-g]kromen-6-il)acetamid (5)</b>		M = 358,35 g/mol
<b>Izgled:</b> bela amorfna trdna snov	<b>T<sub>tal</sub>:</b> 232,0–235,5 °C	
<b>TLC:</b> R <sub>f</sub> (EtOAc/n-hex = 2/1) = 0,58		
<b>Izkoristek reakcije:</b> 48%		
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)</b>	$\delta$ (ppm) = 2,46 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4,00 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 7,44 (tt, $J_1$ = 7,4 Hz, $J_2$ = 1,4 Hz, 1H, Ar-H), 7,53–7,58 (m, 2H, Ar-H), 7,83–7,85 (m, 2H, Ar-H), 7,87 (s, 1H, Ar-H), 8,22 (s, 1H, Ar-H), 8,52 (s, 1H, Ar-H), 10,00 (br s, 1H, NH)	
<b><sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)</b>	$\delta$ (ppm) = 14,79; 25,53; 99,72; 115,83; 116,34; 117,20; 118,79; 121,21; 123,11; 127,21; 127,84; 129,18; 130,52; 144,52; 147,28; 149,34; 156,17; 157,80; 161,89	
<b>ESI-HRMS</b>	Izračunano za C <sub>21</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> [M+H] <sup>+</sup> (m/z) = 359,1032, izmerjena vrednost: 359,1041	
<b>IR (ATR)</b>	3239, 3091, 2943, 2257, 1710, 1670, 1630, 1605, 1577, 1530, 1468, 1437, 1406, 1393, 1343, 1292, 1272, 1241, 1159, 1132, 1092, 1069, 1018, 974, 949, 926, 903, 969, 821, 799, 781, 759, 741 cm <sup>-1</sup>	
<b>HPLC</b>	t <sub>R</sub> = 8,573 min (95,21% pri 220 nm; 97,70% pri 254 nm; 97,25% pri 280 nm)	

#### 4.4. Sinteza 2-ciano-N-((5-metil-7-okso-3-fenil-7H-furo[3,2-g]kromen-6-il)metil)acetamida (**6**)



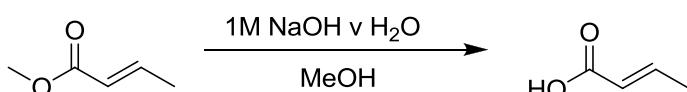
Raztopini cianoacetne klisline (0,042 g, 0,490 mmol, 1,50 ekviv.) v DKM (10 mL) smo dodali oksalil klorid (0,126 mL, 1,490 mmol, 4,50 ekviv.) in katalitično količino DMF. Reakcijsko zmes smo mešali 30 minut pri sobni temperaturi. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom, ostanelek pa posušili na vakuumu 30 minut. Dobili smo surovi 2-cianoacetil klorid, ki smo ga raztopili v 5 mL DKM in po kapljicah dodali raztopini spojine **4** (0,100 g, 0,330 mmol, 1,00 ekviv.) in piridina (0,106 mL, 1,320 mmol, 4,00 ekviv.) v DKM (10mL). Reakcijsko zmes smo mešali čez noč pri sobni temperaturi. Reakcijski zmesi smo dodali 30 mL DKM, jo prenesli v lij ločnik ter sprali z 1M HCl ( $3 \times 20$  mL), vodo (30 mL), nasičeno vodno raztopino  $\text{NaHCO}_3$  (30 mL), nasičeno vodno raztopino  $\text{NaCl}$  (30 mL), sušili z brezvodnim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrirali ter uparili topilo pri znižanem tlaku. Spojino smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo (MF =  $\text{EtOAc}/n\text{-hex} = 1/1$ ).

<b>2-ciano-N-((5-metil-7-okso-3-fenil-7H-furo[3,2-g]kromen-6-</b>	M = 372,37 g/mol
---	------------------

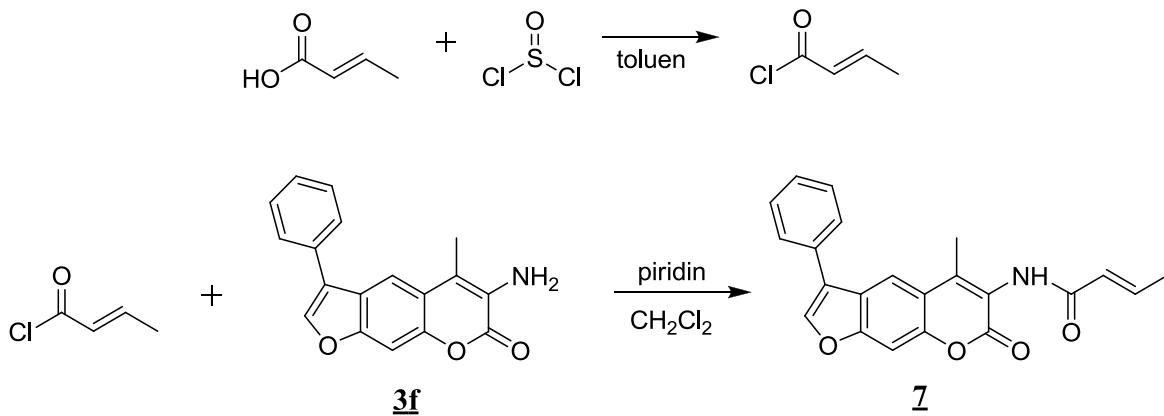
<b>il)metil)acetamid (6)</b>	
Izgled: bela trdna snov	T <sub>tal</sub> : 219,5–220,0 °C
TLC: Rf (EtOAc/n-hex = 2/1) = 0,56	
Izkoristek reakcije: 11%	
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)</b>	δ (ppm) = 2,65 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3,65 (s, 2H, CH <sub>2</sub> CN), 4,31 (d, J = 5,2 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> NH), 7,43–7,47 (m, 1H, Ar-H), 7,54–7,58 (m, 2H, Ar-H), 7,82–7,85 (m, 3H, Ar-H), 8,24 (s, 1H, Ar-H), 8,50 (s, 1H, Ar-H), 8,58 (t, J = 5,2 Hz, 1H, NH)
<b><sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)</b>	δ (ppm) = 15,33; 25,05; 35,93; 99,58; 116,12; 116,66; 117,09; 119,88; 121,25; 122,92; 127,19; 127,83; 129,19; 130,53; 144,42; 150,06; 150,36; 156,20; 160,51; 162,01
<b>ESI-HRMS</b>	Izračunano za C <sub>22</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> [M+H] <sup>+</sup> (m/z) = 373,1188, izmerjena vrednost: 373,1178
<b>IR (ATR)</b>	3324, 3052, 2915, 1673, 1624, 1575, 1548, 1468, 1397, 1351, 1327, 1235, 1214, 1163, 1115, 1090, 1030, 940, 881, 796, 766 cm <sup>-1</sup>
<b>HPLC</b>	t <sub>R</sub> = 9,434 min (95,62% pri 220 nm; 97,23% pri 254 nm; 97,39% pri 280 nm)

#### 4.5. Sinteza (*E*)-N-(5-metil-7-okso-3-fenil-7*H*-furo[3,2-g]kromen-6-il)but-2-enamida (7)

##### Sinteza *trans*-2-butenojske kisline



Raztopini metil *trans*-krotonata (2,000 mL, 18,800 mmol, 1,00 ekviv.) v 20 mL MeOH smo dodali 1M vodno raztopino NaOH (56,4 mL, 56,400 mmol, 3,00 ekviv.) in mešali 1 uro pri 65 °C. Reakcijsko zmes smo ohladili na sobno temperaturo in nakisali s koncentrirano HCl (37%) do pH vrednosti 1–2, pri čemer je iz zmesi izhajal bel dim. Nakisano reakcijsko zmes smo ekstrahirali z DKM (3 × 20 mL), organske faze združili, sušili z brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in uparili topilo pri znižanem tlaku.

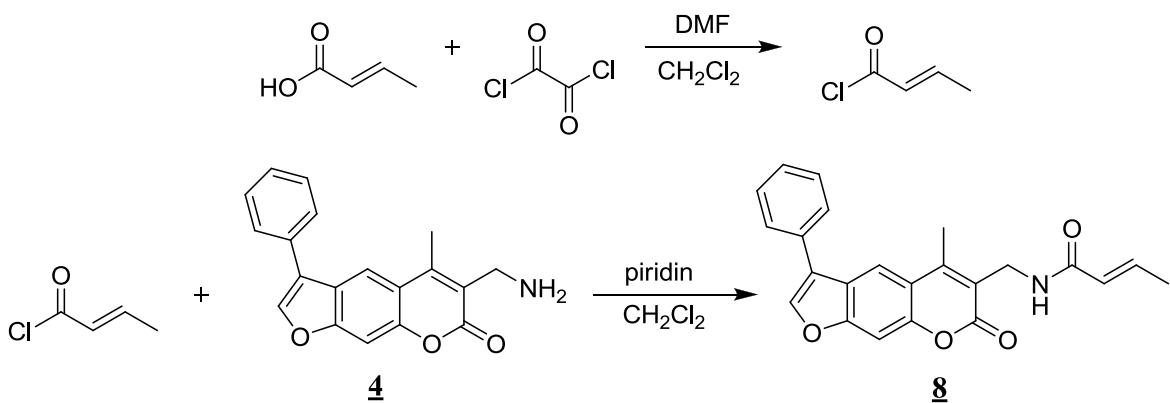


Surovo *trans*-2-butenojsko kislino (0,067 g, 0,780 mmol, 1,50 ekviv.) smo raztopili v toluenu (5 mL) in nastali raztopini pri sobni temperaturi dodali tionil klorid (0,253 mL, 3,480 mmol, 3,00 ekviv.). Reakcijsko zmes smo mešali 2 uri pri 90 °C. Reakcijski zmesi smo uparili topilo, uparek pa nato sušili na vakuumu. Surovi (*E*)-but-2-enoil klorid smo raztopili v 10 mL DKM in ga po kapljicah dodali ohlajeni (0 °C) raztopini spojine **3f** (0,150 g, 0,520 mmol, 1,00 ekviv.) in piridina (0,166 mL, 2,060 mmol, 4,00 ekviv.) v DKM (10 mL). Reakcijsko zmes smo mešali čez noč pri sobni temperaturi. Nato smo zmesi dodali 30 mL DKM, vse skupaj prenesli v lij ločnik in sprali z 1M HCl (3 × 20 mL), vodo (30 mL), nasičeno vodno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (30 mL), nasičeno vodno raztopino NaCl (30 mL), sušili z brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in uparili topilo pri znižanem tlaku. Spojino smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/n-hex = 1/2) ter nadalje še s prekrstalizacijo iz EtOAc.

**(E)-N-(5-metil-7-okso-3-fenil-7H-furo[3,2-g]kromen-6-il)but-2-** M = 359,37 g/mol

<b>enamid (7)</b>	
Izgled: sivobela trdna snov	T <sub>tal</sub> : 236,5–238,0 °C
TLC: Rf (EtOAc/n-hex = 2/1) = 0,19	
Izkoristek reakcije: 21%	
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)</b>	δ (ppm) = 1,88 (d, J = 6,8 Hz, 3H, CHCH <sub>3</sub> ), 2,41 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 6,21 (d, J = 16,0 Hz, 1H, CH=CHCH <sub>3</sub> ), 6,21 (dq, J <sub>1</sub> = 14,4 Hz, J <sub>2</sub> = 6,8 Hz, 1H, CH=CHCH <sub>3</sub> ), 7,42–7,46 (m, 1H, Ar-H), 7,53–7,57 (m, 2H, Ar-H), 7,83–7,85 (m, 2H, Ar-H), 7,86 (s, 1H, Ar-H), 8,20 (s, 1H, Ar-H), 8,51 (s, 1H, Ar-H), 9,59 (br s, 1H, NH)
<b><sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)</b>	δ (ppm) = 15,00; 17,49; 99,66; 116,60; 116,96; 119,58; 121,21; 123,05; 124,84; 127,20; 127,82; 129,18; 130,57; 140,38; 144,45; 146,40; 149,27; 156,01; 158,19; 163,99
<b>ESI-HRMS</b>	Izračunano za C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>4</sub> [M+H] <sup>+</sup> (m/z) = 360,1236, izmerjena vrednost: 360,1246
<b>IR (ATR)</b>	3253, 1713, 1669, 1638, 1579, 1512, 1469, 1437, 1390, 1339, 1243, 1196, 1158, 1130, 1088, 1067, 1026, 971, 934, 902, 836, 822, 760, 735 cm <sup>-1</sup>
<b>HPLC</b>	t <sub>R</sub> = 10,031 min (95,64% pri 220 nm; 95,33% pri 254 nm; 95,26% pri 280 nm)

#### 4.6. Sinteza (E)-N-((5-metil-7-okso-3-fenil-7H-furo[3,2-g]kromen-6-il)metil)but-2-enamida (8)

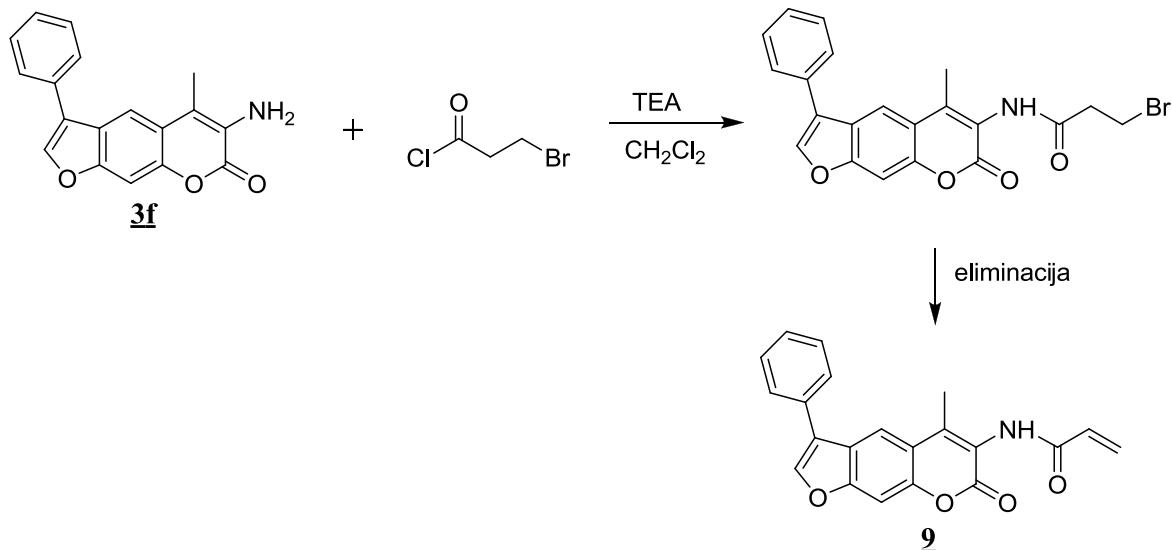


Raztopini *trans*-2-butenojske kisline (0,133 g, 1,540 mmol, 3,00 ekviv.) v DKM (15 mL) smo pri sobni temperaturi dodali katalitično količino DMF in oksalil klorid (0,262

mL, 3,090 mmol, 6,00 ekviv.). Reakcijsko zmes smo mešali 2 uri pri sobni temperaturi. Topilo smo uparili, preostanek pa posušili na vakuumski črpalki 30 minut. Nastali (*E*)-but-2-enoil klorid smo raztopili v 10 mL DKM in ga po kapljicah dodali v ohlajeno (0 °C) raztopino spojine **4** (0,140 g, 0,460 mmol, 0,50 ekviv.) in piridina (0,332 mL, 4,120 mmol, 8,00 ekviv.) v DKM (10 mL). Reakcijsko zmes smo mešali čez noč pri sobni temperaturi. Nato smo dodali 30 mL DKM, vse skupaj prenesli v lij ločnik in ekstrahirali z 1M HCl (3 × 20 mL), vodo (30 mL), nasičeno vodno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (30 mL), nasičeno vodno raztopino NaCl (30 mL), sušili z brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in uparili topilo pri znižanem tlaku. Spojino smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/n-hex = 1/1).

<b>(<i>E</i>)-N-((5-metil-7-okso-3-fenil-7<i>H</i>-furo[3,2-g]kromen-6-il)metil)but-2-enamid (8)</b>		M = 373,40 g/mol
Izgled: bela trdna snov	T <sub>tal</sub> :	219,0–221,5 °C
TLC: R <sub>f</sub> (EtOAc/n-hex = 1/1) = 0,28		
Izkoristek reakcije: 17%		
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)</b>	$\delta$ (ppm) = 1,76 (d, <i>J</i> <sub>1</sub> = 6,9 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 1,6 Hz, 3H, CHCH <sub>3</sub> ), 2,63 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4,33 (d, <i>J</i> = 5,2 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> NH), 5,93 (dd, <i>J</i> <sub>1</sub> = 15,3 Hz, <i>J</i> <sub>1</sub> = 1,7 Hz, 1H, CH=CHCH <sub>3</sub> ), 6,21 (dq, <i>J</i> <sub>1</sub> = 14,8 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 6,8 Hz, 1H, CH=CHCH <sub>3</sub> ), 7,42–7,46 (m, 1H, Ar-H), 7,53–7,58 (m, 2H, Ar-H), 7,81–7,84 (m, 3H, Ar-H), 8,15 (t, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H, NH), 8,23 (s, 1H, Ar-H), 8,49 (s, 1H, Ar-H)	
<b><sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)</b>	$\delta$ (ppm) = 15,32; 17,32; 35,35; 99,52; 116,81; 116,94; 120,56; 121,26; 122,87; 125,43; 127,20; 127,84; 129,21; 130,58; 138,05; 144,36; 150,07; 150,11; 156,15; 160,60; 164,68	
<b>ESI-HRMS</b>	Izračunano za C <sub>23</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>4</sub> [M+H] <sup>+</sup> (m/z) = 374,1392, izmerjena vrednost: 374,1402	
<b>IR (ATR)</b>	2922, 2853, 1705, 1628, 1577, 1530, 1464, 1439, 1391, 1340, 1260, 1156, 1083, 1025, 969, 839, 796, 760 cm <sup>-1</sup>	
<b>HPLC</b>	t <sub>R</sub> = 10,594 min (84,22% pri 220 nm; 83,56% pri 254 nm; 80,44% pri 280 nm)	

#### 4.7. Sinteza *N*-(5-metil-7-okso-3-fenil-7*H*-furo[3,2-*g*]kromen-6-il)akrilamida (**9**)

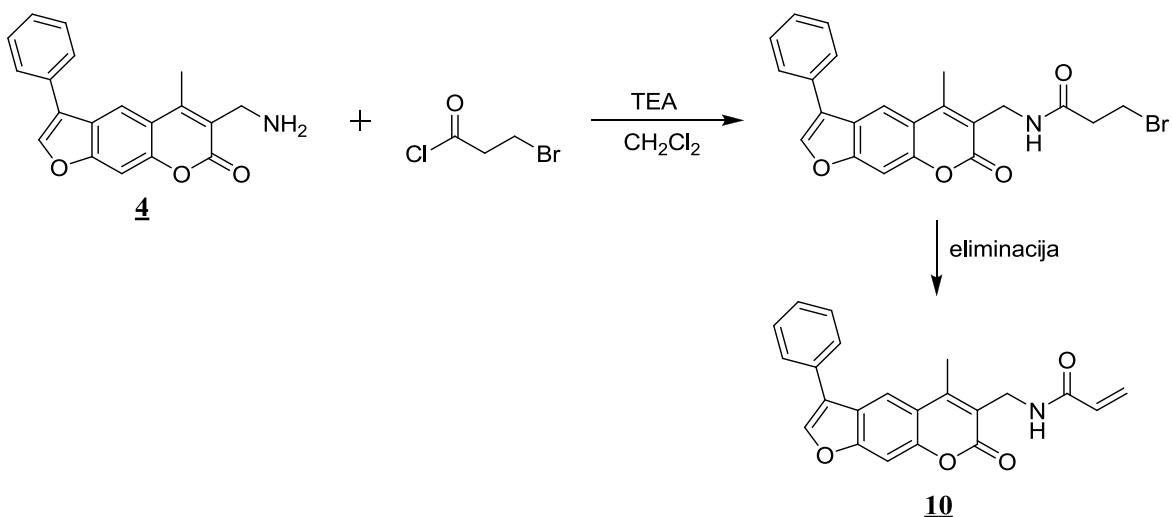


Spojino **3f** (0,095 g, 0,330 mmol, 1,00 ekviv.) smo raztopili v DKM (10 mL), prepigli z argonom in dodali  $\text{Et}_3\text{N}$  (0,185 mL, 0,330 mmol, 1,00 ekviv.) in 3-bromopropionil klorid (0,076 mL, 0,720 mmol, 2,20 ekviv.). Reakcijsko zmes smo mešali čez noč pri sobni temperaturi. Nato smo dodali DKM (20 mL) in reakcijsko zmes ekstrahirali z 1M HCl (30 mL), vodo (30 mL), nasičeno vodno raztopino  $\text{NaHCO}_3$  (30 mL), nasičeno vodno raztopino NaCl (30 mL), sušili z brezvodnim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrirali in uparili topilo pri znižanem tlaku. Spojino smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo (MF =  $\text{EtOAc}/n\text{-hex} = 1/1$ ).

<i>N</i> -(5-metil-7-okso-3-fenil-7 <i>H</i> -furo[3,2- <i>g</i> ]kromen-6-	M = 345,35 g/mol
---	------------------

<b>il)akrilamid (9)</b>	
Izgled: bela amorfna trdna snov	T <sub>tal</sub> : 232,0–234,0 °C
TLC: Rf (EtOAc/n-hex = 1/1) = 0,39	
Izkoristek reakcije: 38%	
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)</b>	δ (ppm) = 2,43 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 5,80 (dd, J <sub>1</sub> = 10,1 Hz, J <sub>2</sub> = 1,8 Hz, 1H, akrilamid), 6,26 (dd, J <sub>1</sub> = 17,1 Hz, J <sub>2</sub> = 1,9 Hz, 1H, akrilamid), 6,53 (dd, J <sub>1</sub> = 17,1 Hz, J <sub>2</sub> = 10,2 Hz, 1H, akrilamid), 7,41–7,47 (m, 1H, Ar-H), 7,52–7,59 (m, 2H, Ar-H), 7,83–7,86 (m, 2H, Ar-H), 7,87 (s, 1H, Ar-H), 8,21 (s, 1H, Ar-H), 8,51 (s, 1H, Ar-H), 9,82 (br s, 1H, NH)
<b><sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)</b>	δ (ppm) = 15,02; 99,70; 116,54; 117,04; 119,35; 121,22; 123,09; 127,21; 127,34; 127,83; 129,19; 130,56; 130,75; 144,48; 146,60; 149,30; 156,07; 158,09; 163,76
<b>ESI-HRMS</b>	Izračunano za C <sub>21</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>4</sub> [M+H] <sup>+</sup> (m/z) = 346,1079, izmerjena vrednost: 346,1085
<b>IR (ATR)</b>	3133, 2988, 1717, 1652, 1625, 1606, 1578, 1538, 1437, 1403, 1288, 1344, 1319, 1250, 1228, 1159, 1128, 1081, 1016, 976, 953, 936, 911, 879, 814, 791, 753 cm <sup>-1</sup>
<b>HPLC</b>	t <sub>R</sub> = 9,024 min (94,78% pri 220 nm; 95,05% pri 254 nm; 95,17% pri 280 nm)

#### 4.8. Sinteza *N*-(5-metil-7-okso-3-fenil-7*H*-furo[3,2-g]kromen-6-il)metil)akrilamida (10)



Spojino **4** (0,043 g, 0,140 mmol, 1,00 ekviv.) smo raztopili v 10 mL DKM, raztopino 10 minut prepihavali z argonom, dodali Et<sub>3</sub>N (0,078 mL, 0,560 mmol, 4,00 ekviv.) in 3-bromopropionil klorid (0,031 mL, 0,310 mmol, 2,20 ekviv.) ter reakcijsko zmes mešali čez noč pri sobni temperaturi. Reakcijski zmesi smo dodali 20 mL DKM, jo prenesli v lik ločnik in ekstrahirali z 1M HCl (30 mL), vodo (30 mL), nasičeno vodno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (30 mL), nasičeno vodno raztopino NaCl (30 mL), sušili z brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in uparili topilo pri znižanem tlaku. Spojino smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/n-hex = 1/1) in prekristalizacijo iz EtOAc.

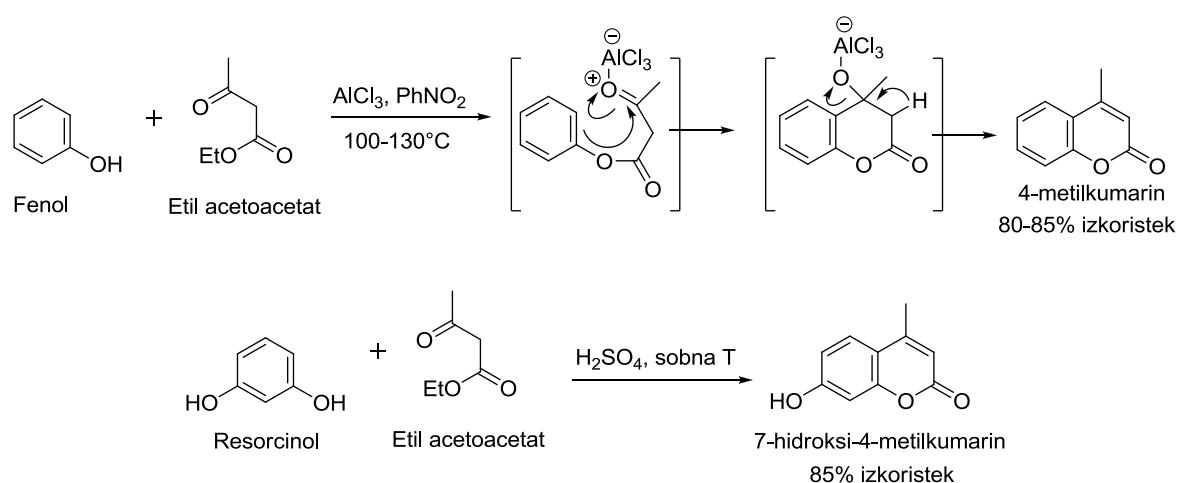
<b><i>N-((5-metil-7-okso-3-fenil-7H-furo[3,2-g]kromen-6-il)metil)akrilamid (10)</i></b>		M = 359,37 g/mol
<b>Izgled:</b> bela amorfna trdna snov	T <sub>tal</sub> :	191,5–94,0 °C
<b>TLC:</b> Rf (EtOAc/n-hex = 1/1) = 0,38		
<b>Izkoristek reakcije:</b> 38%		
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)</b>	$\delta$ (ppm) = 2,65 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4,36 (d, $J$ = 5,6 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> NH), 5,58 (dd, $J$ <sub>1</sub> = 10,1 Hz, $J$ <sub>2</sub> = 2,3 Hz, 1H, akrilamid), 6,10 (dd, $J$ <sub>1</sub> = 17,1 Hz, $J$ <sub>2</sub> = 2,3 Hz, 1H, akrilamid), 6,26 (dd, $J$ <sub>1</sub> = 17,1 Hz, $J$ <sub>2</sub> = 10,1 Hz, 1H, akrilamid), 7,42–7,46 (m, 1H, Ar-H), 7,53–7,58 (m, 2H, Ar-H), 7,82–7,84 (m, 3H, Ar-H), 8,23 (s, 1H, Ar-H), 8,38 (t, $J$ = 5,2 Hz, 1H, NH), 8,49 (s, 1H, Ar-H)	
<b><sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)</b>	$\delta$ (ppm) = 15,00; 17,49; 99,66; 116,60; 116,96; 119,58; 121,21; 123,05; 124,84; 127,20; 127,82; 129,18; 130,57; 140,38; 144,45; 146,40; 149,27; 156,01; 158,19; 163,99	
<b>ESI-HRMS</b>	Izračunano za C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>4</sub> [M+H] <sup>+</sup> (m/z) = 360,1236, izmerjena vrednost: 360,1231	
<b>IR (ATR)</b>	3269, 3057, 1704, 1648, 1622, 1573, 1529, 1469, 1434, 1393, 1330, 1304, 1236, 1156, 1110, 1095, 1072, 1030, 987, 953, 882, 845, 795, 760, 743 cm <sup>-1</sup>	
<b>HPLC</b>	t <sub>R</sub> = 9,759 min (92,13% pri 220 nm; 95,54% pri 254 nm; 95,47% pri 280 nm)	

## 5. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1. Komentar sinteznih postopkov

#### 5.1.1. Pechmannova kondenzacija

Reakcija Pechmannove kondenzacije se uporablja za sintezo kumarinov, kjer fenol reagira s karboksilno kislino ali z  $\beta$ -keto estrom (slika 19). Reakcija poteka pri višjih temperaturah pod kislimi pogoji v prisotnosti metansulfonske kisline ali Lewisove kisline (npr.  $\text{AlCl}_3$ ). V primeru visoko aktiviranih fenolov kot je resorcinol, lahko reakcijo izvajamo tudi pod milejšimi pogoji ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , sobna temperatura). Kislina katalizira transesterifikacijo kot tudi keto-enolno tautomerijo, čemur sledi napad *ortho* pozicije na aktivirano karbonilno skupino, da se ustvari nov obroč. Končni korak je dehidracija obroča (19).

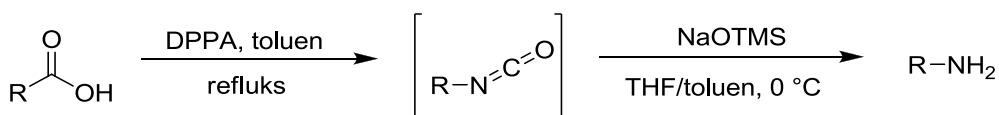


Slika 19: Pechmannova kondenzacija (prirejeno po (3a))

Spojino **3f** smo sintetizirali v 6 stopnjah. V prvi stopnji je potekla Pechmannova kondenzacija med resorcinolom in etil 2-acetamid-3-oksobutanoatom. Slednjega smo sintetizirali iz etil 3-oksobutanoata preko hidroksiimino intermediata, ki smo ga reducirali do amina in v isti reakcijski stopnji tudi zaščitili v obliki acetamida. Sledila je nukleofilna substitucija z nastalim kumarinskim derivatom in 2-bromo-1-feniletanonom in kondenzacija spojine. Nastalemu psoralenskemu obroču, substituiranemu z metilno skupino na mestu 4, smo na koncu odstranili zaščitno skupino s kislinsko katalizirano hidrolizo amidne vezi.

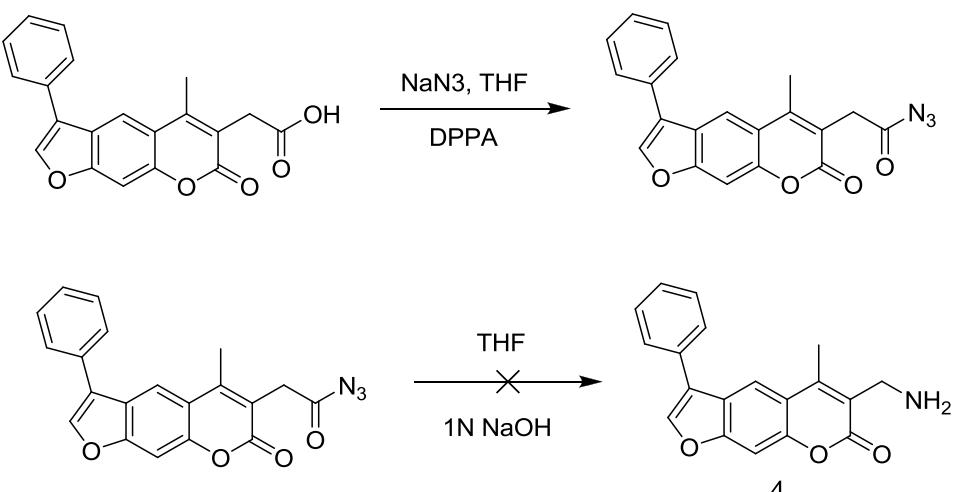
### 5.1.2. Modificirana Curtiusova reakcija

Za pripravo spojine **4** smo izvedli modificirano Curtiusovo reakcijo, ki zagotavlja učinkovito metodo direktne izolacije prostih aminov iz različnih karboksilnih kislin (slika 20). Vnaprej pripravljeni karboksilni kislini smo dodali toluen kot topilo, Et<sub>3</sub>N in DPPA (“coupling”) reagent, s katerim smo pretvorili karboksilno kislino v izocianat z minimalnim kopičenjem nestabilnega acil azida kot vmesne stopnje reakcije. Po ohladitvi reakcijske zmesi na 0 °C smo izocianatni intermediat hidrolizirali z raztopino kalijevega trimetilsilanolata (KOTMS) v THF. Po literurnem postopku bi lahko uporabili tudi NaOTMS, vendar tega nismo imeli na voljo. Z dodatkom 5% citronske kisline smo zaustavili potek hidrolize, uparili topilo pri znižanem tlaku in izolirali 6-(aminometil)-5-metil-3-fenil-7H-furo[3,2-g]kromen-7-on v obliki proste baze.



Slika 20: Modificirana Curtiusova reakcija (prirejeno po (17))

Spojino **4** smo poskušali sintetizirati tudi po dveh drugih metodah, saj smo žeeli izboljšati izkoristek reakcije. Pri prvi metodi smo z NaN<sub>3</sub> pretvorili izhodno karboksilno kislino v acil azid ob prisotnosti suhega THF in “coupling” reagenta DPPA. Po 18-urnem mešanju na sobni temperaturi smo nastali azidni intermediat, na nastanek katerega smo sklepali le na podlagi TLC analize, očistili s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/n-hex = 2/1). Surovi acil azid smo raztopili v THF in 1N NaOH, pri znižanem tlaku skoncentrirali vzorec in izvedli ekstrakcijo (slika 21). Zaradi neznanega razloga reakcija ni potekla, saj na TLC-ju (DKM/MeOH = 9/1) tudi po orosavanju z ninhidrinom želeni produkt ni bil viden.

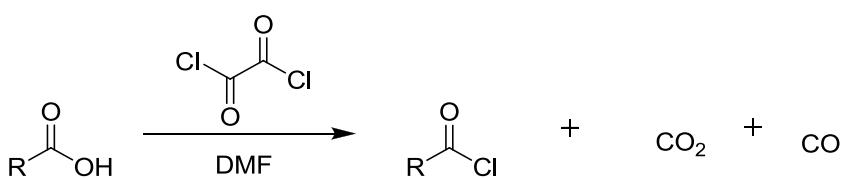


Slika 21: Klasična Curtiusova prenestitev in hidroliza do amina

Pri drugi metodi sinteze spojine **4** pa smo vnaprej pripravljeno kislino raztopili v acetonu, dali na ledeno kopel in v bučko dodali še Et<sub>3</sub>N ter etil kloroformat. Po 30 minutah smo k reakcijski zmesi dodali NaN<sub>3</sub>. Po 1 uri mešanja smo na reakcijsko zmes zlili na 30 mL ledene vode in ekstrahirali s hladnim DKM. Uparili smo topilo, zaostanku dodali vrel 1,4-dioksan in reakcijsko zmes mešali pri 100 °C. Po 1 uri smo zmes ohladili na 70 °C, dodali HCl in pustili mešati pri sobni temperaturi še 2 dneva.. Na TLC-ju (EtOAc/n-hex = 2/1) in po NMR analizi smo sicer dobili željeni produkt v obliki soli. Izkoristek reakcije je bil zelo slab, poleg tega pa produkt ni bil dovolj čist, zato smo to reakcijsko pot opustili.

### 5.1.3. Sinteza cianoacetamida

Za sintezo cianoacetamidnih derivatov (**5** in **6**) smo najprej pripravili 2-cianoacetil klorid z reakcijo med 2-cianoocetno kislino in oksalil kloridom, ob prisotnosti DKM kot topila in katalizatorja DMF (slika 22). Katalitična količina DMF-a se pri sami reakciji pretvori v imidoil kloridni derivat ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>N=CHCl<sup>+</sup>), ki je aktivno klorirno sredstvo.



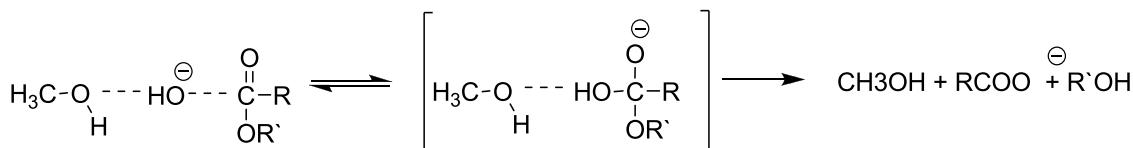
Slika 22: Sinteza acil kloridov

Nastali 2-cianoacetil klorid smo prenesli v vnaprej pripravljeno ohlajeno raztopino ustreznega amina (**3f** ozziroma **4**) v DKM in piridinom kot bazo.

Sintezo akrilamidov smo poskušali izvesti tudi z uporabo sklopitvenega reagenta EDC, vendar poskus ni bil uspešen, saj kljub čiščenju s kolonsko kromatografijo nismo uspeli izolirati končnih produktov v zadovoljivi čistosti. Zaradi tega smo se odločili za tvorbo aktiviranih kislinskih kloridov in preko njih sintetizirali cianoacetamide.

#### 5.1.4. Sinteza derivatov s *trans*-krotonatom

*Trans*-2-butenojsko kislino smo pripravili z enostavno metodo alkalne hidrolize estra (slika 23). Hidroliza je vključevala uporabo vodne raztopine 1M NaOH v kombinaciji z organskim topilom MeOH. Po mešanju reakcijske zmesi pri 65 °C za 1 uro, je nastala bela oborina, ki smo jo nakisali s koncentrirano HCl do pH vrednosti 1. Z ekstrakcijo nakisane reakcijske zmesi in uparevanjem topila pri znižanem tlaku smo uspešno izolirali *trans*-2-butenojsko kislino.



Slika 23: Alkalna hidroliza estra (prirejeno po (20))

V nadaljevanju smo iz *trans*-2-butenojske kisline pripravili kislinski klorid. Pri sintezi spojine **7** smo v ta namen kot reagent uporabili tionil klorid, pri sintezi spojine **8** pa oksalil klorid v prisotnosti katalizatorja DMF in topila DKM. Nastali surovi (*E*)-but-2-enoil klorid smo nato dodali v predhodno pripravljeno ohlajeno raztopino spojine **3f** oziroma **4** in piridina v DKM ter tako sintetizirali derivata s *trans*-krotonatom (**7** in **8**).

#### 5.1.5. Sinteza akrilamidov

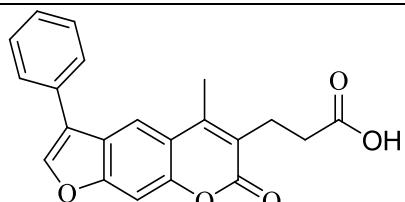
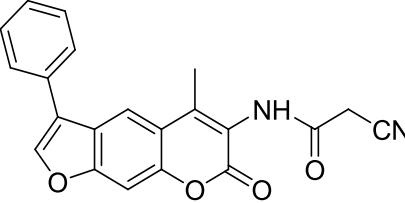
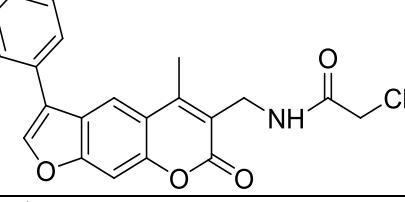
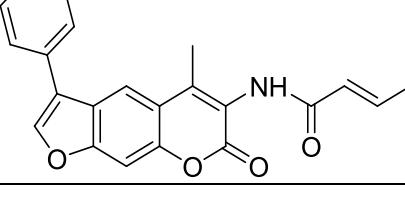
Za sintezo akrilamidnih derivatov (**9** in **10**) smo izhodni amin (**3f** oziroma **4**) acilirali s 3-bromopropionil kloridom ob prisotnosti Et<sub>3</sub>N. Po mešanju pri sobni temperaturi in izolaciji se je iz intermediata 3-bromo-N-((5-metil-7-okso-3-fenil-7*H*-furo[3,2-g]kromen-6-il)metil)propanamide in 3-bromo-N-(5-metil-7-okso-3-fenil-7*H*-furo[3,2-g]kromen-6-il)propanamide eliminiral še HBr.

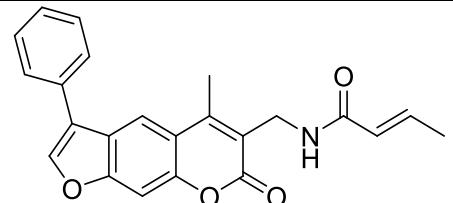
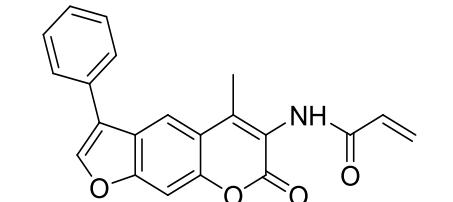
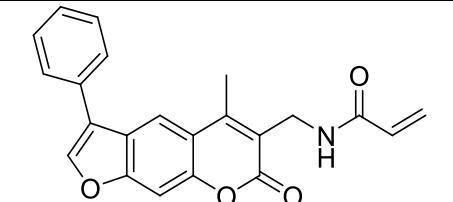
### 5.2. Rezultati in razprava biokemijskega vrednotenja

Sintetiziranim in očiščenim spojinam **5–10** smo določili RA vrednost, torej aktivnost encima ob prisotnosti določene koncentracije spojine, ki smo jo primerjali z aktivnostjo encima v odsotnosti spojin. Kontrola je bila sam encim, ki se mu je namesto

spojine dodal DMSO, tako da je bila na koncu v obeh primerih količina DMSO enaka. Višja kot je RA vrednost, manj zavrt je encim. Iz rezultatov o aktivnosti testiranih spojin za imunoproteasom lahko vidimo, da nobena izmed sintetiziranih spojin ni pretirano aktivna, zato nadaljnje biokemijskega vrednotenja z določitvijo IC<sub>50</sub> vrednosti nismo izvedli. V tabeli 1 lahko vidimo tudi aktivnost spojine **2**, ki je služila kot izhodišče za celotno serijo spojin, in je izkazovala dobro zaviralno aktivnost. Zaradi variacije testa je vrednost lahko tudi nad 100%, saj gre tukaj samo za preliminarno vrednotenje.

Tabela 1: Rezultati biokemijskega vrednotenja

Oznaka spojin	Struktura	RA (%) pri 10 µM spojinah	
		Povprečje	SD
<b>2</b>		26	10
<b>5</b>		135	34
<b>6</b>		101	11
<b>7</b>		102	15

<b>8</b>		116	/
<b>9</b>		56	10
<b>10</b>		90	/

## 6. SKLEP

V magistrski nalogi smo načrtovali in sintetizirali potencialne kovalentne zaviralce  $\beta$ 5i podenote humanega imunoproteasoma. Sintetizirali smo dve osnovni strukturi s psoralenskim skeletom (**3f** in **4**), ki sta izhajali iz spojine zadetek (**2**). Spojino **3f** smo sintetizirali v več korakih po principu Pechmannove kondenzacije, spojino **4** pa smo sintetizirali po modificirani Curtiusovi reakciji. Intermediatoma **3f** in **4** smo nato na amino skupino pripnjali različne elektrofilne bojne glave in tvorili vinil amidne in ciano acetamidne derivate. Sintetizirali smo dve spojini s ciano skupino (**5** in **6**) in 4 akrilamidne derivate (**7–10**). Vse končne spojine smo biokemijsko ovrednotili z določitvijo zaviralne aktivnosti na izolirani  $\beta$ 5i podenoti imunoproteasoma..

Kljub ugotovitvi, da v tej magistrski nalogi pripravljene in opisane spojine ne izkazujejo pretirane aktivnosti na tarčni  $\beta$ 5i podenoti imunoproteasoma, so nadaljnje raziskave na področju nepeptidnih  $\beta$ 5i selektivnih zaviralcev še kako potrebne. Razvoj novih spojin z večjo zaviralno jakostjo ali nadaljnja optimizacija že znanih selektivnih zaviralcev sekundarne generacije lahko bistveno pripomoreta k razumevanju vpletenosti imunoproteasoma pri avtoimunskeh, nevrodgenerativnih bolezni in različnih rakavih obolenjih, in tako pripomoreta k razvoju potencialnih zdravil.

## 7. LITERATURA

1. Baumeister W.; Walz J.; Zühl F.; Seemüller E. The Proteasome: Paradigm of a Self-Compartmentalizing Protease. *Cell.* **1998**, 92, 367–380.
2. Voges D.; Zwickl P.; Baumeister W. The 26S Proteasome: A Molecular Machine Designed for Controlled Proteolysis. *Annual Review of Biochemistry.* **1999**, 1015–1068.
3. Kuhn D. J.; Orlowski R. Z. The Immunoproteasome as a Target in Hematologic Malignancies. *Seminars in Hematology.* **2012**, 49(3), 1–8.
4. Miller Z.; Ao L.; Kim K. B.; Lee W. Inhibitors of the Immunoproteasome: Current Status and Future Directions. *Current Pharmaceutical Design.* **2013**, 19(22), 4140–4151.
5. Wang J.; Maldonado M. A. The Ubiquitin-Proteasome System and Its Role in Inflammatory and Autoimmune diseases. *Cellular & Molecular Immunology.* **2006**, 3(4), 255–261.
6. Schmidt N. The role of the immunoproteasome in inflammatory bowel disease. *Der Technischen Universität Berlin, Fakultät III–Prozesswissenschaften.* **2010**.
7. Voorhees P. M.; Dees E. C.; O’Neil B.; Orlowski R. Z. The Proteasome as a Target for Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research.* **2003**, 9, 6316 – 6325.
8. Lodish H.; Berk A.; Kaiser C. A.; Krieger M.; Scott M. P.; Bretscher A.; Ploegh H.; Matsudaira P. *Molecular cell biology.* 6th ed, W. H. Freeman and Company, Madison Avenue, New York. **2008**, 86–88.
9. Huber E. M.; Groll M. Inhibitors for the Immuno- and Constitutive Proteasome: Current and Future Trends in Drug Development. *Angewandte Chemie International Edition.* **2012**, 51, 8708 – 8720.
10. Sosić I.; Gobec M.; Brus B.; Knez D.; Živec M.; Konc J.; Lešnik S.; Ogrizek M.; Obreza A.; Žigon D.; Janežič D.; Mlinarič-Raščan I.; Gobec S. Nonpeptidic Selective Inhibitors of the Chymotrypsin-Like ( $\beta$ 5i) Subunit of the Immunoproteasome. *Angewandte Chemie International Edition.* **2016**, 55, 5745–5748.
11. Tanaka K. The Proteasome: From Basic Mechanisms to Emerging Roles. *The Keio Journal of Medicine.* **2013**, 62(1), 1–12.

12. Demo S. D.; Kirk C. J.; et al: Antitumor Activity of PR-171, a Novel Irreversible Inhibitor of the Proteasome. *Cancer Research*. **2007**, 67(13), 6383–6391.
13. Kisseelev A. F.; Groettrup M. Subunit specific inhibitors of proteasomes and their potential for immunomodulation. *Current Opinion in Chemical Biology*. **2014**, 23, 16–22.
14. Kuhn D. J.; Hunsucker S. A.; Chen Q.; Voorhees P. M.; Orlowski M.; Orlowski R. Z. Targeted inhibition of the immunoproteasome is a potent strategy against models of multiple myeloma that overcomes resistance to conventional drugs and nonspecific proteasome inhibitors. *Blood*. **2009**, 113(19), 4667–4676.
15. Richardson P. G. MD; Barlogie B. MD; et al. A Phase 2 Study of Bortezomib in Relapsed, Refractory Myeloma. *The New England Journal of Medicine*. **2003**, 2609–2617.
16. Ferrington D. A.; Gregerson D. S. Immunoproteasomes: Structure, Function, and Antigen Presentation. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. **2012**, 109, 75–112.
17. Ma B.; Lee W.-C. A modified Curtius reaction: an efficient and simple method for direct isolation of free amine. *Tetrahedron Letters*. **2010**, 51, 385–386.
18. Seo H. J.; Park E.-J.; Kim M. J.; Kang S. Y.; Lee S. H.; Kim H. J.; Lee K. N.; Jung M. E.; Lee M.; Kim M.-S.; et al. Design and synthesis of novel arylpiperazine derivatives containing the imidazole core targeting 5-HT(2A) receptor and 5-HT transporter. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2011**, 54(18), 6305–6318.
19. János D.; András S. Mechanism of the Pechmann Reaction: A Theoretical Study. *The Journal of Organic Chemistry*. **2011**, 76(21), 8749–8755.
20. Theodorou V.; Skobridis K.; Tzakos A. G.; Ragoussis V. A simple method for the alkaline hydrolysis of esters. *Tetrahedron Letters*. **2007**, 48, 8230–8233.

## 7.1. Viri slikovnega gradiva

Datum dostop do slik: 27.4.2016

- 1a. <https://en.wikipedia.org/wiki/Proteasome>
- 2a. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:1G0U\\_subunits\\_topview.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:1G0U_subunits_topview.png)
- 3a. [https://en.wikipedia.org/wiki/Pechmann\\_condensation](https://en.wikipedia.org/wiki/Pechmann_condensation)