

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Jelena Z. Penjišević

**Proučavanje mesta vezivanja dopaminskog
D2 receptora novosintetisanim ligandima
2-metoksifenilpiperazinskog tipa**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Jelena Z. Penjišević

**Dopamine D2 receptor binding site study by
newly synthesized
2-methoxyphenylpiperazine ligands**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

KOMISIJA:

Mentori:

dr Goran M. Roglić, vanredni profesor

Hemijski fakultet
Univerzitet u Beogradu

dr Vladimir V. Šukalović, naučni saradnik

IHTM-Centar za hemiju
Univerzitet u Beogradu

Član komisije:

dr Deana B. Andrić, vanredni profesor

Hemijski fakultet
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

Ovaj rad urađen je na Hemijskom fakultetu u Beogradu u saradnji sa Institutom za biološka istraživanja "Siniša Stanković".

Temu je predložio profesor dr Goran Roglić koji je zajedno sa dr Vladimirom Šukalovićem i rukovodio izradom ovog rada na čemu sam im iskreno zahvalna.

Veliku zahvalnost dugujem dr Deani Andrić koja mi je pored korisnih saveta tokom izrade, pomogla i prilikom pisanja ove teze.

Dr Slađani–Kostić Rajačić se zahvaljujem na korisnim i dobronamernim savetima koje mi je pružila prilikom izrade rada.

Veliku zahvalnost dugujem dr Milovanu Ivanoviću na kolegijalnoj podršci i pomoći pri izradi rada.

Posebno hvala Anji, Strahinji, Ivanu i mojim roditeljima za nesebičnu ljubav, podršku i pomoć koju su mi pružili.

IZVOD

Proučavanje mesta vezivanja dopaminskog D2 receptora novosintetisanim ligandima 2-metoksifenilpiperazinskog tipa

Poslednjih godina sve više ljudi oboleva od šizofrenije, depresije i drugih neuroloških poremećaja. Njih izazivaju promene na nivou dopaminergičkog i serotonergičkog sistema u mozgu. Dizajn i sinteza dopaminergičkih i serotonergičkih liganada koji bi našli primenu u lečenju bolesti izazvanih disfunkcijom ovih receptorskih sistema u CNS, a čije korišćenje ne bi izazivalo negativne efekte je primaran zadatak naučnika u oblasti medicinske hemije. Poznavanje strukture receptora, odnosno mesta vezivanja liganada u receptoru, doprinelo bi bržem razvoju potencijalnih lekova. U okviru ove doktorske disertacije uspešno je sintetisano i okarakterisano 46 novih liganada. Ligandi su razvrstani u dve serije: ligandi sa piperidinskim prstenom u mostu između glave (benzil, benzoil, fenetil, fenacetil grupe sa odgovarajućim supstituentima) i repa (2-metoksifenilpiperazin) i ligandi sa različitom dužinom alkil mosta između glave (supstituisani benzimidazoli) i repa (2-metoksifenilpiperazin). Za sve novosintetisane ligande određen je farmakološki profil vezivanja za dopaminske D2, serotoniniske 5HT2a i adrenergičke α_1 receptore u testovima kompetitivnog vezivanja sa radioaktivno obeleženim ligandima.

U seriji liganada sa piperidinskim prstenom u mostu između glave (benzil, benzoil, fenetil, fenacetil grupe sa odgovarajućim supstituentima) i repa (2-metoksifenilpiperazin) uočeno je da supstituisani ligandi pokazuju veći afinitet prema dopaminskim D2 receptorima nego nesupstituisani ligandi. Pored toga, ligandi sa većim stepenom fleksibilnosti (metilenski most između piperidinskog i piperazinskog prstena) pokazali su veći afinitet od rigidnih liganada (piperazinski prsten je direktno vezan za piperidinski prsten). Ova serija liganada pokazala je odsustvo ili slab afinitet prema serotoninским 5HT2a receptorima.

U seriji liganada sa različitom dužinom alkil mosta između benzimidazolskog dela i 2-metoksifenilpiperazina utvrđeno je da najveći afinitet prema dopaminskim D2 receptorima pokazuju ligandi sa pet i šest ugljenikovih atoma u mostu. Izuzev dva

liganda, ostala jedinjenja iz ove serije poseduju umeren afinitet vezivanja za serotoninske 5HT_{2a} receptore.

U radu je putem doking analize, pored ortosternog mesta vezivanja ispitano i mesto vezivanja dopaminskog D₂ receptora koje čini druga ekstracelularna petlja (ecl₂). Doking analiza predviđa da ligandi pored toga što ostvaruju aromatične interakcije sa aminokiselinskim ostacima u hidrofobnom džepu receptora Phe 386 (6.44), Trp 390 (6.48), Tyr 420 (7.43), formiraju i hidrofobne interakcije sa aminokiselinskim ostacima Phe 393 i His 397 koji se nalaze u ecl₂. Takođe, preliminarna doking analiza liganada sa različitom dužinom alkil mosta između glave (supstituisani benzimidazoli) i repa (2-metoksifenilpiperazin), ukazuje na postojanje hidrofobnih interakcija između liganda i Ile 166, Leu 170, Ile 184, Phe 189, Val 111, Ile 398, His 397 iz regiona druge ekstracelularne petlje.

Ključne reči: dopaminski D₂ receptor, 2-metoksifenilpiperazin, doking analiza

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Organska hemija

UDK broj: 547.8

ABSTRACT

Dopamine D2 receptor binding site study by newly synthesized 2-methoxyphenylpiperazine ligands

Schizophrenia, depression and related neurological disorders are modern day diseases, caused by dopaminergic and serotonergic imbalances in the brain. Design and synthesis of dopaminergic and serotonergic ligands without side effects, which could find application in the treatment of these CNS disorders, is one of the main objectives of medicinal chemistry. Improved understanding of dopamine D2 receptor binding site would contribute to faster development of potential drugs. As a part of this thesis, 46 new ligands were synthesized and characterized. The ligands were grouped into two sets: ligands with a piperidine ring in the bridge between the head (benzyl, benzoyl, phenethyl, and phenylacetyl groups with different substituents) and the tail (2-methoxyphenylpiperazine) and ligands with different lengths of the alkyl bridge between the head (substituted benzimidazoles) and the tail (2-methoxyphenylpiperazine). All newly synthesized ligands were evaluated for D2, 5HT2a and $\alpha 1$ affinity in an *in vitro* competitive displacement assay using radiolabeled ligands.

Among ligands with the piperidine ring in the bridge between the head (benzyl, benzoyl, phenethyl, phenylacetyl groups with different substituents) and the tail (2-methoxyphenylpiperazine), substituted ligands exhibited a higher affinity for dopamine D2 receptors. In addition, ligands with a greater degree of flexibility (a methylene bridge between the piperidine and piperazine rings) demonstrated a higher affinity compared to rigid ligands (the piperazine ring is bound directly to the piperidine ring). This series of ligands displayed no or low affinity for the serotonin 5HT2a receptors.

Among ligands with different lengths of the alkyl bridge between the benzimidazole and 2-methoxyphenylpiperazine part of the molecule, highest affinity for the dopamine D2 receptor was demonstrated by ligands with five or six carbon atoms in the bridge. Compounds in this series, with the exception of two ligands, had a moderate binding affinity for the serotonin 5HT2a receptors.

The docking analysis was used to examine the D2 orthosteric binding site and the alternative binding site formed by the second extracellular loop (ecl2).

Preliminary docking analysis predicts that ligands, in addition to the interactions with Phe 386 (6.44), Trp 390 (6.48) and Tyr 420 (7.43) in the hydrophobic pocket of the orthosteric binding site, form hydrophobic interactions with Phe 393 and His 397, located in the ecl2. Likewise, the preliminary docking analysis of ligands with the different lengths of the alkyl bridge between the head (substituted benzimidazoles) and

the tail (2-methoxyphenyl piperazine), indicated the existence of hydrophobic interactions between the ligands and Ile 166, Leu 170, Ile 184, Phe 189, Val 111, Ile 398 and His 397, located in the second extracellular loop (ec12).

Keywords: dopamine D₂ receptor, 2-methoxyphenylpiperazine, docking analysis

Scientific field: Chemistry

Scientific discipline: Organic chemistry

UDK number: 547.8

LISTA SKRAĆENICA:

6OHDA- 6-hidroksi dopamin

A.K.- amino kiselina

Asn- asparagin

cAMP- ciklični adenzin-monofosfat

CNS- centralni nervni sistem

DCC- N,N'-dicikloheksilkarbodiimid

DNK- dezoksiribo nukleinska kiselina

ecl1- ekstracelularna petlja 1

ecl2- ekstracelularna petlja 2

EPS- ekstrapiramidalni sindrom

Glu- glutaminska kiselina

GPCR- receptori vezani za G proteine

His- histidin

Ile- izoleucin

LCAP- arilpiperazini dugog niza

Leu- leucin

MAO- monoamin oksidaza

MED- minimalna efektivna doza

OBS- ortosterno mesto vezivanja

PD- Parkinsonova bolest

PDB- proteinska baza podataka

Phe- fenilalanin

Ser- serin

TD- tardivna diskinezija

Thr- treonin

Trp- triptofan

Tyr- tirozin

Val- valin

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	2
2.1. Antipsihotici, antidepresivi i lekovi za lečenje Parkinsonove bolesti	4
2.1.1. Antipsihotici	4
2.1.1.1. Arilpiperazinski derivati kao potencijalni antipsihotici	15
2.1.2. Antidepresivi	21
2.1.2.1. Arilpiperazinski derivati kao potencijalni antidepresivi	25
2.1.3. Arilpiperazinski derivati kao potencijalni lekovi za lečenje Parkinsonove bolesti	27
2.2. Modelovanje D2 receptora	30
2.2.1. Značaj modelovanja i proces homologog modelovanja	30
2.2.2. Hronologija modelovanja D2 receptora	33
2.2.2.1. Modelovanje druge ekstracelularne petlje (ecl2)	43
3. REZULTATI I DISKUSIJA	49
3.1. Sinteze liganada 1-(2-metoksifenil)piperazinskog tipa sa piperidinom u mostu .	50
3.1.1. Sinteza 1-(2-metoksifenil)-4-(piperidin-4-il)piperazina (38)	50
3.1.2. Sinteza 1-(2-metoksifenil)-4-(piperidin-4-ilmetil)piperazina (44)	51
3.1.3. Sinteza 1-(1-benzilpiperidin-4-il)-4-(2-metoksifenil)piperazina i 1-(2 metoksifenil)-4-[1-(benzil)piperidin-4-metil]piperazina i njihovih nitro derivata	54
3.1.4. Sinteza {4-[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il]piperidin-1-il}(fenil)metanona i (4-{[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il]metil}piperidin-1-il)(fenil)metanona i njihovih nitro derivata	55
3.1.5. Sinteza 1-{4-[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il]piperidin-1-il}-2-(fenil)etanona i 1-(4-{[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il]metil}piperidin-1-il)-2-(fenil)etanona i njihovih nitro derivata	56
3.1.6. Sinteza 1-(2-metoksifenil)-4-(1-fenetilpiperidin-4-il)piperazina i 1-(2-metoksifenil)-4-[(1-fenetilpiperidin-4-il)metil]piperazina i njihovih nitro derivata	61
3.2. Sinteza liganada benzimidazol-1(2-metoksifenil)piperazinskog tipa 115-128	64

3.3. Rezultati ispitivanja aktivnosti nivosintetisanih liganada	70
3.3.1. Rezultati kompetitivnog vezivanja liganada 1-(2-metoksifenil)piperazinskog tipa sa piperidinom u mostu	71
3.3.1.1. Rezultati kompetitivnog vezivanja 1-(1-benzilpiperidin-4-il)-4-(2-metoksifenil)piperazina i 1-(2-metoksifenil)-4-[1-(benzil)piperidin-4-metil]piperazina i njihovih nitro derivata	71
3.3.1.2. Rezultati kompetitivnog vezivanja {4-[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il]piperidin-1-il}fenilmetanona i (4-{[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il]metil}piperidin-1-il)fenilmetanona i njihovih nitro derivata	72
3.3.1.3. Rezultati kompetitivnog vezivanja 1-{4-[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il]piperidin-1-il}-2-feniletanona, 1-(4-{[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il]metil}piperidin-1-il)-2-feniletanon i njihovih nitro derivata	73
3.3.1.4. Rezultati kompetitivnog vezivanja 1-(2-metoksifenil)-4-(1-fenetilpiperidin-4-il)piperazin i 1-(2-metoksifenil)-4-[(1-fenetilpiperidin-4-il)metil]piperazin i njihovih nitro derivata	74
3.3.2. Rezultati kompetitivnog vezivanja liganada benzimidazol-1(2-metoksifenil)piperazinskog tipa	75
3.4. Rezultati doking analize novosintetisanih liganada	77
4. EKSPERIMENTALNI DEO	88
4.1. Sinteza	88
4.2. Izolovanje sinaptosomalnih membrana iz mozga pacova	117
4.3. Testovi kompetitivnog vezivanja radioliganda na membranama izolovanim iz mozga pacova	118
4.4. Doking analiza	119
4.4.1. Priprema modela receptora	119
4.4.2. Priprema modela liganada	119
4.4.3. Doking analiza	119
4.4.4. Prikaz rezultata	120
5. ZAKLJUČAK	121
6. LITERATURA	124

1. UVOD

Dopamin je esencijalni neurotransmiter u centralnom nervnom sistemu (CNS), čija je uloga da aktivira dopaminske receptore koji pripadaju porodici G-kuplovanih receptora (GPCR). Za njih je karakteristično da je N terminalni kraj u ekstracelularnom delu, C terminalni kraj u citosolu ćelije, a da kroz membranu prolazi sedam transmembranskih domena (TM). Sastoje se iz α , β i γ podjedinica. Dopaminski receptori su kuplovani sa $G\alpha$ podjedinicom receptora u okviru koje postoji više klasa $G\alpha$, $G\beta\gamma$ itd. Postoji pet tipova dopaminskog receptora (D1, D2, D3, D4 i D5) koji se, po sličnosti, dele u dve grupe D1 (D1 i D5) i D2 (D2, D3 i D4) dopaminskih receptora. D1 grupa receptora je kuplovana sa $G\alpha$ i njeno aktiviranje izaziva produkciju cikličnog adenozin monofosfata (cAMP), dok je grupa D2 receptora kuplovana sa $G\beta\gamma$ i njeno aktiviranje inhibira produkciju cAMP.

Ovi receptori učestvuju u velikom broju neuroloških procesa poput motivacije, zadovoljstva, kognicije, memorije, učenja itd. Bilo kakav poremećaj na nivou dopaminergičkog sistema može da izazove niz patoloških stanja (poput šizofrenije, Parkinsonove bolesti, Turetovog sindroma, itd), što je razlog intenzivnih studija brojnih istraživačkih grupa kako na proučavanju vezivnog mesta receptora kao na sintezi jedinjenja sa poboljšanim farmakološkim karakteristikama (takozvani ligandi).

Cilj ove doktorske disertacije je proučavanje uticaja veličine, oblika i rigidnosti novosintetisanih liganada na vezivanje za dopaminski D2 receptor. Sintetisan je niz liganada aripiperazinskog tipa sa različitim strukturnim motivima. Za novosintetisane ligande ispitana je dopaminergička aktivnost u *in vitro* testovima kompeticije. Dobijeni rezultati su kasnije objašnjeni doking analizom na modelu D2 receptora.

2. OPŠTI DEO

Heterociklična jedinjenja predstavljaju važnu klasu jedinjenja koja su našla primenu u farmaceutskoj industriji kao strukturni motiv velikog broja komercijalno dostupnih lekova. Razlog tome je njihov uticaj na polarnost i lipofilnost lekova, kao i mogućnost građenja vodoničnih veza između molekula leka i jedinjenja sa kojima može da stupi u interakciju. Sve nabrojane osobine mogu da utiču na poboljšanje farmakoloških, farmakokinetičkih, toksikoloških i fizikohemijskih osobina potencijalnih i komercijalno dostupnih lekova^{1,2,3}. Pažnja istraživača je posebno usmerena ka heterociklima koji u svom sastavu sadrže atom azota. U ovu grupu spadaju, između ostalih, piperazin i njegovi derivati.

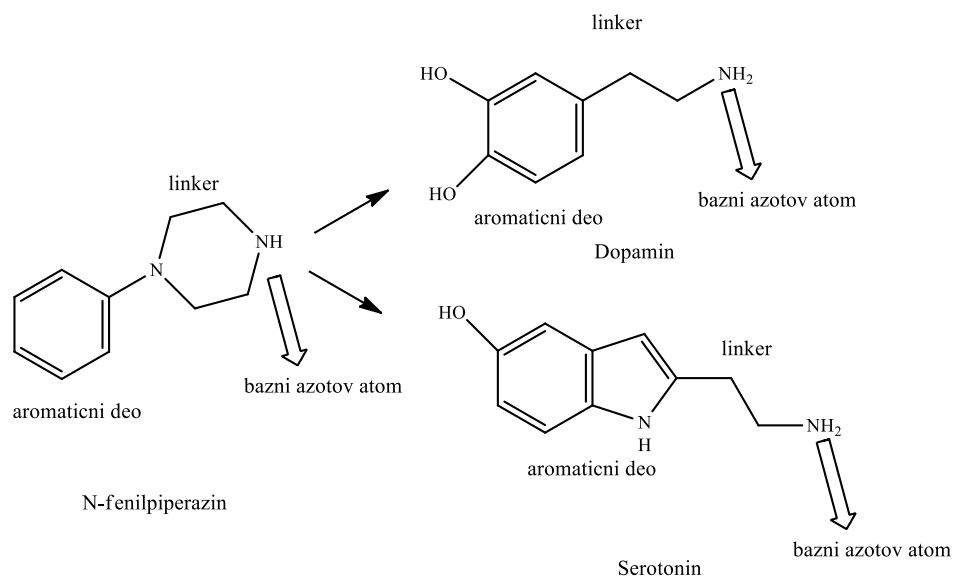
N-arilpiperazini predstavljaju jedan od najčešćih strukturnih motiva u medicinskoj hemiji. Razlog tome je što su prepoznati kao potencijalni lekovi za razna oboljenja poput neuroloških poremećaja⁴, neurodegenerativnih oboljenja⁵, kancera^{6,7}, malarije⁸, a takođe ispoljavaju i antialergijsko⁹ i antimikrobno dejstvo¹⁰. Pojedini podaci ukazuju na to da bisheterociklična jedinjenja poseduju bolju antimikrobnu aktivnost od heterocikličnih jedinjenja¹¹. Prednost korišćenja piperazina kao strukturnog motiva u sintezi lekova je i ta što se jednostavnim variranjem supstituenata na azotovim atomima u piperazinu, može poboljšati biološka aktivnost ispitivanih jedinjenja¹⁰. Ovo je jedan od razloga zbog čega se N-fenil piperazini i derivati, često koriste u sintezi liganada za dopaminske D2 receptore^{12,13,14}.

Ispitivanjem velikog broja dopaminskih liganada utvrđeno je da je neophodno prisustvo tri farmakoforna elementa u njihovoj strukturi da bi posedovali afinitet prema dopaminskim i/ili serotoninским receptorima.

1. Bazni azotov atom
2. Aromatični prsten

3. Most koji omogućava da se azotov atom nalazi na određenom rastojanju od prstena.

Strukturna sličnost N-arilpiperazinske farmakofore sa prirodnim neurotransmiterima dopaminom i serotoninom prikazana je na *Slici 1*.



Slika 1. Strukturna sličnost N-fenilpiperazinske farmakofore sa dopaminom i serotoninom

U daljem tekstu dat je pregled komercijalno dostupnih arilpiperazina, koji spadaju u grupu antipsihotika i antidepresiva, kao i onih koji spadaju u grupu potencijalnih antipsihotika, antidepresiva i lekova koji se koriste u lečenju Parkinsonove bolesti.

2.1. Antipsihotici, antidepresivi i lekovi za lečenje Parkinsonove bolesti

Poremećaji na nivou dopaminergičkog sistema, koji za posledicu imaju pojavu bolesti kao što su šizofrenija¹⁵ Parkinsonova bolest¹⁶, Turetov sindrom¹⁷ pokrenuli su veliko interesovanje za proučavanje ovih receptora.

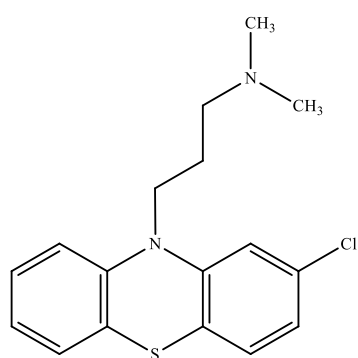
2.1.1. Antipsihotici

Hiperaktivnost dopaminergičkog sistema ima za posledicu pojavu šizofrenije i bipolarnog poremećaja i njihovo lečenje podrazumeva upotrebu antipsihotika. Uloga ovih lekova, na ćelijskom nivou, je blokada dopaminskih D2 receptora (antagonisti), ali se u terapiji često koriste i blokatori noradrenergičkih i serotonergičkih 5HT2 receptora. Umerena blokada dopaminskih D2 receptora (65-70%) poželjna je u lečenju psihoza, dok preterana blokada istih izaziva pojavu sporednih efekata poput ekstra piramidalnog sindroma (EPS)¹⁸.

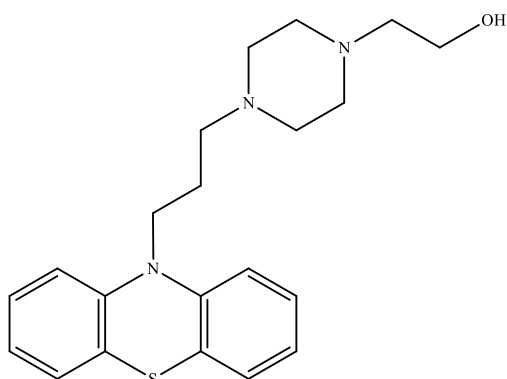
Šizofrenija je kompleksna i teška psihijatrijska bolest koja podrazumeva oštećenje emocionalnog sistema i sposobnost realnog rasuđivanja. Karakterišu je pozitivni, negativni i kognitivni (spoznajni) simptomi¹⁹, koji se u kliničkoj slici bolesti često prepliću. Pozitivni simptomi šizofrenije vezuju se za pojačanu dopaminergičku aktivnost i pojavu halucinacija. Negativne simptome karakteriše pojava apatije, emotivna tupost i ne postoji dopaminergička hiperaktivnost. Kognitivni ili spoznajni simptomi se manifestuju kao smetnje u učenju, pamćenju, apstraktnom mišljenju i javljaju se ranije nego ostali simptomi. Antipsihotici koji su trenutno na tržištu su efikasni u lečenju pozitivnih simptoma šizofrenije, ali ispoljavaju slabije dejstvo na negativne i kognitivne simptome ove bolesti.

Pedesetih godina prošlog veka pojavila se prva generacija antipsihotika čiji je glavni predstavnik hlorpromazin (tipični antipsihotik) koji je ušao u kliničku upotrebu. Strukture pojedinih tipičnih antipsihotika su prikazane na *Slici 2*. Međutim,

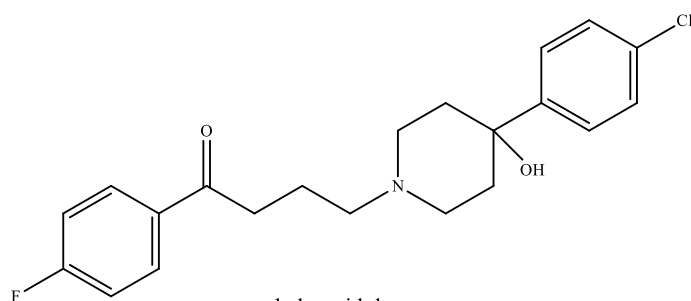
antipsihotike karakteriše pojava neželjenog ekstrapiramidalnog (EPS) sindroma koji uključuje parkinsonizam, distoniju (nekontrolisane mišićne kontrakcije) i akataziju (nevoljni pokreti ekstremiteta), a najteži oblik EPS-a je tardivna diskinezija (TD) (nekontrolisana mimika lica, nevoljni pokreti usana, jezika i ekstremiteta).



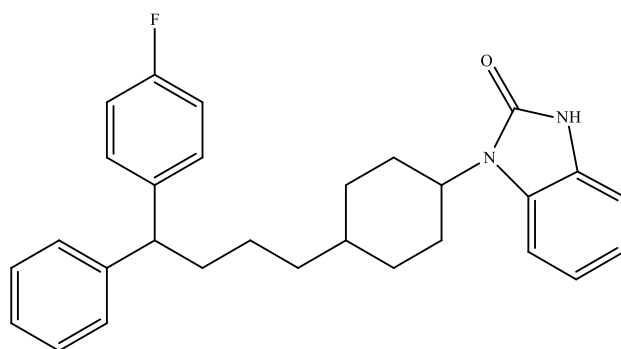
hlorpromazin



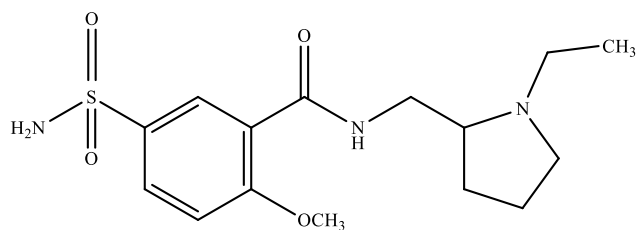
flupenazin



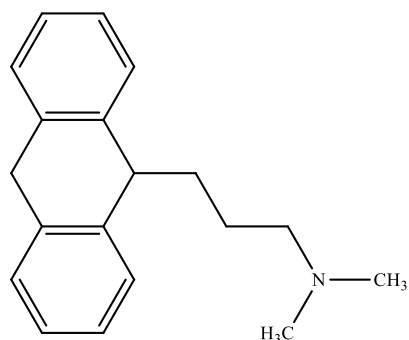
haloperidol



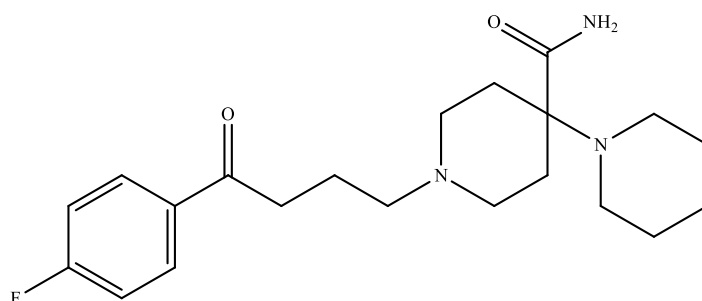
promazin



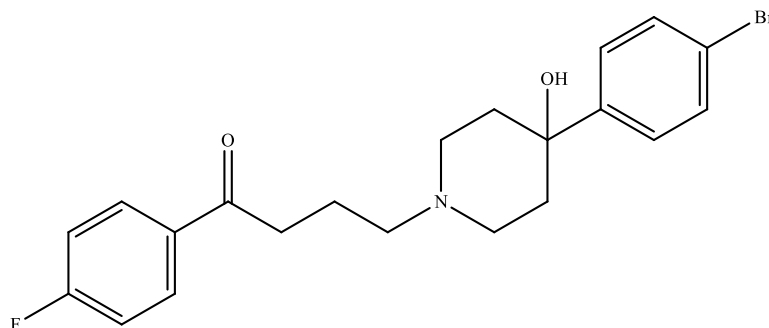
sulpirid



pimozid



pipamperon

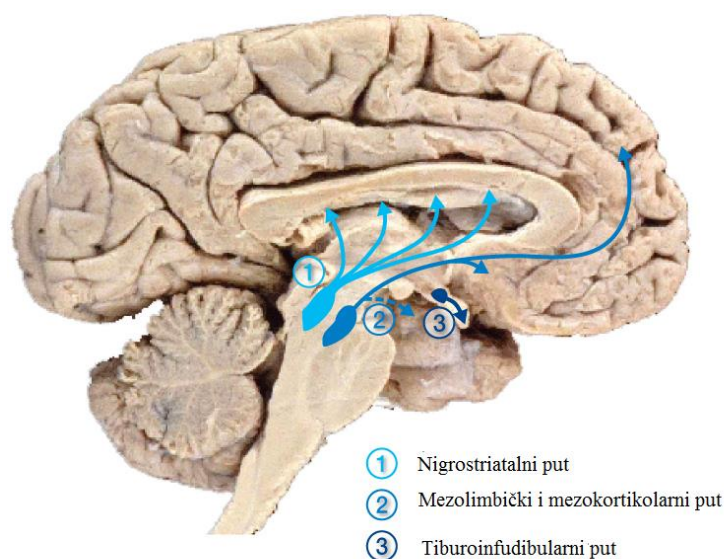


bromperidol

Slika 2. Strukture pojedinih tipičnih antipsihotika

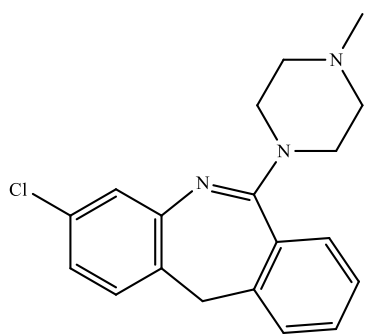
Tipični antipsihotici svoju efikasnost ka psihozama duguju činjenici da su sposobni da blokiraju dopaminske D2 receptore u mezolimbičkom dopaminskom putu koji je uključen u pojavu pozitivnih simptoma šizofrenije (**Slika 3**). Na taj način se umanjuje lokalna dopaminska hiperaktivnost koja je odgovorna za pojavu standardnih (pozitivnih) simptoma ove bolesti. Tipični antipsihotici ne ispoljavaju nikakav učinak na negativne simptome šizofrenije. Pošto blokada D2 receptora ovim lekovima nije

lokalizovana samo na mezolimbički dopaminski put, već i na preostala tri dopaminska puta u mozgu, dolazi do pojave sporednih štetnih efekata. Tako blokada D2 receptora u nigrostrijatalnom putu koji se nalazi u delu mozga koji je odgovoran za pokrete, dovodi do pojave EPS, dok blokada D2 receptora u tiburoinfudibularnom dopaminskom putu izaziva poremećaje u kontroli sekrecije prolaktina. Blokada D2 receptora u mezokortikolarnom dopaminskom putu dovodi do pojave negativnih i kognitivnih simptoma šizofrenije²⁰.

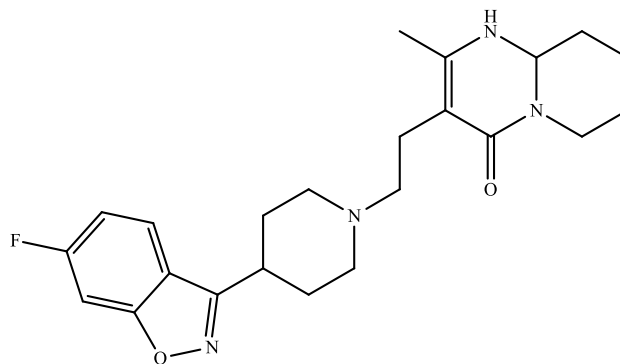


Slika 3. Dopaminski putevi u mozgu²¹

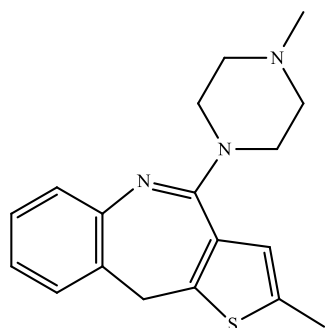
U skladu sa tim, javlja se potreba za kreiranjem novih lekova. Sedamdesetih godina dvadesetog veka na tržište se izbacuje druga generacija antipsihotika tzv. atipičnih antipsihotika. Glavni predstavnik ove grupe lekova je klozapin. Strukture pojedinih atipičnih antipsihotika prikazane su na *Slici 4*, a u *Tabeli 1* je dat njihov farmakološki profil. Klinička istraživanja pokazuju da ovi lekovi izazivaju manje sporednih motornih efekata u odnosu na tipične antipsihotike i da su efikasniji u tretmanu negativnih i kognitivnih simptoma šizofrenije. Zbog toga se atipični antipsihotici poslednjih nekoliko decenija dominantno koriste u terapiji šizofrenije.



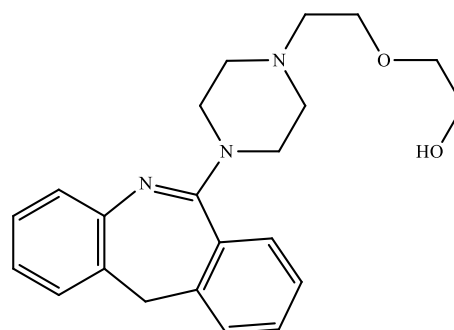
klozapin



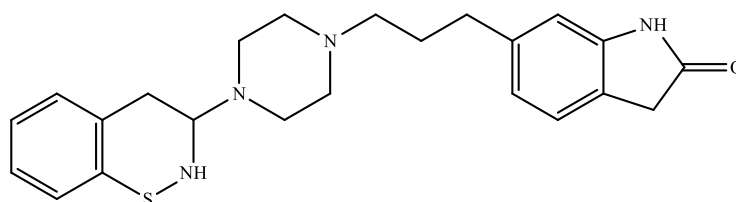
risperidon



olanzapin



kvetiapin



ziprasidon

Slika 4. Hemijske strukture pojedinih atipičnih antipsihotika

Tabela 1. Farmakološki profil pojedinih atipičnih antipsihotika

Antipsihotik	D2	5HT2a	5HT1a	Biološki odgovor
	Ki (nM)			
Klozapin	276	9,32	770	Antagonist D2 receptora
Risperidon	1,1	0,6	-	Antagonist D2 i 5HT2a receptora
Olanzapin	69	4,0	>1000	Antagonist D2 i 5HT1a receptora
Kvetiapin	155	135	>1000	Antagonist D2 i 5HT2a receptora
Ziprasidon	2,7	3	8,4	Antagonist D2 i 5HT2a receptora

Mehanizam dejstva atipičnih antipsihotika nije u potpunosti objašnjen, ali postoje dve hipoteze koje imaju najveći broj pristalica u naučnim krugovima, a kojima je moguće objasniti eksperimentalne podatke.

Serotoninsko-dopaminski model sugerira da se atipični antipsihotici mogu definisati kao antagonisti serotoninskih i dopaminskih receptora pošto blokiraju serotoninske 5HT2a receptore u većoj meri nego dopaminske D2 receptore. Po ovoj hipotezi atipični antipsihotici izazivaju manje sporednih efekata u odnosu na prvu generaciju antipsihotika, upravo zbog toga što su u stanju da blokiraju i 5HT2a receptore. Serotonin preko 5HT2a receptora, reguliše oslobađanje dopamina. Aktiviranjem 5HT2a receptora inhibira oslobađanje dopamina u mozgu i nivo ove kontrole se razlikuje u sva četiri dopaminska puta. Pošto, atipični antipsihotici blokiraju serotoninske 5HT2a receptore u dopaminskim putevima, oni prouzrokuju oslobađanje dopamina koji se veže za dopaminske D2 receptore. Kada je 5HT2a receptor blokiran u nigrostriatalnom putu, oslobađa se dopamin što može da prevaziđe blokadu D2 receptora atipičnim antipsihoticima, pa tada sporedni motorni efekti bivaju redukovani. S obzirom da u mezolimbičkom putu ima malo 5HT2a receptora, dominira blokada D2 receptora. U mezokortikolarnom putu, atipični antipsihotici se vezuju prevashodno, za

brojne 5HT2a receptore i na taj način oslobađaju dopamin, dok je udeo blokiranih D2 receptora mali^{22,23}. Oslobađanje dopamina u ovom putu doprinosi ublažavanju kognitivnih simptoma šizofrenije.

Dopaminska hipoteza polazi od toga da se svi antipsihotici vežu za D2 receptore, samo što to vezivanje kod atipičnih traje taman toliko da ispolje antipsihotičko dejstvo, ali nedovoljno dugo da izazovu sporedne efekte. Kod konvencionalnih antipsihotika ovo nije slučaj. Tipični antipsihotici se jače vežu za D2 receptor od atipičnih, pa je samim tim i vreme njihove disocijacije duže, što dovodi do pojave sporednih efekata poput EPS i tardivne diskinezije. Zbog brže disocijacije liganda sa receptora, lek napušta receptor pre uzimanja sledeće doze leka. Tada u organizmu prisutni dopamin zasićuje receptore u nigrostriatalnom putu, ali ne i u mezolimbickom dopaminskom putu, što dovodi do redukcije sporednih motornih efekata²³.

Razlike između prve i druge generacije antipsihotika su²⁴:

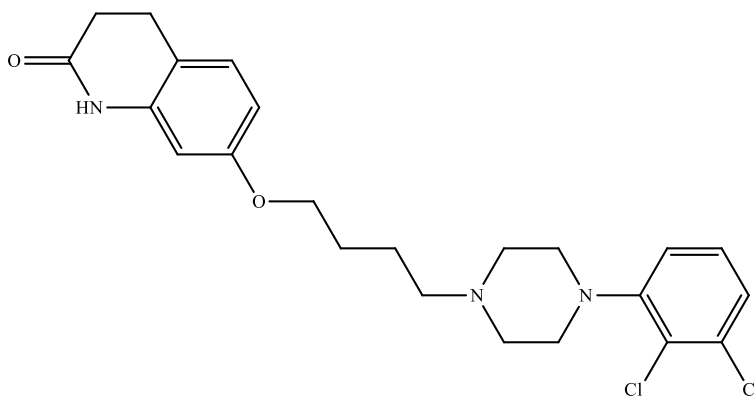
1. tipični antipsihotici deluju kao antagonisti dopaminergičkog sistema, dok atipični antipsihotici pored dopaminskih blokiraju i serotoninske receptore (antagonisti dopaminskog D2 receptora i serotoninskog 5HT2a receptora). Takođe, klozapin i ziprasidon koji spadaju u drugu generaciju antipsihotika predstavljaju parcijalne agoniste za serotoninske 5HT1a receptore^{25,26}, što znači da nije samo D2/5HT2a mehanizam uključen u lečenje šizofrenije.
2. Atipični antipsihotici jače blokiraju dopaminske receptore u mezokortikolimbickom delu mozga, koji je odgovoran za nastajanje šizofrenije, a u manjoj meri blokiraju dopaminske receptore u striatumu, koji su odgovorni za pojavu EPS-a.
3. Atipični antipsihotici deluju na negativne i kognitivne simptome šizofrenije što povećava terapijski efekat ovih lekova.

Iako ispoljavaju niz prednosti u odnosu na tipične antipsihotike, atipični antipsihotici izazivaju i neželjene efekte kod pacijenata, poput endokrinoloških, hematoloških, oftamoloških, metaboličkih i drugih poremećaja²⁷. To je dovoljan razlog da se i dalje traga za novim antipsihoticima kao što je aripiprazol (1).

Ovaj lek klasifikuje se kao treća generacija antipsihotika. Deluje kao parcijalni agonist, kako na dopaminske D2, tako i na serotoninske 5HT1a receptore²⁸, a agonističko dejstvo ispoljava na 5HT2a receptore²⁹. Smatra se ligandom koji ima dvojne,

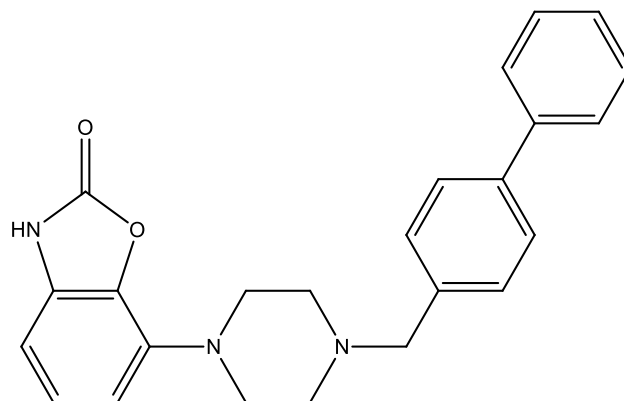
agonističke i antagonističke osobine. Sa kliničkog stanovišta ovakvi lekovi mogu da umanje stimulaciju receptora kada su prisutne velike količine endogenog liganda (u ovom slučaju dopamina i serotonina), ili da izazovu željenu stimulaciju receptora ukoliko su prisutne male količine endogenog liganda. Zahvaljujući ovoj osobini aripiprazol deluje na pozitivne, negativne i kognitivne simptome šizofrenije²⁸.

Novija istraživanja vezana za bolesti CNS sistema ukazuju na to da su serotoninski 5HT7 receptori uključeni u mehanizam lečenja negativnih i kognitivnih simptoma šizofrenije i pretpostavlja se da potencijalni antipsihotici nove generacije treba da deluju kao agonisti na ovu klasu receptora^{30,31}.



1

Bifeprunoks (**2**) je po svojim farmakološkim osobinama sličan aripiprazolu, ali je njegovo testiranje prekinuto 2009. godine u trećoj fazi kliničkog ispitivanja zbog male efikasnosti i neželjenih propratnih efekata^{32,33}. Konstante vezivanja aripiprazola i bifeprunoksa za dopaminske D2 i serotoninske 5HT receptore su date u **Tabeli 2**^{32,34}.

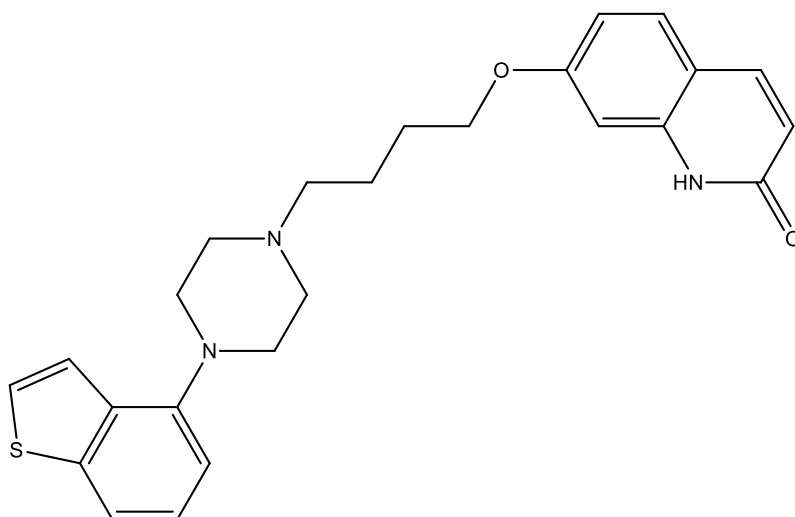


2

Tabela 2. Konstante vezivanja (Ki) aripiprazola i bifeprunoksa za D2, 5HT1a i 5HT2a receptore

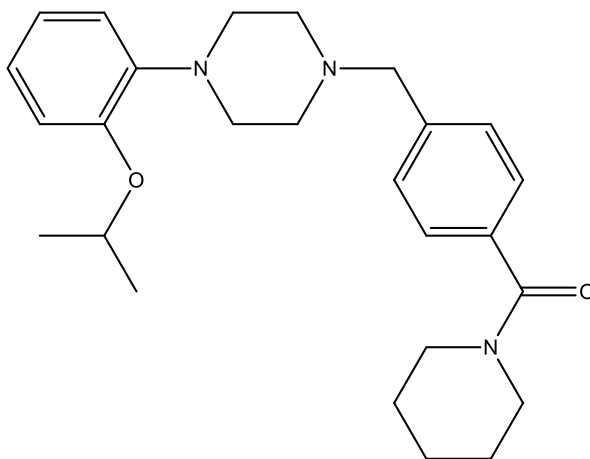
Antipsihotik	D2	5HT1a	5HT2a	5HT6	5HT7
	Ki (nM)				
Aripiprazol	1,8	10,3	9,6	90	26,2
Bifeprunoks	2,2	9,3	-	-	-

Brekspiprazol [OPC 34712] (**3**) je novi atipični antipsihotik odobren od strane FDA u julu 2015. godine³⁵, za lečenje šizofrenije. Kao potencijalni antidepresiv nalazi se u trećoj fazi kliničkog ispitivanja³⁶. Druga faza testiranja ovog liganda kao potencijalnog leka za lečenje poremećaja pažnje usled hiperaktivnosti (ADHD) je završena. Spada u grupu parcijalnih agonista dopaminskog D2 (0,35nM) i serotoniniskog 5HT1a (0,09 nM) receptora, dok je antagonist 5HT2a receptora (3,8 nM)^{37,38}.



3

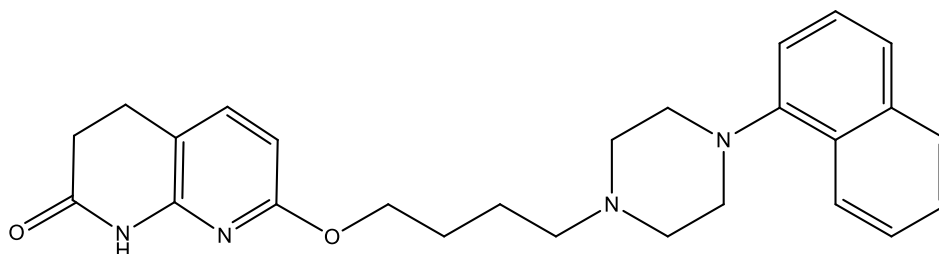
Mazapertin (**4**) je antipsihotik razvijen od strane kompanije Johnson & Johnson, ali je njegovo kliničko testiranje prekinuto. Ispoljava antagonističko delovanje na D2 receptorima ($K_i=2,2$ nM) i agonističko na 5HT1a receptorima ($K_i=1,7$ nM)³².



4

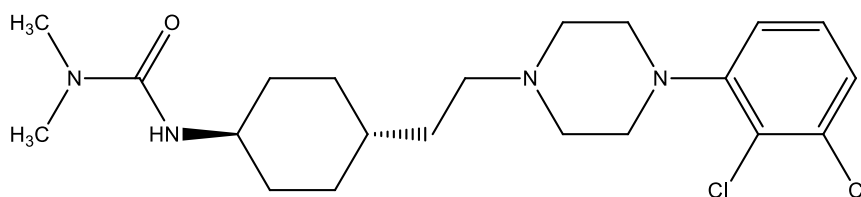
PF-00217830 (**5**) je sintetisan po ugledu na aripiprazol, ali za razliku od njega, PF-00217830 je nešto jači parcijalni agonist za D2 ($K_i=0.8$ nM), 5HT1a ($K_i=3,7$ nM) i antagonist za 5HT2a (0,14 nM) receptore. U prekliničkim testovima je pokazao bolje antipsihotičke osobine od aripiprazola, ne indukuje pojavu katalapsije, a u minimalnim

efektivnim dozama (MED) ne izaziva pojavu EPS sindroma. U februaru 2008. godine je ušao u drugu fazu kliničkog ispitivanja, ali je u septembru 2010. godine istraživanje prekinuto³².



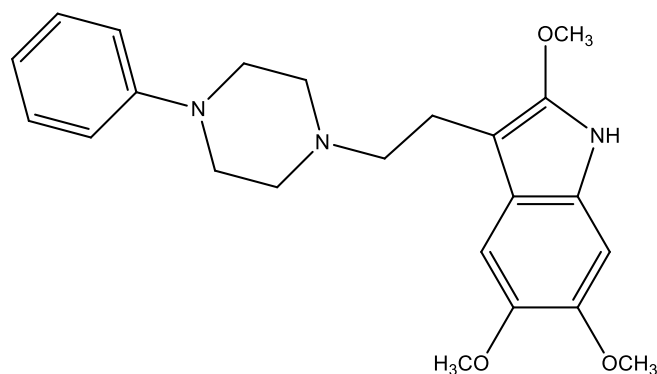
5

Kariprazim (**6**) spada u grupu antipsihotika koji deluju kao parcijalni agonisti na dopaminske D2, D3 i serotoninске 5HT1a receptore³⁹. Razvijen je od strane mađarske farmaceutske kompanije Gideon Rihter⁴⁰. Jedan je od novijih lekova odobrenih za upotrebu od strane FDA (17.09.2015)⁴¹, dok je kao potencijalni antidepresiv prošao drugu fazu kliničkog ispitivanja⁴².



6

Oksipertin (**7**) spada u grupu lekova koji se koriste u lečenju simptoma šizofrenije i depresije.

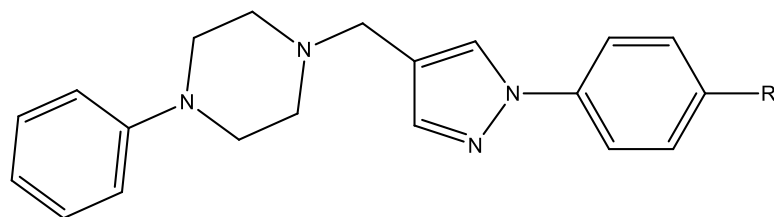


7

2.1.1.1. Arilpiperazinski derivati kao potencijalni antipsihotici

Ligandi koji poseduju mešovitu dopaminergičko/serotonergičku aktivnost su u fokusu istraživanja, kako zbog benefita koji imaju na sva tri simptoma šizofrenije, tako i zbog redukovanih neželjenih efekata u odnosu na prve dve generacije antipsihotika.

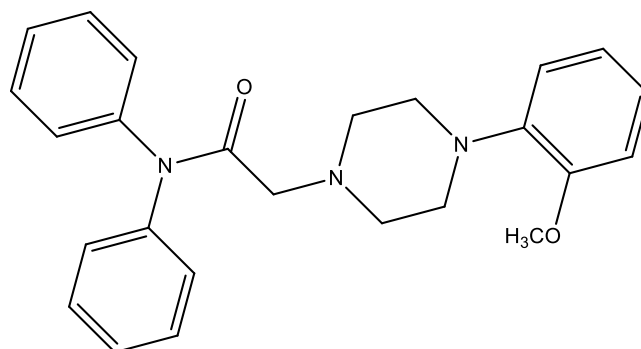
Istraživačka grupa iz Brazila je tragajući za potencijalnim ligandom koji bi posedovao svojstva slična aripiprazolu (**1**) i bifeprunoksu (**2**) sintetisala jedinjenje LASSBio-579 **8**, koje predstavlja tzv. "lead" jedinjenje. Ovakva jedinjenja pokazuju odgovarajuću biološku aktivnost, ali je neophodna dalja modifikacija strukture u cilju optimizacije aktivnosti, selektivnosti, fizičkih i hemijskih osobina itd. U konkretnom slučaju jedinjenje **8** je imalo ograničenu bioraspoloživost (procenat primenjene doze leka koji u neizmenjenom obliku dospeva u krvotok). Modifikacijom biarilnog dela liganda **8**, ovaj problem je prevaziđen, dobijeno je jedinjenje **9** koje poseduje visok afinitet ka D2 (70 nM) i 5HT1a (60 nM) receptorima, a znatno niži prema 5HT2a receptorima. Oba liganda su uključena u *in vivo* ispitivanja na životinjama i pokazali su se kao mogući kandidati za lečenje pozitivnih simptoma šizofrenije⁴³.



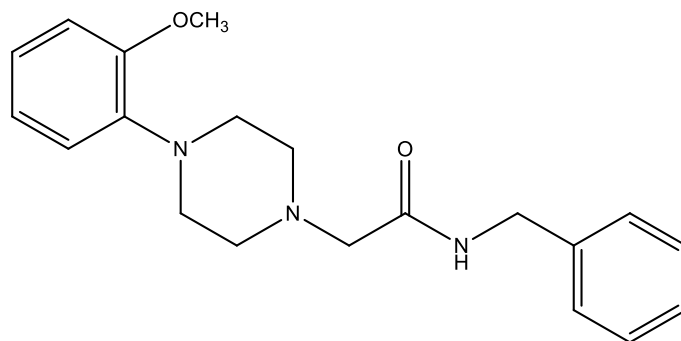
8: R= Cl

9: R= F

U pojedinim istraživanjima su arilpiperazinski ligandi dugog niza (LCAP) prepoznati kao strukturni motiv koji ima velikog udela u vezivanju za dopaminske i serotoninске receptore⁴⁴. Kod njih je arilpiperazinski deo, preko alkil niza vezan za amid ili imid⁴⁵. Vođeni ovim rezultatima indijska istraživačka grupa sintetisala je serije arilpiperazina dugog niza koji su podvrgnuti preliminarnim *in vivo* testovima za određivanje antipsihotičkih osobina liganda. Iz ove serije jedinjenja izdvojili su se jedinjenje **10**, koje je pokazalo veliku sličnost sa standardnim antipsihoticima, posebno sa risperidonom⁴⁶ i jedinjenje **11**⁴⁵.

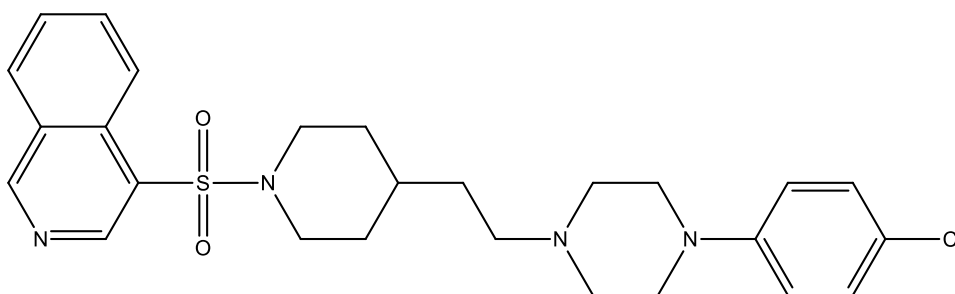


10



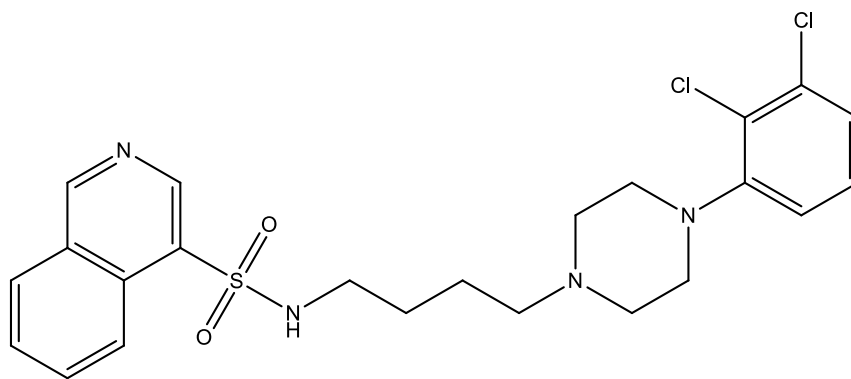
11

Pawel Zajdel i saradnici su 2012. godine sintetisali jedinjenje **12**. Ono poseduje mešovitu dopaminergičko-serotonergičku aktivnost, a u *in vivo* testovima je ispoljilo antipsihotička, antidepresivna i anksiolitička svojstva⁴⁷.



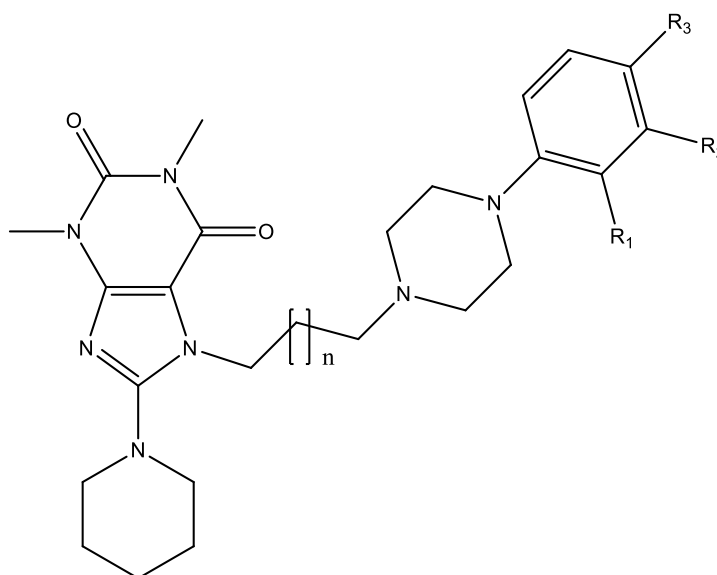
12

U nastavku ispitivanja veze između strukture i biološke aktivnosti liganda, Zajdel i saradnici su sintetisali seriju hinolinskih i izohinolinskih analoga aripiprazola. Iz cele serije, kao potencijalni antipsihotik i antidepresiv izdvojilo se jedinjenje **13** sa visokim afinitetom za D2 receptore $K_i=8$ nM, dok je on nešto niži za serotoninske receptore i iznosi $K_i=59$ nM za 5HT_{1a}, $K_i=90$ nM za 5HT_{2a} i $K_i=21$ nM za 5HT₇³⁴.



13

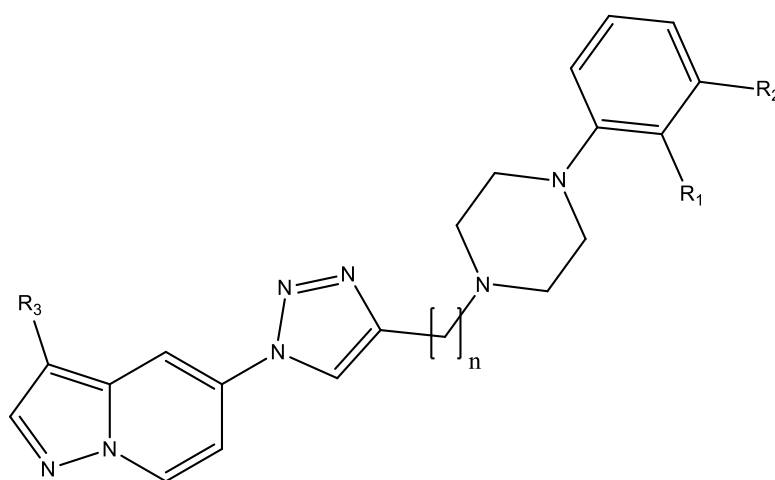
Ista istraživačka grupa sintetisala je seriju arilpiperazinskih derivata dugog niza 8-aminopurin-2,6-diona. Većina jedinjenja je pokazala mešovitu dopaminergičko-serotonergičku aktivnost. *U in vivo* testovima su se kao potencijalni antipsihotici izdvojila dva jedinjenja **14** i **15**. Jedinjenje **14** je agonist D2 ($K_i=5\pm 1$ nM) i 5HT2a ($K_i=36\pm 4$ nM) receptora, dok je **15** parcijalni agonist D2 ($K_i=3\pm 1$ nM) i 5HT1a ($K_i=8\pm 1$ nM) receptora i antagonist 5HT2a ($K_i=47\pm 6$ nM) receptora⁴⁸.



14: $n=2$, $R_1=H$, $R_2=Cl$, $R_3=Cl$

15: $n=3$, $R_1=OCH_3$, $R_2=H$, $R_3=H$

Möller i saradnici su sintetisali seriju 1,4-disupstituisanih arilpiperazina sa različitom dužinom linkera između heterocikličnog (glave) i arilpiperazinskog dela molekula (repa). U svom radu su koristili CoMFA analizu koja im je pomogla da predvide biološke aktivnosti sintetisanih liganada. Jedinjenja **16**, **17** i **18** pokazuju visok afinitet vezivanja za humane D2 (hD2₁ i hD2_s), 5HT2a receptore i 5HT1a receptore izolovane iz mozga svinje (p5HT1a), što ih svrstava u red potencijalnih antipsihotika. Konstante vezivanja ovih liganada za pojedine klase dopaminskih i serotoninskih receptora date su u *Tabeli 3*⁴⁹.



16: n=2, R₁=Cl, R₂=Cl, R₃=H

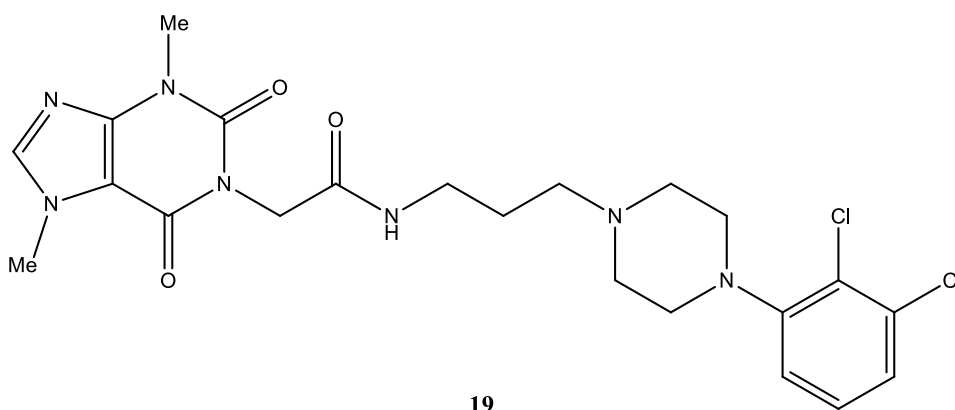
17: n=3, R₁=Cl, R₂=Cl, R₃=H

18: n=4, R₁=Cl, R₂=Cl, R₃=H

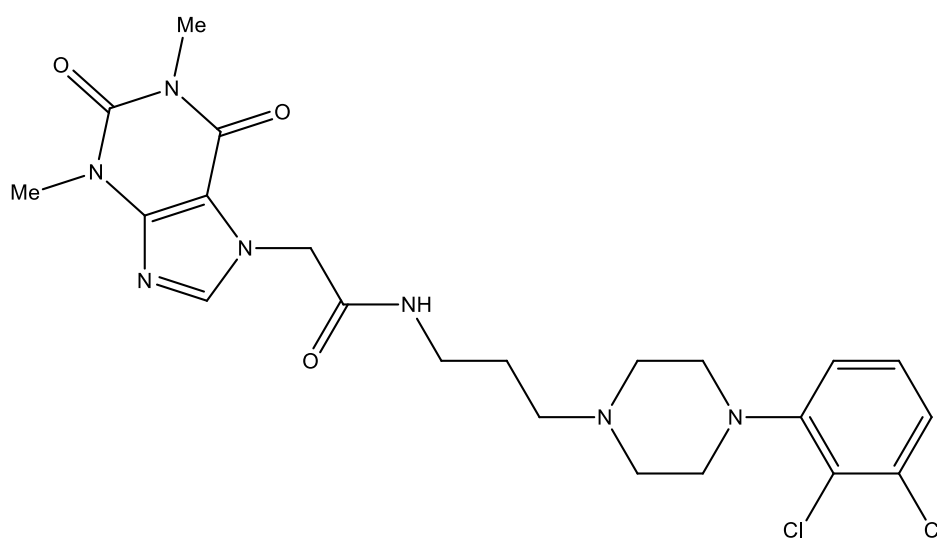
Tabela 3. Konstante vezivanja (K_i) jedinjenja 16,17 i 18 za pojedine klase receptora

Ligand	hD2 ₁	hD2 _s	p5HT1a	h5HT2a
	K _i (nM)			
16	22	10	0,99	7,1
17	130	54	20	5,3
18	23	7,3	3,3	0,64

Poljski istraživači, na čelu sa Zajdel-om, su sintetisali seriju od 15 *N*-(arilpiperazinilalkil)acetamidnih derivata 1,3- i 3,7-dimetil-1*H*-purin-2,6(3*H*,7*H*)-diona i ispitali njihov farmakološki profil. Iz cele serije izdvojila su se jedinjenja **19** i **20**. Pokazuju visok afinitet vezivanja za D2 i 5HT6 receptore, poput aripipazola (**1**), što ih svrstava u grupu potencijalnih antipsihotika, ali su neophodna dalja *in vivo* testiranja ovih liganada⁵⁰.



19



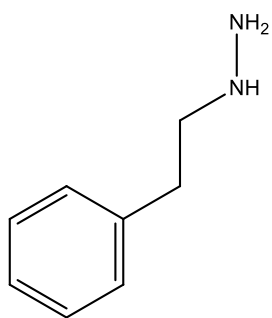
20

2.1.2. Antidepresivi

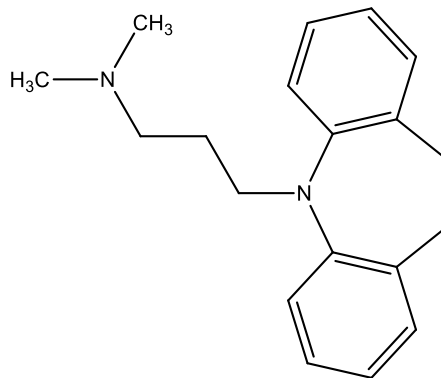
Depresija, manija i anksioznost su poremećaji na nivou CNS, koji se javljaju prilikom promena nastalih u neurotransmisiji serotonina, dopamina i norepinefrina⁵¹.

Depresija spada u tzv. unipolarne afektivne poremećaje, dok se pod bipolarnim afektivnim oboljenjem podrazumeva oblik kod kojeg se ispoljavaju i depresija i manija. Depresivno raspoloženje karakteriše povlačenje bolesnika u sebe, nesanica, gubitak apetita, pesimizam, usporeni misaoni tok, osećaj beznada i bespomoćnosti. Svake godine, nažalost, sve veći broj ljudi u svetu oboleva od ovog psihičkog poremećaja, pa se u skladu sa tim u velikim farmaceutskim kompanijama izdvajaju znatna novčana sredstva za sintezu i testiranje jedinjenja koji bi se mogli pokazati kao potencijalni lekovi u lečenju simptoma depresije tzv. antidepresiva.

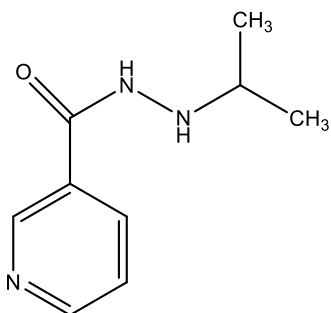
Prva generacija antidepresiva koja je bila primenjena u kliničkoj praksi su bili neselektivni inhibitori monoaminoooksidaze (MAO), ali i antagonisti 5HT_{1a} receptora. MAO oksidaza je enzim koji započinje oksidativnu deaminaciju kateholamina (serotonina, dopamina i noradrenalina). Lociran je na spoljašnjoj membrani mitohondrija eukariotskih ćelija. Postoje dva tipa enzima, MAO A i MAO B, koji se razlikuju, između ostalog i prema afinitetu ka supstratu. MAO A razgrađuje norepinefrin i serotonin, dok MAO B ima veći afinitet ka dopaminu⁵². Antidepresivi koji pripadaju prvoj generaciji (imipramin, amitriptilin itd.) su ispoljavali niz neželjenih sporednih efekata, od kojih su neki bili i fatalni po pacijente, pa su kao takvi izbačeni iz upotrebe. Na *Slici 5* prikazane su hemijske strukture antidepresiva prve generacije.



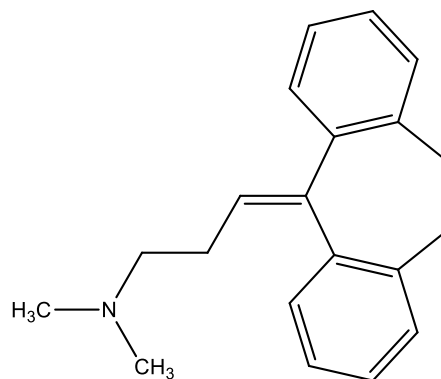
fenzin



imipramin



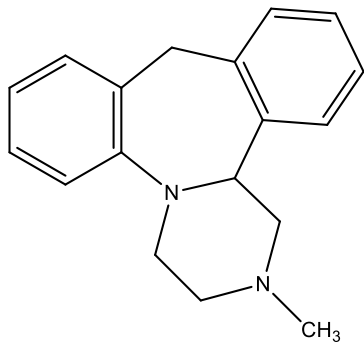
iproniazid



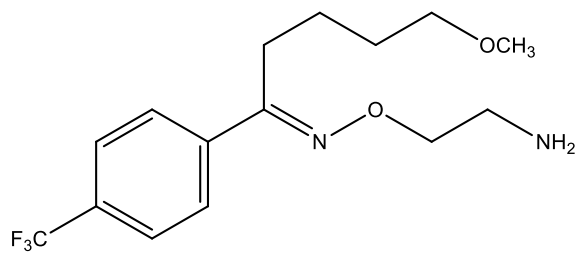
amitriptilin

Slika 5. Hemijske strukture pojedinih antidepresiva prve generacije

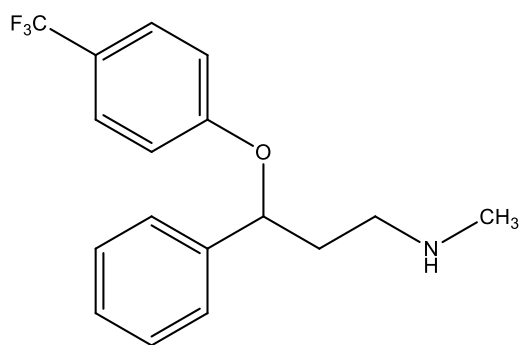
Drugoj generaciji antidepresiva pripadaju lekovi iz grupe selektivnih inhibitora preuzimanja serotonina i iz grupe selektivnih inhibitora MAO A. Ušli su u upotrebu osamdesetih godina XX veka. Ispoljavali su niz neželjenih sporednih efekata, ali u manjoj meri nego prva generacija. Hemijske strukture pojedinih antidepresiva druge generacije dat je na **Slici 6**.



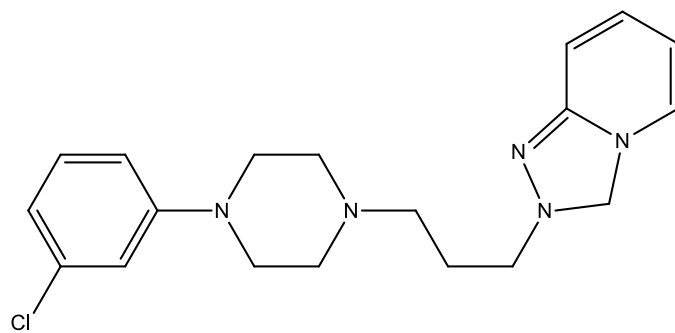
mianserin



fluvoksamin



fluoksetin

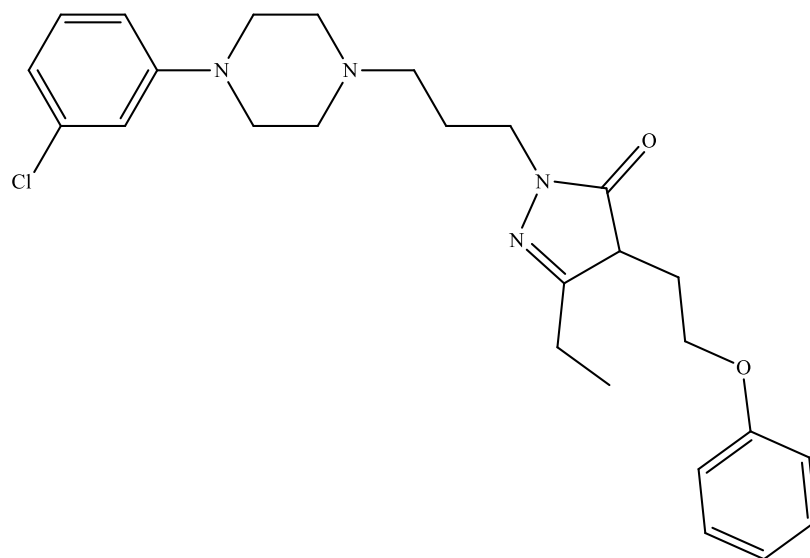


trazadon

Slika 6. Hemijska struktura antidepresiva druge generacije

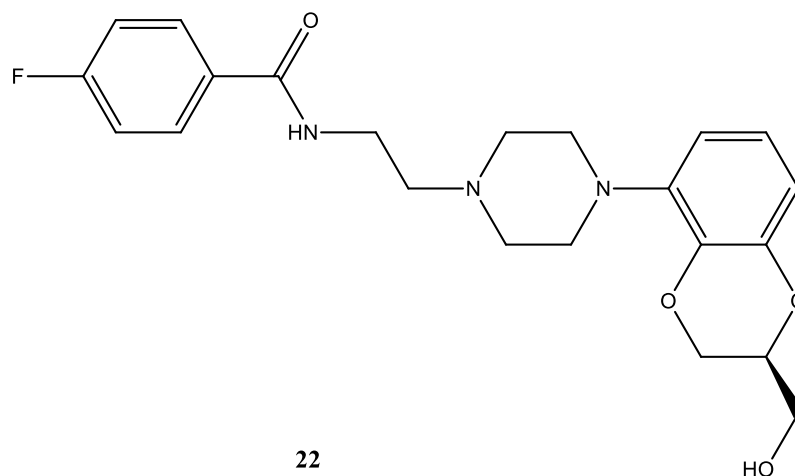
Trazadon pripada drugoj generaciji antidepresiva, a po hemijskoj strukturi pripada grupi arilpiperazina.

Nefazodon (**21**) je odobren za lečenje depresije 1994, ali je devet godina kasnije povučen sa tržišta zbog oštećenja jetre koje je izazivao kod pacijenata^{53,54}.



21

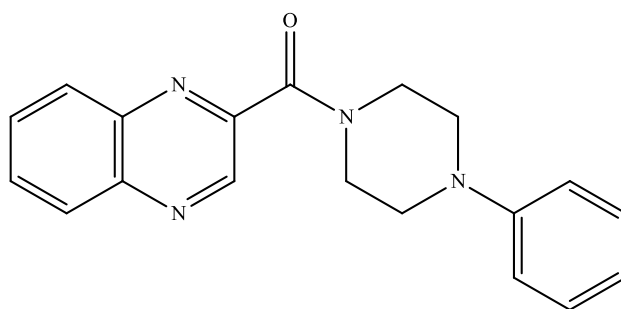
Flesinoksan (**22**) je potencijalni antidepresiv koji po hemijskoj strukturi spada u grupu heteroaril-piperazina. Agonist je 5HT1a receptora ($K_i=1,7 \text{ nM}$)⁵⁵ i rezultati prvih kliničkih ispitivanja su pokazali da su sporedni efekti koje ispoljava prihvatljivi, ali su ipak odlukom menadžmenta farmaceutske kuće klinička istraživanja ovog leka prekinuta⁵⁶.



22

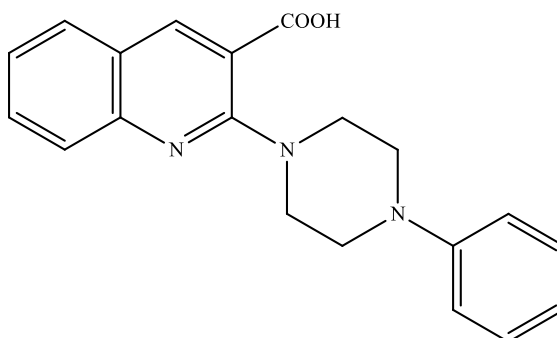
2.1.2.1. Arilpiperazinski derivati kao potencijalni antidepresivi

Jedinjenje **23** je na osnovu dobijenih rezultata u *in vitro* i *in vivo* testovima prepoznato kao potencijalni antidepresiv od strane indijske istraživačke grupe na čelu sa Mahesh-om⁵⁷.



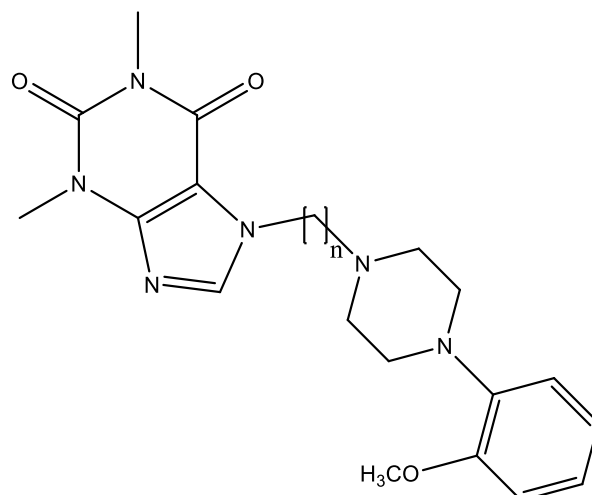
23

Ista istraživačka grupa je sintetisala i ispitala antidepresivna svojstva jedinjenja **24** i ono se takođe, pokazalo kao potencijalni antidepresiv⁵⁸.



24

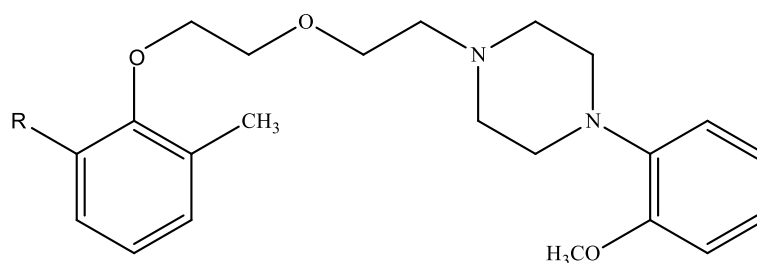
Partyka je sa saradnicima sintetisala seriju derivata 7-fenilpiperazinilalkil-1,3-dimetil-purin-2,6-diona iz koje su se kao potencijalni antidepresivi izdvojila jedinjenja **25** i **26**⁵⁹.



25: n=4

26: n=5

Ista istraživačka grupa je sintetisala jedinjenja HBK 14 (**27**) i HBK 15 (**28**), koje je na osnovu *in vitro* i *in vivo* testova okarakterisala kao potencijalne antidepresive. *In vitro* testovima je ustanovljeno da su oba jedinjenja antagonisti 5HT1a i 5HT7 receptora⁶⁰.

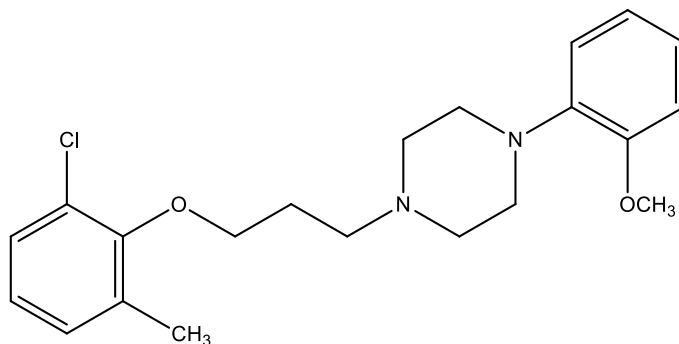


27: R= Cl

28: R= CH₃

Kubacka je sa saradnicima odredila farmakološki profil prethodno sintetisane serije 1-[(fenoksi)alkil]-4-(2-metoksifenil)piperazinskih derivata i na osnovu dobijenih rezultata odabrane su supstance koje su ispitane u *in vivo* testovima. Kao potencijalni antidepresiv izdvojilo se jedinjenje **29**. Okarakterisano je kao parcijalni agonist za

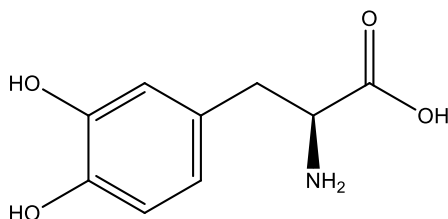
5HT1a ($K_i = 0,5 \text{ nM}$), antagonist za 5HT2a ($138,5 \text{ nM}$) receptore, a pokazuje i visok afinitet ka 5HT7 ($K_i = 34 \text{ nM}$) receptorima ⁶¹.



29

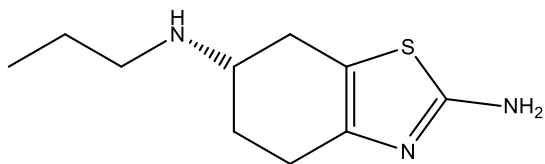
2.1.3. Arilpiperazinski derivati kao potencijalni lekovi za lečenje Parkinsonove bolesti

Parkinsonova bolest (PD) je dobila naziv po Londonskom lekaru Džejsmu Parkinsonu koji je prvi opisao njene simptome u svojoj monografiji, krajem 19. veka. Bolest karakterišu tremor (drhtanje), rigiditet (ukočenost) i bradikinezija (nevoljni pokreti). Primarni uzrok njenog nastanka je progresivna degeneracija dopaminergičkih neurona u *pars compacta substantiae nigrae* delu mozga. Obzirom da etiologija bolesti nije dovoljno poznata, pretpostavlja se da na razvoj PD takođe utiču oksidativni stres i bolesti mitohondrija. Ovaj proces je spor i počinje godinama pre nego što prvi simptomi bolesti budu vidljivi. L-dopa (**30**) je jedan od najzastupljenijih lekova za lečenje PD, ali dugoročno korišćenje dovodi do progresivnog razvoja diskinezije (nevoljni pokreti)⁶².

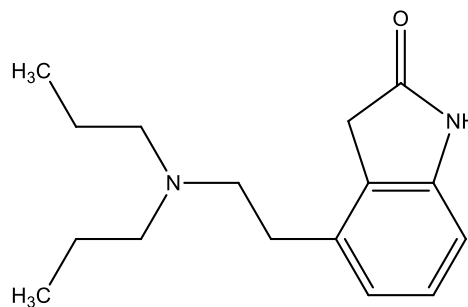


30

Dopaminski D2 antagonisti

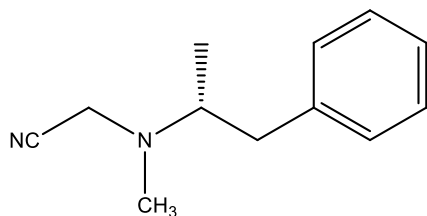


pramipeksol

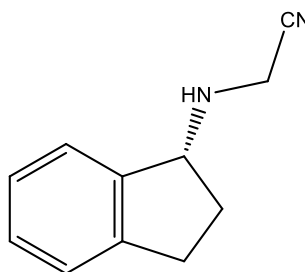


ropinirol

Inhibitori MAO-B

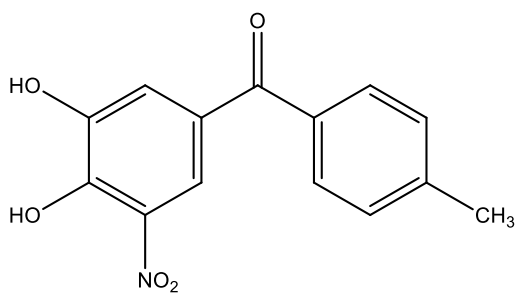


selegilin

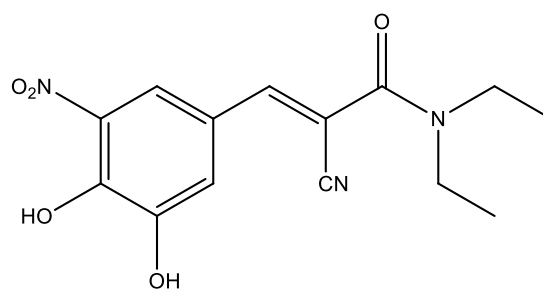


rasagilin

Inhibitori katehol-O -metil transferaze



tolkopon

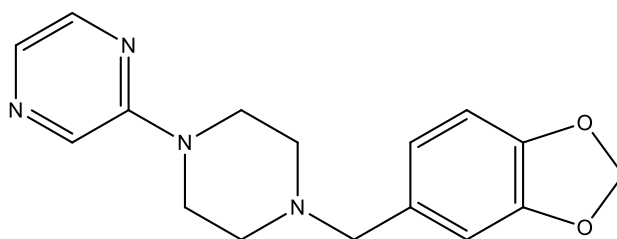


entakopon

Slika 7. Hemijske strukture lekova koji se koriste u lečenju Parkinsonove bolesti.

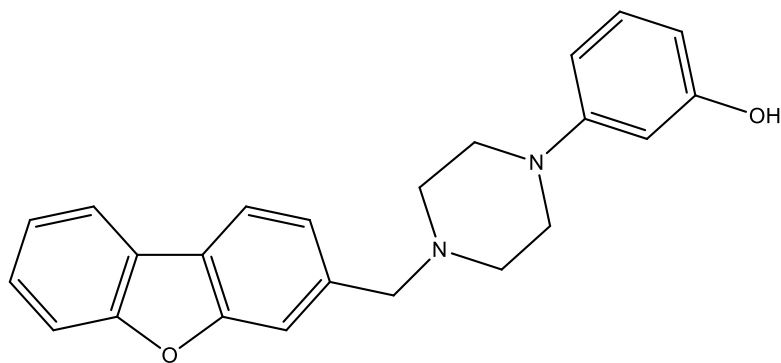
Pored korišćenja L-dope (**30**) kao prekursora dopamina u organizmu, trenutno se lečenje PD sprovodi korišćenjem agonista D2 receptora kao i inhibitora monoamin oksidaze B i katehol-O metil transferaze. Hemijska struktura lekova koji se koriste u lečenju PD data je na *Slici 7*. Ovakvom terapijom se leče samo simptomi bolesti, ali ne i uzrok. Neophodno je da pored agonističkog dejstva na D2 receptore ligandi koji su potencijalni lekovi poseduju i neuroprotektivno dejstvo kako bi se sprečilo propadanje dopaminergičkih neurona. Novija istraživanja ukazuju da stimulacija serotoninskih 5HT1a receptora pomaže u lečenju PD i da je ključan faktor za razvoj nove generacije lekova. Očekuje se da bi ovi lekovi smanjili pojavu sporednih efekata poput diskinezije, a verovatno bi i smanjili pojavu depresije i anksioznosti, kojima su skloni oboleli od PD³².

Piribedil (**31**) je komercijalno dostupan lek koji se koristi u lečenju simptoma Parkinsonove bolesti. Lek je parcijalni agonist dopaminskih D2 (pKi=6,9 nM) i D3 (pKi= 6,6 nM) receptora, a agonist 5HT1a receptora (pKi=6,4 nM)⁶³.



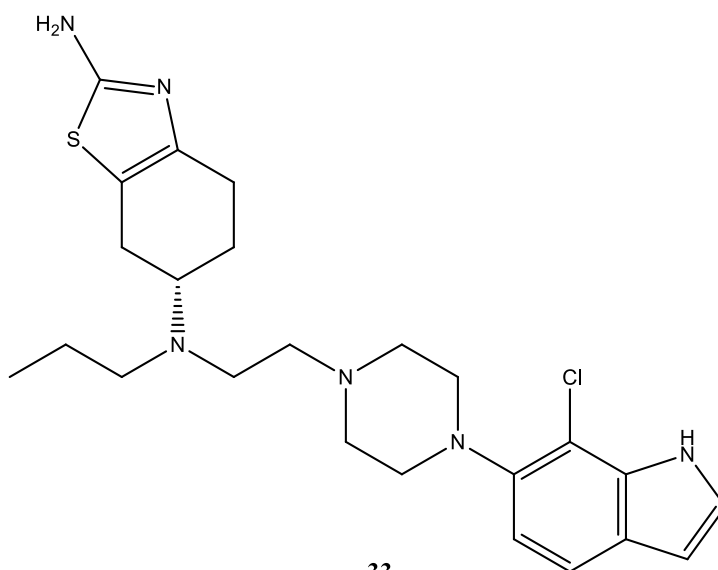
31

Holdings je sa saradnicima sintetisao i ispitao seriju piperazina, piperidina i tetrahidropiridina kao potencijalnih lekova za PD iz koje se na osnovu rezultata dobijenih u *in vitro* i *in vivo* testovima izdvaja jedinjenje **32**⁶⁴.



32

Jedinjenje **33** je agonist D2 ($K_i=16,4\pm 2,8$ nM) i D3 ($K_i=1,15\pm 0,19$ nM) receptora i u *in vitro* testovima ispoljava neuroprotektivno dejstvo u slučaju tretiranja ćelijske linije PC12 neurotoksinom 6OHDA. U *in vivo* testovima se pokazao kao potencijalni lek za PD⁶⁵.



33

2.2. Modelovanje D2 receptora

2.2.1. Značaj modelovanja i proces homologog modelovanja

Poznavanje trodimenzionalne strukture proteina je veoma bitan faktor u proučavanju mehanizma dejstva receptora sa drugim molekulima. Trodimenzionalnu

strukturu proteina je moguće odrediti kristalografskom analizom. Podaci o do sada odredjenim 3D strukturama proteina dostupne su preko Protein Data Bank (PDB) baze podataka. Do 29.08.2016. godine ova baza je sadržavala 121.953 (krajem 2008. godine ovaj broj je iznosio 54559) kristalnih struktura proteina i DNK.

Medjutim, nije uvek moguće odrediti 3D strukturu proteina kada je kristalna struktura nedostupna, pa je tada neophodno pribеći modelovanju receptora.

Postoje dva pristupa modelovanju GPCR receptora: homologo i indirektno modelovanje.

Za homologo modelovanje neophodno je da postoji visok stepen homologije između proteina koji se modeluje i proteina koji služi kao matrica (pripadaju istoj klasi receptora), a čija je 3D struktura određena putem kristalografske analize. Ova metoda se bazira na pretpostavci da će homologni delovi primarne strukture formirati istovetne motive sekundarne strukture, a u zavisnosti od stepena homologije između matrice i modela, zauzimaće i slične položaje u tercijarnoj strukturi

Proces homologog modelovanja proteina nepoznate strukture i proteina čiju primarnu strukturu imamo, se sastoji iz nekoliko koraka⁶⁶:

- Određuje se homologija primarne strukture nepoznatog proteina i proteina čiju strukturu imamo (matrica): sekvenca proteina nepoznate trodimenzionalne strukture, unosi se kao upit i vrši se pretraživanje baze podataka proteina čija je trodimenzionalna struktura poznata. Rezultat upita je stepen sličnosti u primarnoj strukturi ovih proteina. U tu svrhu se koriste računarski programi poput FASTA⁶⁷ i BLAST⁶⁸. Što je stepen sličnosti u primarnoj strukturi proteina veći, to je modelovanje preciznije. Odabrani homolog ili homolozi poznate trodimenzionalne strukture se koriste kao matrice za razvoj nepoznate 3D strukture proteina.

Koraci u modelovanju nepoznate 3D strukture su sledeći:

- Vrši se poravnavanje primarne strukture nepoznatog proteina i matrice: ovaj korak podrazumeva da se dve ili više sekvenci poravnaju trudeći se da što više amino kiselina (A.K.) iz jedne sekvence poklapa po svom položaju sa istim ili srodnim A.K. iz druge sekvence. Za određivanje kvaliteta poravnanja koriste se 20x20 matrice u kojima je

brojem vrednovana mogućnost da se jedna A.K. u sekvenci nađe na mestu gde se nalazi druga A.K. u sekvencama koje se koriste kao matrice.

- Identifikovanje evoluciono očuvanih (SCR, *Structure Conserved Region*) i strukturno varijabilnih (SVR, *Structure Variable Region*) regiona: nakon što su poznate strukture poravnate, one se ispituju kako bi se pronašli regioni sa evoluciono očuvanim domenima i modeluje se struktura proteina u tim zonama. SCR zone je teže identifikovati uz pomoć samo jedne matrice. Ove zone se nalaze uglavnom na mestima u proteinu gde je definisana sekundarna struktura α -heliksa ili β -nabrana struktura. α -Heliksi ili β -nabrana struktura teže da u celoj familiji proteina zauzimaju iste ili slične relativne pozicije. S druge strane SVR se obično nalaze na površini proteina i grade intracelularne i ekstracelularne petlje. Modelovanje SVR je veći problem od modelovanja SCR, jer se radi o petljama nedefinisane strukture u kojima dolazi do brojnih umetanja ili brisanja A.K. ostataka koji dodatno komplikuju već složen posao modelovanja. Postoji nekoliko poznatih metoda za generisanje petlji⁶⁹. Svi SVR su uglavnom daleko od optimalne geometrije, pa se njihova struktura optimizuje minimalizacijom energije, da bi se izbegle sterne smetnje i relaksirale konformacije petlji.

- Generisanje koordinata za SCR proteina nepoznate prostorne strukture na osnovu poznate 3D strukture: kada se utvrdi sličnost između referentnog i modelovanog proteina moguće je dodeliti koordinate za SCR. Za ovo dodeljivanje koordinata se kao polazne tačke koriste koordinate proteina poznate strukture. U segmentima sa identičnom strukturom prenose se sve koordinate aminokiselina, dok se u delovima koji se razlikuju prenose samo koordinate osnovnog lanca.

- Generisanje konformacija bočnih ostataka: ovaj korak je složeniji od prethodnog koji podrazumeva generisanje osnovnog lanca proteina, jer bočni lanci imaju jedan ili više stepena slobode i u prostoru mogu zauzimati velik broj energetski dopuštenih konformacija. Pri generisanju konformacije bočnih ostataka, polazi se od pretpostavke da u homologim modelima identični ostaci zauzimaju slične konformacije. Kada je bočni lanac aminokiseline u proteinu duži od bočnog niza u matrici, neophodno ga je postaviti u konformaciju koja onemogućuje nepovoljne interakcije sa susednim bočnim ostacima. Postoji više metoda za predviđanje konformacije i koordinata bočnih ostataka

u modelu, pri čemu je neophodno koordinate osnovnog lanca proteina držati nepromjenjenim. Bez obzira na to koji metod modelovanja proteina primenimo, potrebno je prečistiti dobijenu strukturu, kako bi se uklonile sterne smetnje. Da bi se uklonile sve sterne smetnje potrebno je na modelu identifikovati bočne ostatke sa nepovoljnim Van Der Valsovim interakcijama. U ovoj fazi je neophodno model podvrgnuti energetskej minimalizaciji i molekulskej dinamici uz pažljivo postavljena ograničenja koja će sačuvati strukturu modela.

- Optimizacija modela: kod proteina dobijenih homologim modelovanjem, potrebno je dodatno optimizovati geometriju molekula, da bi atomi postavljeni na kristalne koordinate matrice podesili svoj položaj na neke nove energetske povoljnije položaje koji su bliži njihovim nativnim stanjima. U tu svrhu se koriste algoritmi za minimalizaciju energije. Kada je model proteina napravljen upotrebom homologog modelovanja i njegova geometrija optimizovana, važno je proveriti njegov kvalitet i pouzdanost. Kvalitet 3D strukture modelovanog proteina najviše zavisi od tačnosti kristalne strukture matrice, ali na njega utiču i stereohemijska tačnost modela, kvalitet pakovanja aminokiselinskih ostataka unutar proteina, kao i pouzdanost prostornog savijanja. Svi ovi parametri se proveravaju određenim računarskim tehnikama, poput Ramachadranovog dijagrama.

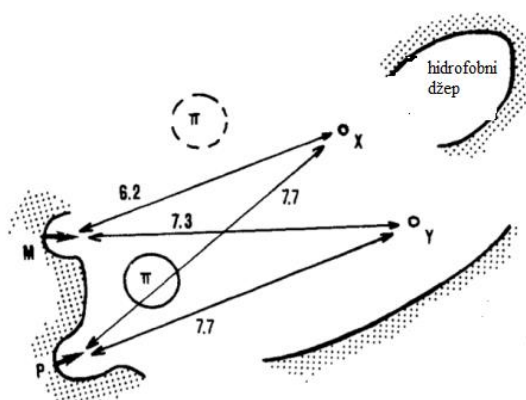
Indirektno modelovanje se koristi kada nema polazne matrice, pa se mesto vezivanja receptora procenjuje na osnovu različitog afiniteta liganada prema receptoru i ovaj način modelovanja koristi se kada u bazi podataka nemamo odgovarajuću homologu strukturu.

2.2.2. Hronologija modelovanja D2 receptora

Jedan od prvih modela mesta vezivanja dopamina u dopaminskom D2 receptoru predložili su Sheppard i Burghardt. Model su formirali proučavajući vezu između strukture i aktivnosti raznih agonista D2 receptora. Prvi su ukazali na važnost udaljenosti *m*-OH grupe i azota kod dopaminskih agonista, kao i na prisustvo

hidrofobnog dela receptora koji intereaguje sa 2-fenil i N-alkil derivatima kateholske funkcije⁷⁰.

Analizirajući strukture velikog broja analoga dopamina Grol je sa saradnicima dao predlog topografije mesta vezivanja dopaminskih receptora (*Slika 8*)⁷¹. Došli su do zaključka da je pretpostavljeno mesto vezivanja OH grupe najbitniji faktor u vezivanju aromatičnog jezgra.

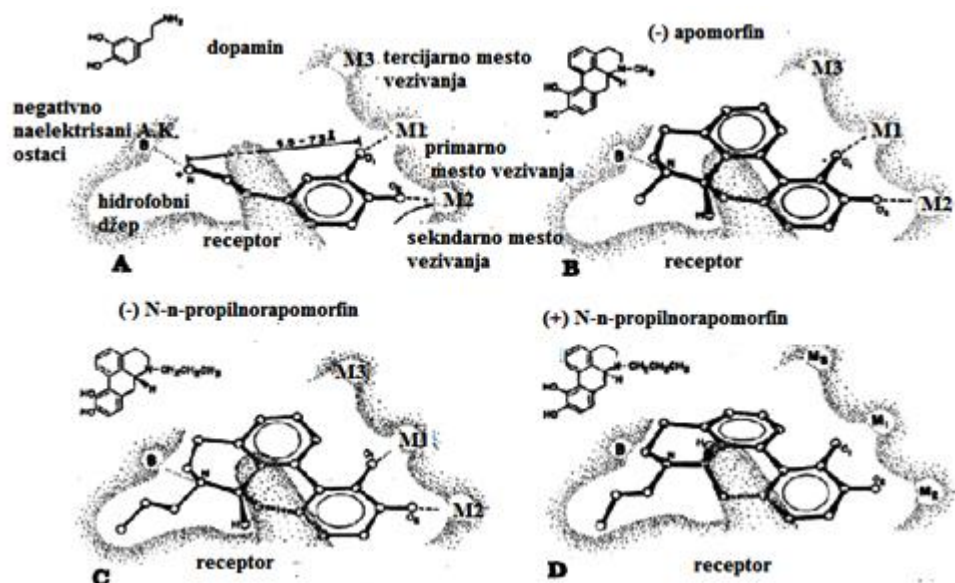


Slika 8. Grolov model mesta vezivanja D2 receptora⁷¹

Phillip Seeman je početkom osamdesetih godina prošlog veka, uporedio strukture velikog broja agonista D2 receptora sa njihovom aktivnošću i na osnovu dobijenih rezultata opisao osobine koje ligand mora da poseduje kako bi bio potencijalni agonist za ovu klasu receptora:

1. U Seeman-ovom modelu D2 receptora, agonist mora da poseduje hidroksilnu grupu (ili neku drugu grupu koja može da nagradi vodoničnu vezu) koja po položaju odgovara *meta* OH grupi u dopaminu.
2. Poželjno je, ali nije neophodno, da poseduje i drugu hidroksilnu grupu, koja po položaju odgovara *para* OH grupi u dopaminu.
3. Neophodno je da protonovani atom azota bude udaljen oko 0,6 Å od ravni aromatičnog prstena i oko 7,3 Å od grupe koja gradi vodoničnu vezu.
4. Veličina i oblik molekula utiču na vezivanje za D2 receptore⁷².

Neumeyer i saradnici su analizirali veći broj apomorfinskih derivata i pretpostavili su da je udaljenost od 6,5-7,3 Å između protonovanog azota i fenolne grupe značajna karakteristika D2 agonista. Zaključili su i da u mestu vezivanja kateholska funkcija reaguje sa bočnim ostacima amino kiselina, a protonovani azot sa negativno naelektrisanim aminokiselinskim ostacima na površini receptora (*Slika 9*)⁷³.



Slika 9. Interakcija DA agonista sa dopaminskim receptorima po Neumeyer⁷³

Novi pravac u modelovanju D2 receptora pojavio se 90-tih godina prošlog veka, kada je Henderson sa saradnicima publikovao prvu 3D strukturu bakteriorodopsina⁷⁴. Ovo je prvi protein sa sedam transmembranskih domena (hidrofobni domeni sa oko 20-25 aminokiselinskih ostataka, koje grade transmembranske α -helikse, povezanih preko intracelularnih i ekstracelularnih petlji) kojem je određena kristalna struktura.

Nakon ovog otkrića Dahl i saradnici su konstruisali model dopaminskog D2 receptora postavljajući sledeće hipoteze⁷⁵:

1. Transmembranski domeni dopaminskog D2 receptora su α -heliksi. Ova tvrdnja oslanja se na rezultate ranijih istraživanja. Naime, izračunavanje hidrofobnosti polipeptida ukazuje na postojanje sedam transmembranskih heliksa (poznata karakteristika GPCR)⁷⁶. S obzirom da cela familija GPCR proteina, pa i D2

receptor deli homološke sličnosti sa bakteriorodopsinom, može se pretpostaviti da je i D2 receptor izgrađen od sedam transmembranskih α -heliksa.

2. Svaki transmembranski α -heliks se sastoji od 27 amino kiselina.
3. Transmembranski segmenti GPCR familije su slični po aminokiselinskom sastavu.
4. Najpolarniji delovi polipeptidnog niza transmembranskog domena čine aktivni centar receptora.
5. Proteini koji pripadaju GPCR familiji imaju zajedničko mesto vezivanja liganda.

Svi naredni modeli dopaminskog D2 receptora se baziraju na ovim pretpostavkama koje su podložne manjim ili većim izmenama. Na *Slici 10* je prikazano sedam transmembranskih heliksa. Bočni ostaci A.K. ključnih za vezivanje liganda u D2 receptoru su dati u unutrašnjosti receptora.



Slika 10. 3D model D2 receptora po Dahlu i saradnicima⁷⁵

Grupa Marte Teeter je većinu istraživačkog rada posvetila modelovanju dopaminskih receptora. Najviše uspeha su imali u formiranju 3D strukture D2 receptora⁷⁷. Njihov model se bazirao na strukturi bakteriorodopsina. Trudili su se da naprave idealne helikse, pa su pored mapiranja primarne sekvence A.K. dopaminskog D2 receptora na kristalnu strukturu bakteriorodopsina, koristili i indeks hidrofobnosti pojedinih A.K. kako bi ih orijentisali prema unutrašnjosti ili spoljašnjosti heliksa. U procesu modelovanja korišćeni su samo A.K. ostaci za koje se pretpostavilo da grade 7 transmembranskih heliksa. Kako tada nisu postojale informacije o ekstracelularnim i intracelularnim petljama njih su uklonili iz modela. Zatim su koristeći indeks hidrofobnosti i orijentaciju A.K. u heliksima dobili dijagram hidrofobnih i hidrofилnih interakcija koje se javljaju među heliksima. Dobijene rezultate su uporedili sa interakcijama prisutnim na bakteriorodopsinu i na taj način odredili moguć prostorni raspored heliksa u D2 receptoru. Sledeći korak u formiranju 3D modela je bio da se na dobijeni raspored heliksa dopaminskog receptora mapiraju evolutivno očuvane A.K. prisutne u bakteriorodopsinu, polazeći od pretpostavke da njihovi bočni ostaci moraju zauzimati isto mesto u oba receptora. Dodavanjem i drugih A.K. oko evolutivno očuvanih ostataka formirali su pojedinačne helikse.

Prema autorima, agonisti se vezuju za ovaj model normalno u odnosu na ravan membrane i formiraju vodonične veze sa bočnim ostacima Ser 141 (5.43) i Ser 144 (5.46). Istovremeno se formira i soni most sa Asp86 (3.32). Pored ovih A.K. mesto vezivanja ligand-receptor definisano je i prisustvom sledećih amino kiselina: Phe 82 (3.28), Cys 90 (3.36), Trp 115 (4.50), Ser 118 (4.53), Ser 122 (4.57), Phe 145 (5.47), Trp 182 (6.48), Phe 185 (6.51), Phe 186 (6.52).

Za razliku od agonista, antagonisti se u aktivnom mestu receptora vezuju paralelno u odnosu na ravan membrane. Ovom prilikom pored vodoničnih veza sa Ser 194 (5.43) i Ser 197 (5.46) i sonog mosta sa Asp 86 (3.32), ligandi ostvaruju i π - π interakcije sa aromatičnim bočnim ostacima Phe 145 (5.47) i Phe 186 (6.52).

Ovaj model je nekoliko puta modifikovan u skladu sa dobijenim eksperimentalnim podacima i drugim predloženim modelima D2 receptora. Jednu od modifikacija ovog modela uradila je i istraživačka grupa na čelu sa Šoškićem i saradnicima⁷⁸, kada je sintetisala i uradila biološku karakterizaciju dve serije jedinjenja:

1-benzil-arilpiperazina i 1-(2-feniletil)-arilpiperazina. Doking analiza ovih jedinjenja rađena je na modelu receptora koji je predložila grupa Marte Teeter. Rezultati doking analize su pokazali da pored amino kiselinskih ostataka koje definišu mesto vezivanja u modelu Marte Teeter, ligandi mogu da nagrađe i aromatične edge-to face interakcije sa aminokiselinskim ostacima Phe 178 (6.44), Trp 182 (6.48) i Tyr 216 (7.58). Prostor ograničen ovim aminokiselinskim ostacima je evoluciono očuvan u nekim klasama G kuplovanih proteina.

Javitch je sa saradnicima eksperimentalno potvrdio da se navedene A.K. nalaze u aktivnom mestu vezivanja^{79, 80,81}. Oni su dali jedan od najdetaljnijih modela mesta vezivanja dopaminskih D2 receptora i u tu svrhu su koristili afinitetno obeležavanje, mutaciju jedne amino kiseline (point mutation) i substituted-cysteine accessibility method (SCAM) za određivanje A.K. koje grade vezivno mesto receptora. Najveći doprinos od gore pomenutih ima SCAM metoda. Sastoji se iz nekoliko koraka. U prvom koraku, bočni ostatak koji se ispituje se mutira u cistein. Drugi korak je provera dobijene mutirane strukture. Ukoliko je afinitet vezivanja liganda za mutiranu strukturu sličan afinitetu vezivanja za nemutirani receptor, znači da uvođenje mutacije nije narušilo terciarnu strukturu proteina. Treći korak podrazumeva dodavanje specifičnog reagensa, metantiosulfonata, koji je po svojoj veličini sličan molekulu dopamina. Ovaj molekul reaguje sa sulfidnim grupama cisteina u mestu vezivanja dopaminskog D2 receptora. Neće reagovati sa sulfidnim grupama koje se nalaze u lipidnom dvosloju membrane, jer je za odigravanje reakcije neophodno prisustvo vode. Nakon što metantiosulfonat izreaguje sa sulfidnim grupama u mestu vezivanja, određuje se opet afinitet vezivanja liganda za receptor. Smanjen afinitet vezivanja liganda za receptor ukazuje na prisustvo mutiranog ostatka u vezivnom mestu, pošto je prisustvo metantiosulfonata u vezivnom mestu onemogućilo vezivanje liganda.

Prema Javitchev-om modelu aminokiselinski ostaci sa svih transmembranskih heliksa, osim transmembranskog heliksa I, učestvuju u formiranju mesta vezivanja dopaminskog D2 receptora. Vezivanje liganda počinje formiranjem sonog mosta sa Asp 86 (3.32), zatim od značaja su i vodonične veze koje ligandi nagrađuju sa Ser 141 (5.43) i Ser 144 (5.46). Hidrofobni džep grade Phe 185 (6.51), Phe 186 (6.52) i Trp 182 (6.48).

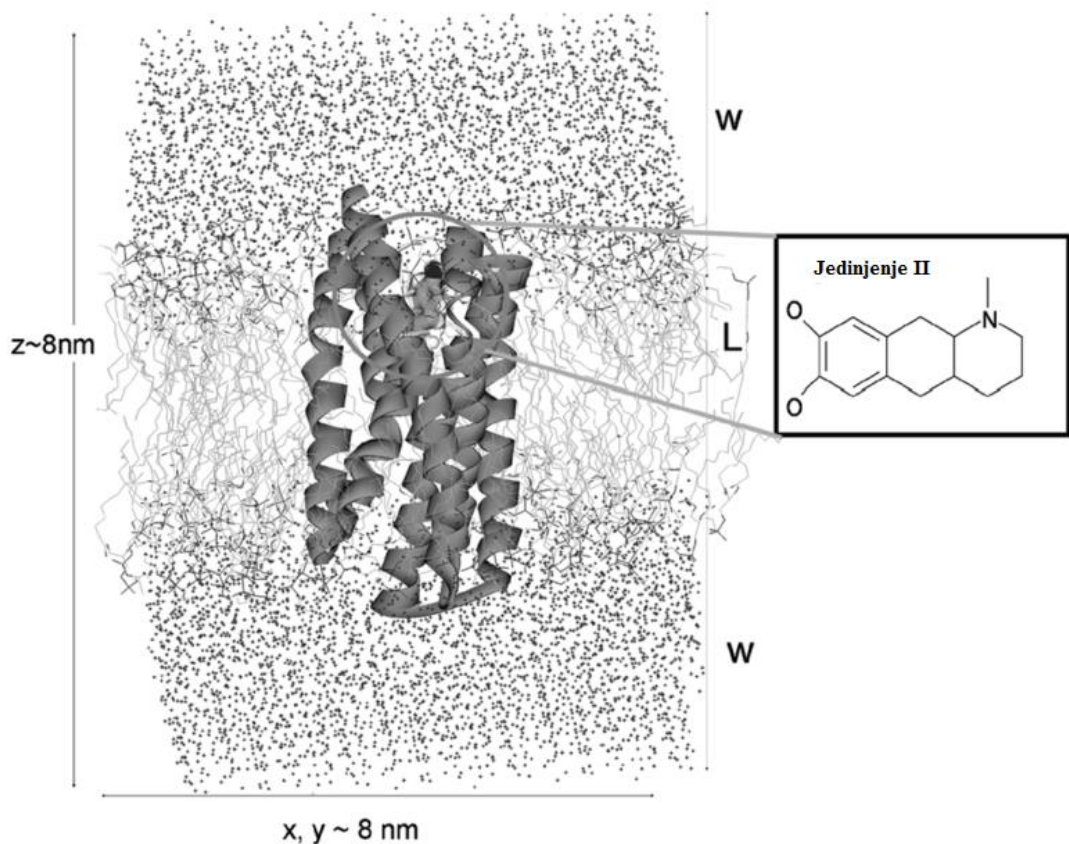
Sledeći značajan korak u modelovanju GPCR dogodio se kada je Palczewski sa saradnicima uspešno izolovao i odredio kristalnu strukturu goveđeg rodopsina⁸².

Nakon što je Ballesteros sa saradnicima utvrdio da je sličnost između aminokiselinskih sekvenci i transmembranskih domena goveđeg rodopsina i humanog D2 veća nego između bakteriorodopsina i humanog D2 receptora, njegova istraživačka grupa publikuje prvi model D2 receptora sa rodopsinom kao novom matricom za homologo modelovanje D2 receptora⁸³. Isto tako, A.K. koje ulaze u sastav aktivnog mesta rodopsina su prepoznate i u humanom D2 receptoru, kao A.K. koje čine aktivno mesto receptora. Po ovom modelu Asp 114 (3.32) gradi soni most sa protonovanim azotom, Ser 193 (5.42), Ser 194 (5.43), Ser 197 (5.46) reaguju sa *m* i *p*-OH grupom kateholamina, dok aromatični ostaci Phe 204 (5.47), Trp 386 (6.48), Phe 389 (6.51) i Phe 390 (6.52) formiraju klaster koji interaguje sa aromatičnim delom molekula. Ballesteros je uočio i važnu ulogu sekundarne ekstracelularne petlje u funkcionisanju GPCR.

Nekoliko godina kasnije Hanson je sa saradnicima uspeo da odredi kristalnu strukturu β 2-adrenergičkog receptora⁸⁴, a neposredno nakon toga je ista grupa odredila kristalnu strukturu adenozienskog A2A receptora⁸⁵.

Wang je sa saradnicima iskoristio oba ova proteina kao template za homologo modelovanje dopaminskih D2 receptora⁸⁶. Kako bi validirali napravljeni model receptora (*Slika 11*), Wang i saradnici su uradili doking za nekoliko derivata tetralina. Rezultati dokinga su pokazali da je bočni ostatak Asp 72 (3.32) zaslužan za formiranje vodonične veze sa ligandima, a pored ove u formiranju aktivnog mesta vezivanja učestvuju još četiri A.K.: Val 73 (3.33), Cys 76 (3.36), Leu 183 (7.34) i Phe 187 (7.38), jer one ostvaruju nepolarne interakcije sa ligandom.

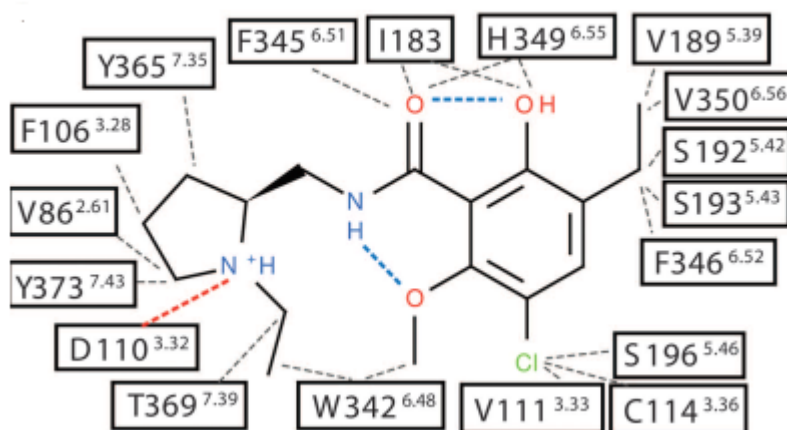
Istraživačka grupa na čelu sa Loza-om⁸⁷, razvila je model dopaminskog D2 receptora koristeći kristalnu strukturu humanog β 2-adrenergičkog receptora kao matricu za homologo modelovanje. Na predloženom modelu je urađen doking derivata butirofenona i pokazalo se da je neophodno da ligand ostvari interakciju sa Asp 114 (3.32) i sa najmanje jednim bočnim ostatkom Ser koji se nalaze u TM 5 [Ser 193 (5.42), Ser 194 (5.43), Ser 197 (5.46)].



Slika 11. Model D2 receptora prema Wang-u i saradnicima⁸⁶ W-voda, L-lipidni dvosloj

Veoma bitan, ako ne i najbitniji momenat u modelovanju dopaminskog D2 receptora je publikovanje kristalne strukture dopaminskog D3 receptora od strane Chien-a i saradnika⁸⁸. Da bi uspešno došli do kristalne strukture dopaminskog D3 receptora Chien i saradnici su modifikovali termalni kraj receptora i veći deo treće citoplazmatične petlje (icl3), kako bi povećali njegovu termičku stabilnost. Receptor je kristalisan u kompleksu sa dopaminskim antagonistom etiklopidom. Dopaminski D3 receptor se sastoji od sedam transmembranskih heliksa, što je i pretpostavljeno dotadašnjim modelima DA receptora. Deo šupljine dopaminskog D3 receptora je blokiran zbog preplitanja heliksa V i VI, pa je prilaz aktivnom mestu vezivanja kontrolisan od strane TM I, II, III, VII i druge ekstracelularne petlje (ecl2). Mesto vezivanja ovog receptora sastoji se od ecl2/ecl1 kao i heliksa I, II, III, V i VII. Etiklopid u mestu vezivanja ostvaruje ukupno 18 interakcija sa dopaminskim D3

receptorom, što je i prikazano na *Slici 6*. Atom azota u pirolidinskom prstenu formira soni most sa Asn 114 (3.32). Pored ove interakcije aromatični prsten u etiklopridu ostvaruje interakcije sa hidrofobnim džepom koji čine Phe 345 (6.51), Phe 346 (6.52), Val 189 (5.39), Ser 192 (5.42), Ser 193 (5.43), Val 111 (3.33) i Ile 183 u ekstracelularnoj petlji 2 (ecl2). Od ukupno 18 interakcija koje ligand ostvaruje sa D3 receptorom, njih sedamnaest je identično interakcijama koje ostvaruje etikloprid sa D2 receptorom (Val 350 je Ile u D2 receptoru). Na *Slici 12* je takođe prikazan soni most (označen crvenom bojom), vodonične veze (označene plavom bojom) i hidrofobne interakcije (označene sivom bojom). Rezultati doking analize dužih i voluminoznijih molekula od etikloprida na D3 i D2 receptorima pokazali su da ovi molekuli ostvaruju i dodatne interakcije sa aminokiselinama u ekstracelularnim petljama 2 i 3 i da se one razlikuju kod ova dva receptora, što dovodi do selektivnosti liganada.



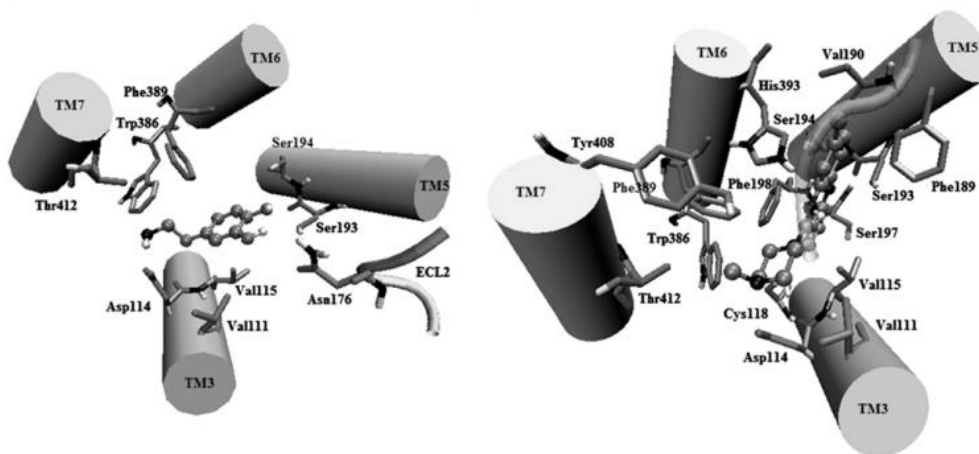
Slika 12. Hemijska struktura etikloprida i interakcije koje ostvaruje sa dopaminskim D3 receptorom⁸⁸

Upoređivanjem aminokiselinskih sekvenci dopaminskih D2 i D3 receptora dobilo se preklapanje od 78%, što je mnogo više nego sa do tada korišćenim matricama.

S ciljem da identifikuju nove potencijalne antagoniste, Dash i saradnici su razvili novi model D2 receptora koristeći dopaminski D3 receptor kao matricu⁸⁹. Rezultati doking analize ukazuju da je interakcija između liganda i Asp 78 (3.32) ključna za

vezivanje. Pored nje bitne su i hidrofobne interakcije koje ligand ostvaruje sa bočnim ostacima Trp 350 (6.48), Tyr 372 (7.35) i Phe 375 (7.38). Dodatne interakcije ligand-receptor uključuju sledeće A.K.: Val 79 (3.33), Val 154 (5.39), Phe 353 (6.51), Phe 354 (6.52) i Ile 358 (6.56) i Ile 148 (ecl2).

Soriano-Ursua je sa svojom istraživačkom grupom uporedio nekoliko modela dopaminskog D2 receptora koji su dobijeni korišćenjem kristalnih struktura hβ2AR i A2A (publikovanih od strane Hansona i sar.^{84,85}) i dopaminskog D3 receptora (publikovanog od strane Chien i sar.⁸⁸) kao matrica⁹⁰, s ciljem da utvrdi sličnosti i razlike među njima. Rezultati doking analize testiranih liganada su pokazali da svi oni ostvaruju interakcije sa Asp 114 (3.38). Ako ligand u svom sastavu sadrži kateholску funkciju, OH grupe će nagraditi vodonične veze sa Ser 193 (5.42), Ser 194 (5.43) i Ser 197 (5.46). Hidrofobni džep mogu da formiraju bočni ostaci sledećih A.K.: Phe 110 (3.28), Leu 113 (3.31), Val 115 (3.33), Met 117 (3.35), Phe 189 (5.38), Val 190 (5.39), Phe 382 (6.44), Trp 386 (6.48), Phe 389 (6.51), Phe 390 (6.52), His 393 (6.55), Thr 412 (7.39), Trp 413 (7.40), Tyr 416 (7.43), kao i Ile 183 u drugoj ekstracelularnoj petlji (ecl2). Koja će od ovih A.K. ući u sastav hidrofobnog džepa zavisi od toga da li je ligand agonist ili antagonist D2 receptora. Na *Slici 13* levo je prikazan doking dopamina (agonist), dok je doking klozapina (antagonist) prikazan na desnoj strani slike.



Slika 13. Model dopaminskog D2 receptora po Soriano-Ursua⁹⁰

Autori su zaključili da je dopaminski D3 receptor najbolja matrica za homologo modelovanje D2 receptora i da je neophodno detaljnije istražiti uticaj ecl2 u vezivanju liganda za ovu klasu receptora.

2.2.2.1. Modelovanje druge ekstracelularne petlje (ecl2)

Bez obzira na visok stepen sličnosti u strukturi dopaminskih D2 i D3 receptora, u domenima ekstracelularnih petlji 2 i 3 (ecl2 i ecl3) se javljaju značajne razlike, koje je neophodno ispitati jer ove dve petlje ulaze u sastav mesta vezivanja D2 receptora.

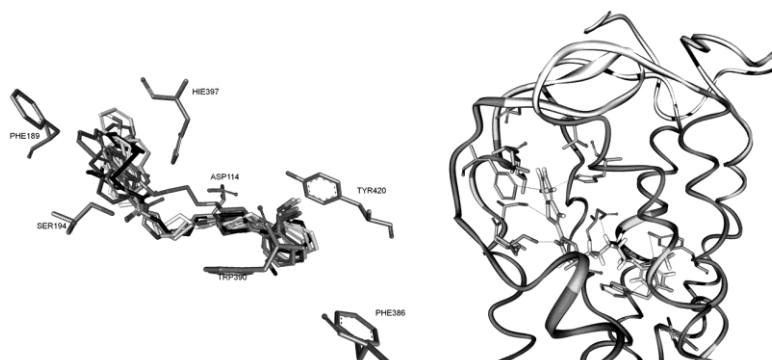
Javitch i sar.⁹¹ su među prvima pretpostavili da je druga ekstracelularna petlja (ecl2) deo aktivnog mesta dopaminskog D2 receptora. Koristili su SCAM metod⁸⁰ da bi identifikovali bočne ostatke A.K. u ecl2 (od Asn 176 do Asn 186) koji učestvuju u izgradnji vezivnog mesta⁹². Dobijeni rezultati su pokazali da postoji određeni broj A.K. koje učestvuju u vezivanju liganda za receptor.

Od strane Šukalovića sa saradnicima 2013. godine je predložen model druge ekstracelularne petlje⁹³. Autori su došli do zaključka da je ecl2 visoko fleksibilni deo D2 receptora koji ima trostruku ulogu:

- obezbeđuje hidrofobnu sredinu za vezivanje liganda,
- obezbeđuje pravilnu orijentaciju liganda prilikom vezivanja za receptor,
- obezbeđuje pravilnu orijentaciju bočnih aminokiselinskih ostataka koji imaju ulogu u vezivanju liganda za receptor.

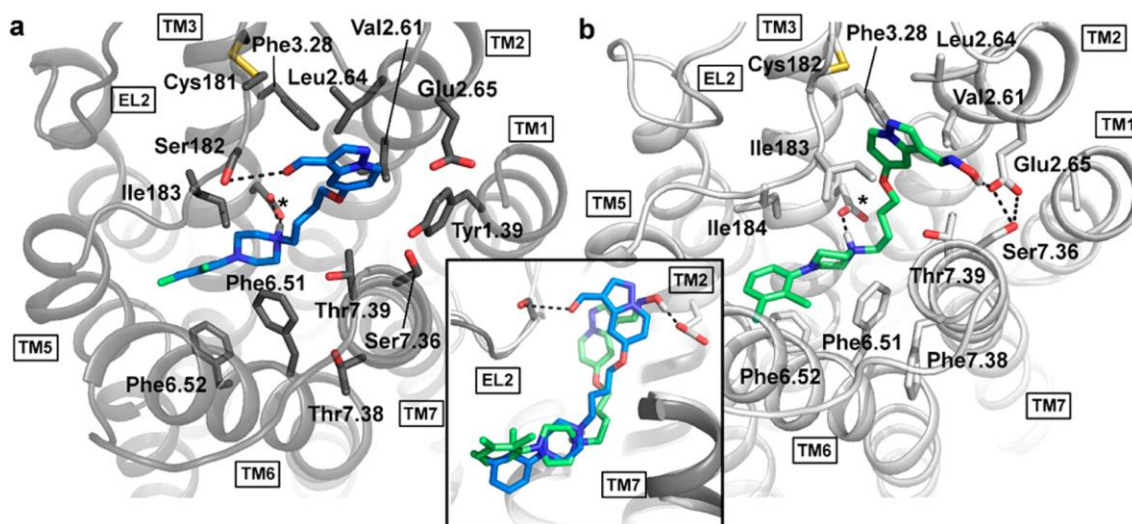
Autori su pretpostavili da se pri vezivanju liganda za receptor, ligand obavezno smešta u tzv. ortosterno mesto vezivanja (OBS) pri čemu se formiraju:

- soni most između protonovanog azota i Asp 114 (3.32),
- najmanje jedna vodonična veza između liganda i bočnih ostataka Ser 167 (4.57), Ser 194 (5.43) i Ser 197 (5.46),
- jake hidrofobne interakcije između molekula i Phe 386 (6.44), Trp 390 (6.48), i Tyr 420 (7.43) ili Tyr 416 (7.39).



Slika 14. Na levoj strani slike je prikazan klaster jedinjenja koji se vezuju za bočne aminokiselinske ostatke u ecl2, a na desnoj strani slike je prikazan položaj liganada u vezivnom mestu receptora⁹³

Ukoliko je molekul koji se vezuje voluminozniji, onda se jedan njegov deo smešta u alternativno mesto vezivanja koje se nalazi u regionu ecl2 petlje D2 receptora. Po ovim autorima u njegov sastav ulaze bočni ostaci Ile 166, Leu 170, Leu 171, Ile 184, Phe 189, Val 190, His 397, Ile 398 i Asn-186 (*Slika 14*).

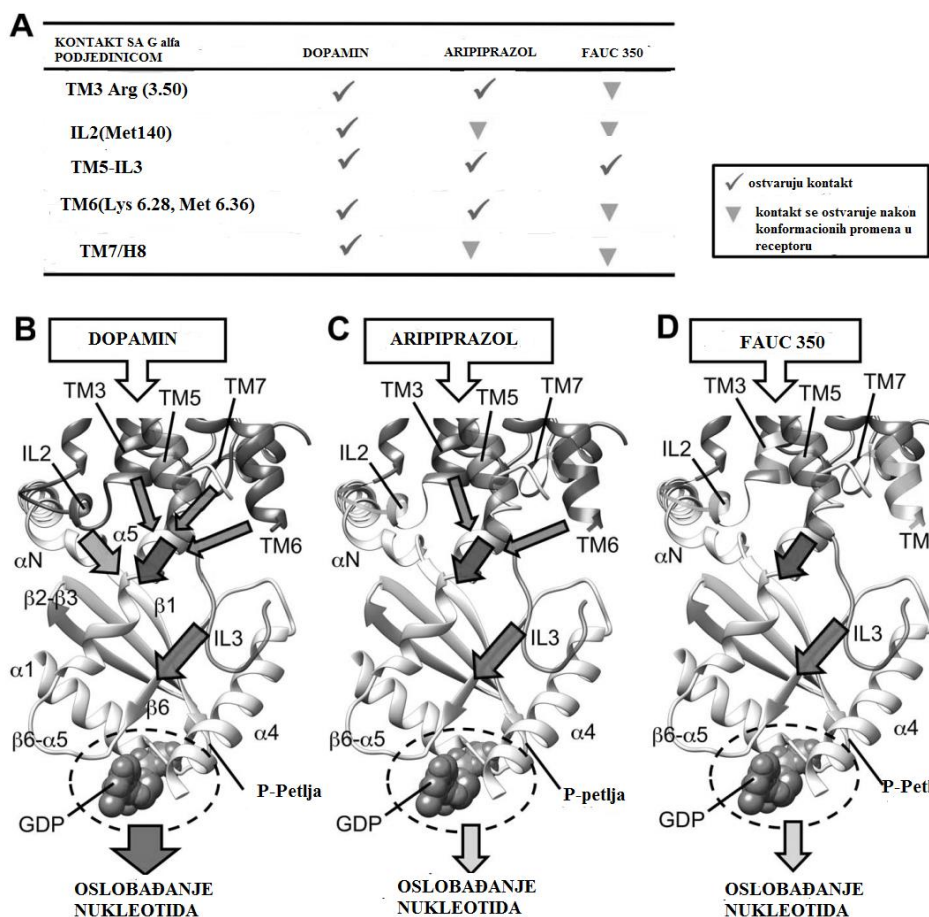


Slika 15. Interakcije ligand-receptor uspostavljene na mestima vezivanja (OBS i sekundarno mesto vezivanja) liganada za dopaminske a) D3 i b) D2 receptore⁹⁵

Po mišljenju autora, dati model je neophodno dalje usavršavati, kako bi se njime mogli objasniti rezultati doking analize velikog broja liganada.

U dopaminskom D2 receptoru postoji, pored već objašnjenih, još i sekundarno mesto vezivanja koje čine aminokiseline sa 2, 3, 5, 6 i 7 transmembranskog heliksa i iz ekstracelularne petlje 2 (ecl2). Ligandi najčešće ostvaruju vodonične veze sa Glu 95 (2.65), Ser 409 (7.36) i Thr 412 (7.39), mada ukoliko su u pitanju duži ligandi oni mogu da ostvare interakcije i sa aminokiselinom ostacima iz ecl2. (*Slika 15*)^{94,95}.

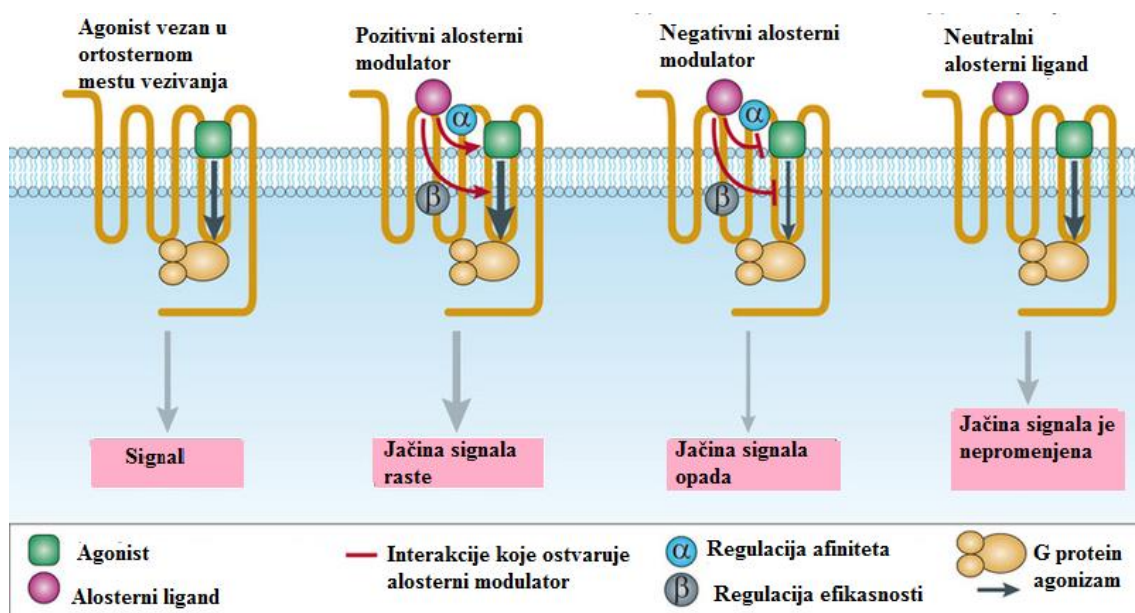
Pored homologog modelovanja dopaminskog D2 receptora postavlja se i pitanje mehanizama uključenih u njegovu aktivaciju. Kling je sa saradnicima⁹⁶ publikovao homologi model kompleksa aktivnog stanja dopaminskog D2 i G α i receptora. Kao matricu je koristio kristalnu strukturu β 2-adrenergičkog i G α s kompleksa.



Slika 16. D2 receptor u kompleksu sa G α i G-proteinom⁹⁷

Sledeće što su uradili jeste vezivanje dopamina (agonist) i aripirazola i FAUC 350 (parcijalni agonisti) liganda za dobijeni kompleks D2 i G α i receptora⁹⁷ (*Slika 16*). Model pokazuje da fenilpiperazinski delovi oba molekula okupiraju OBS vezivno mesto koje formiraju TMIII, TMV, TMVI, TMVII i ecl2 (u zavisnosti od autora mogu da postoje male razlike u definisanju A.K. koje ulaze u sastav ovog mesta). Vezivanje agonista izaziva sužavanje OBS, pa su ecl2 i TM heliksi bliže jedni drugima, dok vezivanje parcijalnih agonista dovodi do otvaranja ortosternog mesta vezivanja.

U poslednje vreme velika se pažnja poklanja sintezi alosternih modulatora^{98,99}, bitopik¹⁰⁰ i bivalentnih liganada^{101,102}.

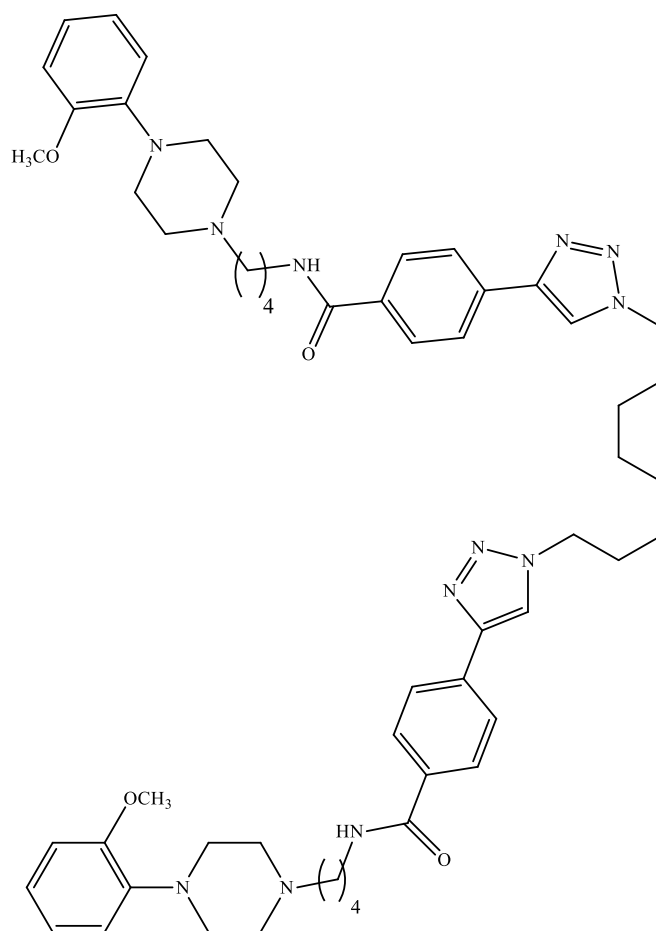


Slika 17. Slikovit prikaz uticaja alosternih liganada na ćelijski odgovor izazvan određenim agonistom⁹⁹

Kada se agonist D2 receptora veže u ortosterno mesto vezivanja (OBS) on aktivira G protein i prouzrokuje ćelijski odgovor. Alosterni modulator se ne veže u OBS, već samo u sekundarno vezivno mesto (naziva se još i alosterno mesto vezivanja) i na taj način utiče na promenu konformacije proteina. Ovim promenama u receptoru OBS mesto

postaje dostupno za vezivanje agonista čime se prouzrokuje ćelijski odgovor. Signal koji se signalnim putem prenosi kroz ćeliju nakon aktiviranja receptora, može da bude jači u prisustvu alosternog modulatora (pozitivni alosterni modulator), slabiji (negativni alosterni modulator), ili nepromenjen (neutralni alosterni ligand) u odnosu na jačinu ćelijskog odgovora koji se javlja samo u prisustvu agonista (*Slika 17*)⁹⁸.

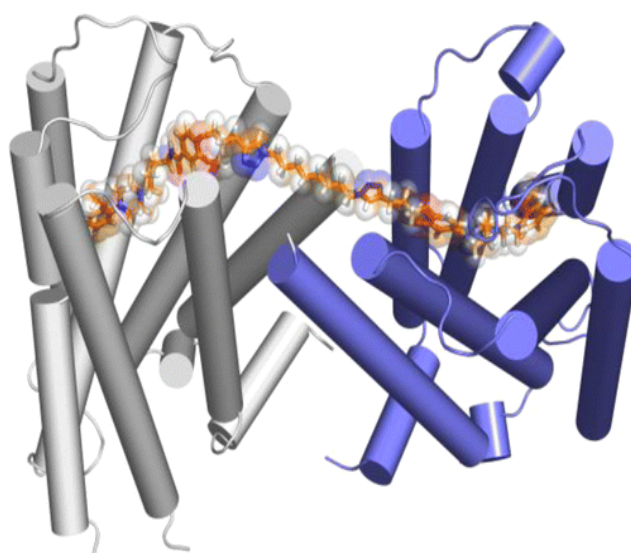
Alosterni modulatori su visoko selektivni ligandi za svaku pojedinačnu klasu receptora, jer okupiraju sekundarno mesto vezivanja koje nije evolutivno očuvano. Ova činjenica se može iskoristiti u sintezi potencijalnih antipsihotika, antidepresiva itd., kako bi se smanjili sporedni efekti.



34

Slika 18. Hemijska struktura homobivalentnog liganda **34**

Spajanjem dve farmakofore koje se vezuju u OBS i sekundarno mesto vezivanja u jedan molekul preko odgovarajućeg linkera dobijaju se bitopik ligandi^{100,103}. Oni ostvaruju veći broj kontakata sa D2 receptorima (poseduju veći afinitet vezivanja za D2 receptore), nego ligandi koji se vezuju samo u OBS-u, što je značajno u lečenju bolesti kod kojih je smanjena prirodna emisija dopamina (Parkinsonova bolest). Ako je linker između dve farmakofore dovoljno dugačak, postoji mogućnost da se ovi ligandi vežu na aktivna mesta dva receptora (za dopaminski dimer, ili za aktivna mesta dve različite klase receptora) i onda se klasifikuju kao bivalentni ligandi^{101,102}. Hemijska struktura jednog homobivalentnog liganda **34** prikazana je *Slici 18*, a način vezivanja za dopaminski D2 dimer dat je na *Slici 19*¹⁰², a kao takvi su potencijalni lekovi za poremećaje na nivou CNS.



Slika 19. Vezivanje liganda **34** za dopaminski D2 dimer¹⁰²

Očekivano je da će se u bliskoj budućnosti dobiti kristalna struktura dopaminskog D2 receptora i da će se detaljnije objasniti mehanizam njegovog aktiviranja, što će pomoći u sintezi novih liganada sa potencijalnim antipsihotičkim i antidepresivnim osobinama.

3. REZULTATI I DISKUSIJA

Cilj ovog rada je sinteza 2-metoksifenilpiperazinskih derivata, određivanje afiniteta vezivanja za dopaminske D2 receptore i ispitivanje interakcija receptora i liganda, kao i uticaj strukture liganda na jačinu formiranja kompleksa sa receptorom. Na osnovu prethodno dobijenih rezultata¹⁰⁴, očekuje se da će sintetisana jedinjenja zahvaljujući različitoj dužini, različitom tipu supstitucije (*orto*, *meta*, *para*), rigidnosti, kao i grupama sa različitim elektronskim efektima u aromatičnom delu molekula ostvariti različite interakcije u vezivnom mestu receptora. U skladu sa tim, sinteza liganada je podeljena u vise faza:

1. Sintetisani su ligandi sa fenil jezgrom i sa elektron akceptorskom nitro grupom u različitim položajima (*orto*, *meta* i *para*).
2. Sintetisani su ligandi sa različitom dužinom i rigidnošću mosta između fenil jezgra i piperidinskog dela molekula.
3. Sintetisani su ligandi sa različitom dužinom mosta između piperidinskog i 2-metoksifenilpiperazinskog dela molekula.
4. Sintetisani su ligandi sa različitom dužinom mosta između benzimidazolskog i 2-metoksifenilpiperazinskog dela molekula i sa elektron akceptorskim grupama (-NO₂ i -Cl) i elektron donorskom grupom (-OCH₃) kao supstituentima u položaju 5 benzimidazolskog prstena.

Za očekivati je, da će ligandi koji u svojoj strukturi poseduju nitro grupu, biti u mogućnosti da nagrade vodonične veze sa bočnim aminokiselinskim ostacima u mestu vezivanja dopaminskog D2 receptora i da će na taj način formirati jači kompleks sa receptorom u odnosu na nesupstituisane ligande.

Ligandi kod kojih je varirana dužina i rigidnost molekula, doprineće boljem mapiranju interakcija u delu receptora koji čini druga ekstracelularna petlja (alternativno mesto vezivanja), s obzirom na to da ovaj deo receptora nije dovoljno ispitan, kako u

pogledu prostornog rasporeda A.K., tako i po pitanju ključnih interakcija sa ligandima. Dobijeni rezultati će poslužiti za formiranje boljeg teorijskog 3D modela D2 receptora.

3.1. Sinteze liganada 1-(2-metoksifenil)piperazinskog tipa sa piperidinom u mostu

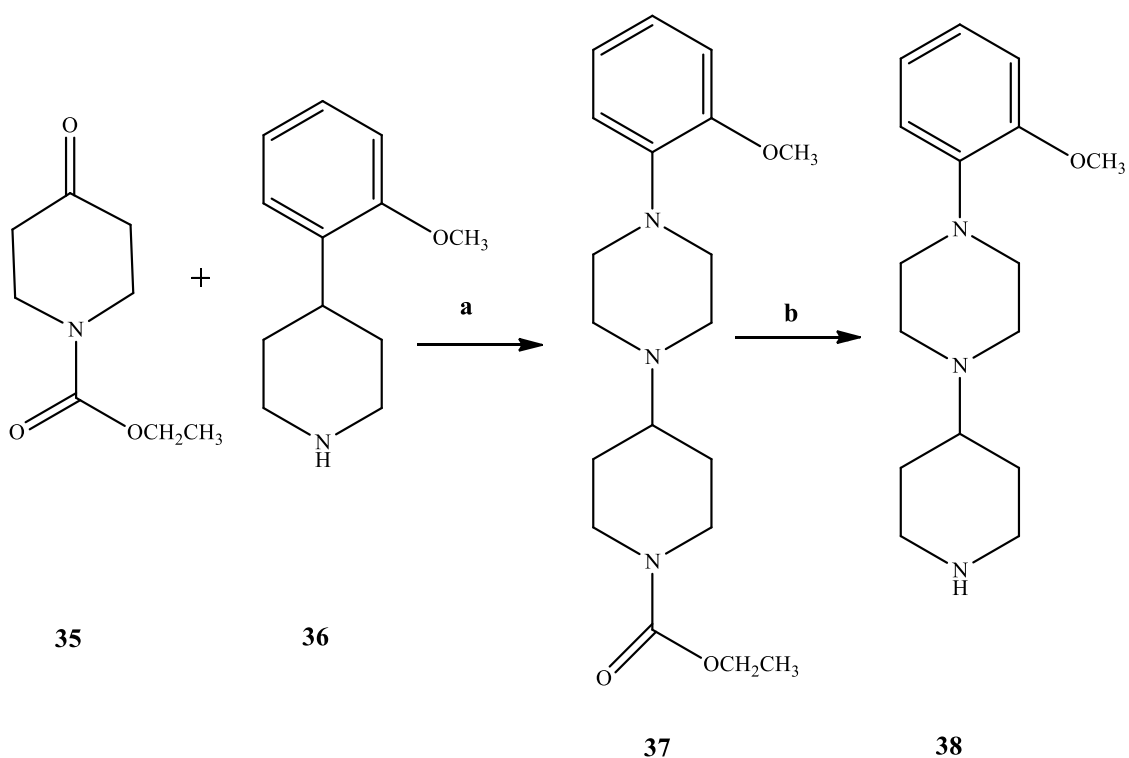
3.1.1. Sinteza 1-(2-metoksifenil)-4-(piperidin-4-il)piperazina (38)

Kao polazno jedinjenje za sintezu 1-(2-metoksifenil)-4-(piperidin-4-il)piperazina korišćen je komercijalno dostupan N-karbetoksi-4-piperidon (**35**), a ceo sintetički put prikazan je na *Shemi 1*.

Reakcijom reduktivnog aminovanja N-karbetoksi-4-piperidona sa 1-(2-metoksifenil)piperazinom dobijeno je jedinjenje **37**. U ovom radu je kao redukciono sredstvo korišćen NaBH_3CN sa kojim je moguće direktno reduktivno aminovanje ketona **35** aminom **36** u metanolu, ali i prethodno građenje enamina, pa njegova redukcija. Ispitana su oba pristupa. Prvo je pokušana sinteza enamina u ksilolu kao rastvaraču i uz prisustvo $p\text{-TsOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, pa njegova redukcija sa NaBH_3CN . Pored toga, ispitano je i reduktivno aminovanje ketona u prisustvu ZnCl_2 u metanolu i reduktivno aminovanje u metanolu u prisustvu sirćetne kiseline. Od sva tri ispitana sintetička puta, najbolje rezultate u prinosu je dalo reduktivno aminovanje sa NaBH_3CN u metanolu u prisustvu sirćetne kiseline. Nakon prečišćavanja proizvoda hromatografijom na koloni (eluent: metilen hlorid/metanol) dobijen je prinos od 88%.

Sledeći korak u sintezi je hidroliza dobijenog karbamata **37**. Ispitana je hidroliza u baznoj i kiseljoj sredini. Hidroliza u baznim uslovima izvedena je u sistemu dietilen-glikol/voda, sa KOH kao bazom na povišenoj temperaturi u trajanju od 24 sata. Prinos čiste supstance **38** je bio 35%. U kiselim uslovima ispitana su dva pristupa: hidroliza pomoću 33% rastvora HBr u sirćetnoj kiselini i hidroliza pomoću koncentrovane HCl na temperaturi ključanja. Hidroliza sa bromovodonikom je suviše spora. Kompletna hidroliza je završena posle pet dana. Reakcija sa cc HCl se završava posle 24 sata. Posle obrade prinos je 42%. Kako bi se poboljšao prinos reakcije urađena je i kisela hidroliza

sa cc HCl u mikrotalasnom reaktoru na temperaturi od 130 °C, pri maksimalnoj snazi od 300W u trajanju od 90 min. Ovaj sintetički put je dao najbolje rezultate u prinosu od 50% nakon obrade i prečišćavanja reakcione smeše, a pri tom je i najbrži način da se sintetise željeni proizvod **38**.



Shema 1. Prikaz dobijanja 1-(2-metoksifenil)-4-(piperidin-4-il)piperazina (**38**)

Reakcioni uslovi: a) NaBH₃CN, MeOH, pH 7, r.t; b) konc. HCl, MW, 130 °C, 300W

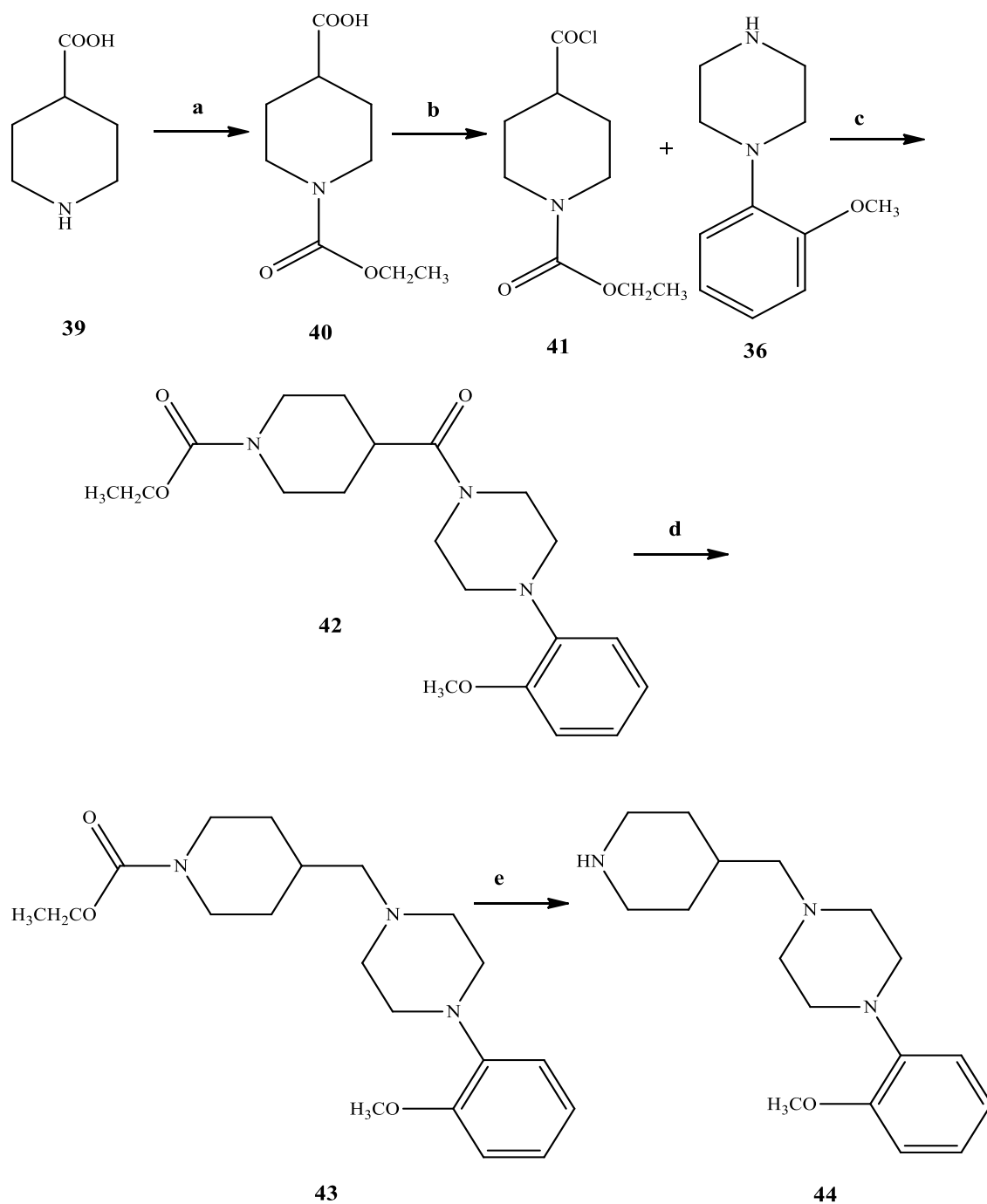
3.1.2. Sinteza 1-(2-metoksifenil)-4-(piperidin-4-ilmetil)piperazina (**44**)

Kao polazno jedinjenje za sintezu 1-(2-metoksifenil)-4-(piperidin-4-ilmetil)piperazina (**44**) korištena je komercijalno dostupna piperidin-4-karboksilna kiselina (**39**), a ceo sintetički put prikazan je na *Shemi 2*.

U skladu sa propisom opisanim u patentu, amino grupa u piperidin-4-karboksilnoj kiselini (**39**) je prevedena u karbamat **40** u reakciji sa etilhlorformijatom u

dvofaznom sistemu (rastvor $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{PhMe}$)¹⁰⁵. Nakon obrade reakcione smeše i njenog prečišćavanja dobijen je proizvod **40** u prinosu od 78%. Dobijeno jedinjenje je potom prevedeno u odgovarajući hlorid **41** u reakciji sa tionil hloridom. Hlorid nije prečišćavan, već je odmah po uparavanju viška tionil hlorida i hloroforma upotrebljen za dobijanje jedinjenja **42**. U rastvor 1-(2-metoksifenil)piperazina i trietil amina u hloroformu na 5 °C, ukapavan je prethodno dobijeni hlorid **41**, pri čemu nastaje odgovarajući amid (**42**). Proizvod nastaje u prinosu od 85%. Za redukciju amida postoji dosta opisanih postupaka^{106,107,108,109}. U okviru ovog rada ispitana su dva postupka redukcije. Redukcija amida pomoću natrijum borhidrida u dimetilglikolu uz prisustvo Lewis-ove kiseline TiCl_4 ¹¹⁰ nije dala željeni proizvod. Drugi pristup u kojem se koriste natrijum borhidrid i etarski rastvor bor trifluorid eterata u diglimu¹¹¹ je dao očekivani proizvod. U ohlađenu suspenziju amida i natrijum borhidrida ukapavan je bor trifluorid eterat u struji argona, pri čemu se *in situ* generiše diboran koji redukuje amidnu funkciju. Posle završenog ukapavanja reakciona smeša se meša na 5°C tokom 1 časa, a onda i na 80-90 °C dodatnih sat vremena. Nakon što se reakciona smeša ohladi na sobnu temperaturu dodaje se pažljivo voda (za rastvaranje viška natrijum borhidrida), a potom i koncentrovana hlorovodonična kiselina kako bi se razgradio kompleks koji amini grade sa borom. Smeša se zagreva tri sata na vodenom kupatilu čija temperatura iznosi 60-80 °C. Nakon isteka ovog vremena višak hlorovodonične kiseline i diglima se upari pod sniženim pritiskom. Suvi ostatak se zaalkališe 10% rastvorom NaOH i eksrahuje metilen hloridom. Kako je ostalo neizreagovano amida, sirov proizvod je prečišćen hromatografijom na koloni koristeći sistem metilen hlorid/metanol kao eluent. Dobijeno je jedinjenje **43** u prinosu od 85%.

Hidroliza karbamatne funkcije rađena je po ranije opisanom postupku za dobijanje 1-(2-metoksifenil)-4-(piperidin-4-il)piperazina (**38**). Dobijena reakciona smeša je obrađena i nakon prečišćavanja hromatografijom na koloni (metilen hlorid/metanol kao eluent) dobijen je željeni amin **44** u prinosu od 54%.

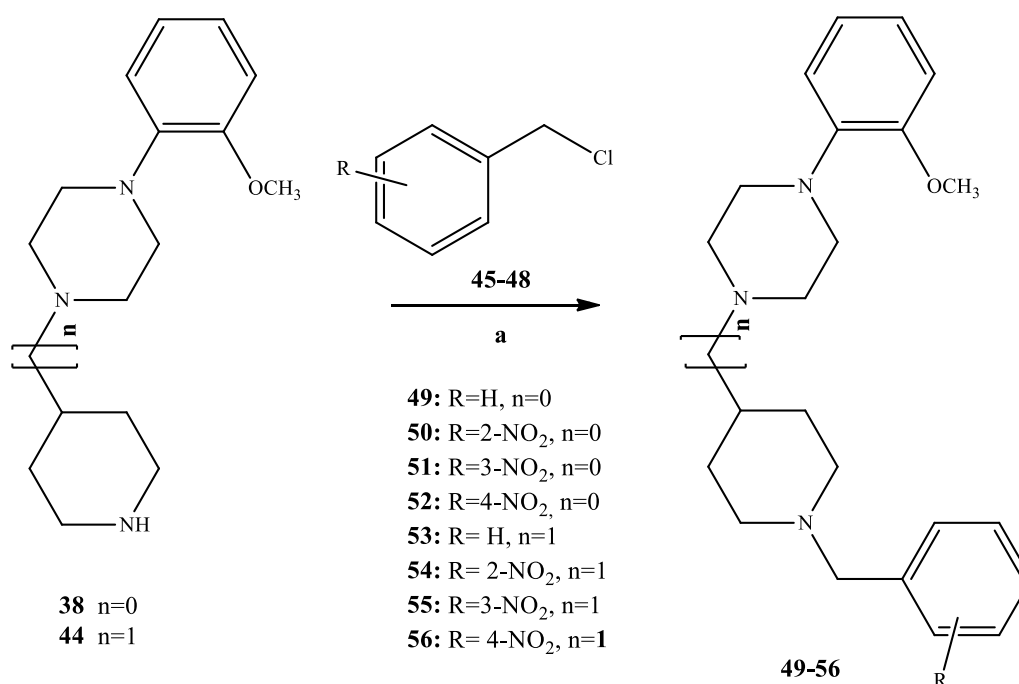


Shema 2. Sintetički put za dobijanje 1-(2-metoksifenil)-4-(piperidin-4-ilmetil)piperazina (**44**)

Reakcioni uslovi: a) Na_2CO_3 , ClCO_2Et , toluol, sobna temperatura; b) SO_2Cl_2 , CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C}$; c) Et_3N , CHCl_3 , $5\text{ }^\circ\text{C}$; d) NaBH_4 , $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$, diglim, $-5\text{ }^\circ\text{C}$; e) cc HCl , MW, $130\text{ }^\circ\text{C}$, 300W

3.1.3. Sinteza 1-(1-benzilpiperidin-4-il)-4-(2-metoksifenil)piperazina i 1-(2-metoksifenil)-4-[1-(benzil)piperidin-4-metil]piperazina i njihovih nitro derivata

Sledeći korak u sintezi 1-(2-metoksifenil)piperazinskih derivata je alkilovanje dobijenih prekursora **38** i **44**, odgovarajućim benzil i nitrobenzil hloridima. Sintetički put je prikazan na *Shemi 3*.



Shema 3. Sintetički put za dobijanje liganada **49-56**

Reakcioni uslovi: jedinjenje **45-48**, K₂CO₃, CH₃CN, sobna temperatura

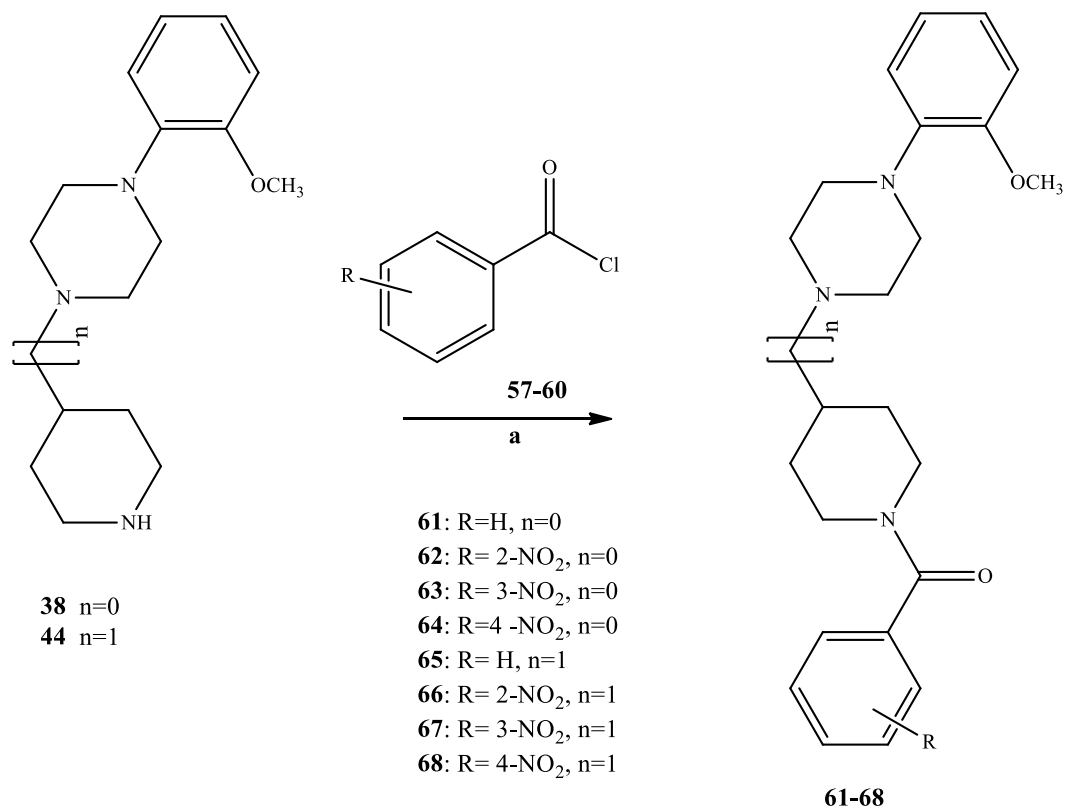
U ovoj fazi sinteze urađeno je alkilovanje odgovarajućih prekursora pomoću benzil i *o*, *m* i *p*-nitrobenzil hlorida. Alkilovanje amina se izvodi u baznoj sredini u polarnim rastvaračima poput acetonitrila, dimetilformamida, metil etil ketona i sličnih. Kao baze koriste se natrijum- i kalijum-karbonat koji neutrališu kiselinu (u ovom slučaju HCl) koja se oslobađa tokom reakcije.

Smeša amina **38** ili **44**, anhidrovanog K_2CO_3 i odgovarajućeg benzil- ili *o*, *m*, *p*-nitrobenzil hlorida **45-48**, u acetonitrilu mešana je na sobnoj temperaturi tokom 72 sata. Tok reakcije je praćen hromatografijom na tankom sloju. Obrada reakcione smeše podrazumeva izlivanje reakcione smeše u vodu i ekstrakciju metilen hloridom. Dobijeni sirovi proizvodi su prečišćeni hromatografijom na koloni koristeći sistem metilen hlorid/metanol kao eluent. Očekivani proizvodi su dobijeni u prinosu od 76-87%.

3.1.4. Sinteza {4-[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il]piperidin-1-il}(fenil)metanona i (4-{[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il]metil}piperidin-1-il)(fenil)metanona i njihovih nitro derivata

U cilju dobijanja liganada smanjene fleksibilnosti, uvedena je karbonilna funkcionalna grupa umesto metilenskog mosta koji spaja fenil, odnosno nitrofenilni deo molekula sa piperidinskim delom. Sintetički put je prikazan na *Shemi 4*.

Amidi se mogu sintetisati direktno iz kiseline korišćenjem reagenasa za kuplovanje poput DCC^{112} , $TiCl_4^{113}$ i drugih, ali i prevođenjem kiseline u odgovarajući hlorid pa acilovanjem amina u narednom koraku reakcije. U ovom radu je korišten drugi pristup za sintezu amida. Halogenidi kiseline **57-60**, dobijeni su u reakciji benzoeve i *o*, *m*, *p*-nitrobenzoeve kiseline sa tionil hloridom u metilen hloridu kao rastvaraču. Oni nisu prečišćavani, već su odmah nakon uparavanja viška tionil hlorida i rastvarača upotrebljeni u narednom koraku reakcije za acilovanje prekursora **38** i **44**¹¹⁴. U rastvor prekursora i Et_3N (baza koja vezuje oslobođeni HCl) u metilen hloridu se ukapava rastvor benzoil ili nitrobenzoil halogenida na 0 °C. Posle završenog ukapavanja reakciona smeša se meša na sobnoj temperaturi do završetka reakcije. Tok reakcije se prati hromatografski. Željeni proizvodi su izolovani u prinosu od 68-85%.



Shema 4. Sintetički put za dobijanje liganada **61-68**

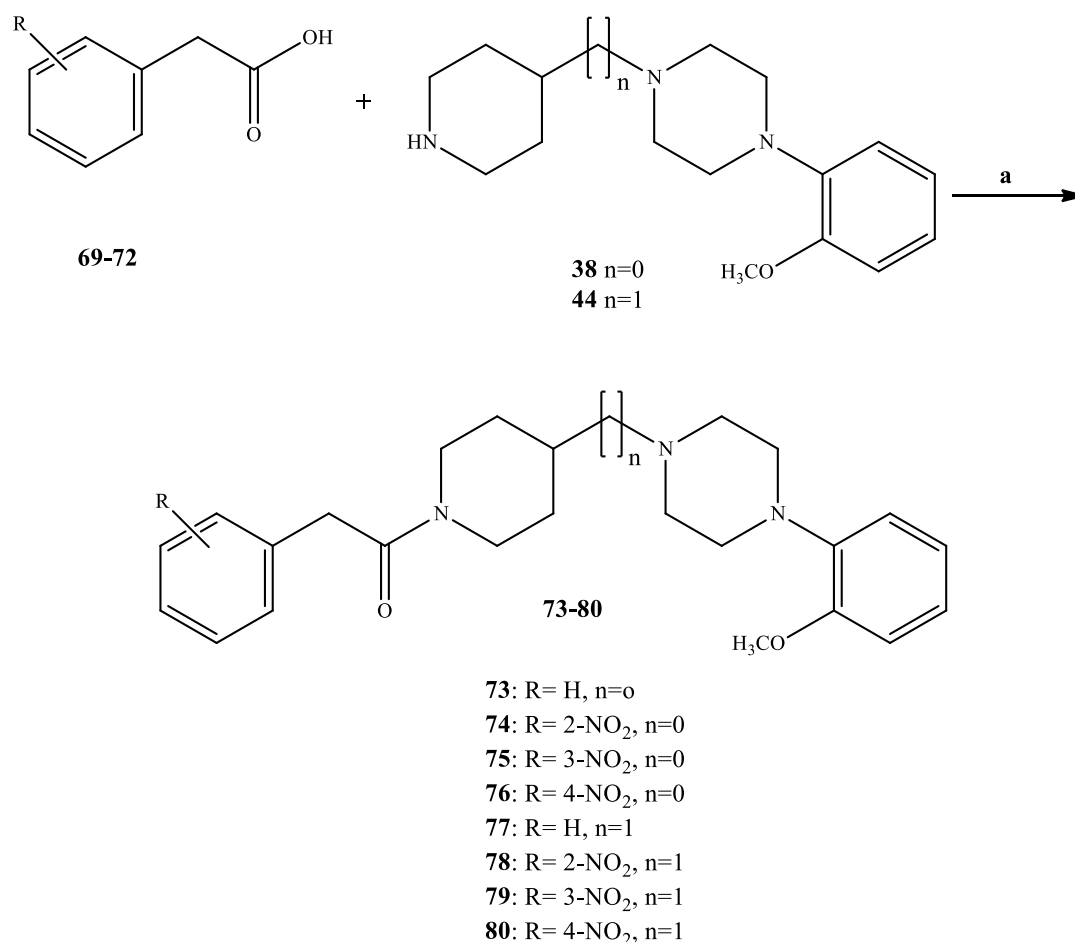
Reakcioni uslovi: jedinjenje **57-60**, Et_3N , CH_2Cl_2 , 0°C

3.1.5. Sinteza 1-{4-[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il]piperidin-1-il}-2-(fenil)etanona i 1-(4-{[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il]metil}piperidin-1-ill)-2-(fenil)etanona i njihovih nitro derivata

Polazna jedinjenja u sintezi liganada **73-80** su komercijalno dostupne fenil i nitrofenil sirćetne kiseline, a ceo sintetički put dobijanja krajnjih proizvoda je prikazan na **Shemi 5**.

Uvođenjem metilenske funkcije, između fenilnog i piperidinskog dela u molekulu, dobijaju se molekuli sa većom stepenom fleksibilnosti. Kada je, prethodno opisan postupak za sintezu amida¹¹ (dobijanje liganada **61-68**), primenjen na fenetil sirćetnim kiselinama (kao polaznim jedinjenjima) dobijeni su niski prinosi, oko 30%. Iz tog razloga ispitan je i drugi sintetički put, koji podrazumeva dobijanje amida direktno

iz karboksilnih kiselina u prisustvu DCC. Ekvimolarne količine karboksilne kiseline **69-72** i prekursora **38** ili **44** se rastvore u acetonitrilu i ohlade na 0 °C. U tako ohlađenu smešu se postepeno dodaje DCC. Narednih 0,5 časova se reakciona smeša meša na 0 °C, a potom se ostavi da postigne sobnu temperaturu. Tok reakcije se prati hromatografijom na tankom sloju. Posle 24 časa, reakciona smeša se procedi kroz dijatomejsku zemlju, kako bi se oslobodili DCU (dicikloheksil uree) koja nastaje u reakciji. Filtrat se upari pod sniženim pritiskom do suva. Željeni proizvodi **73-80** su nakon prečišćavanja hromatografijom na koloni (eluent metilen hlorid/metanol) dobijeni u prinosu od 69-84%. Kao polazna jedinjenja korištene su fenil, 2-nitrofenil, 3-nitrofenil i 4-nitrofenil sirćetna kiseline (**69-72**).



Shema 5. Sintetički put dobijanja liganada **73-80**

Reakcioni uslovi: a) jedinjenja **69-72**, DCC, CH₃CN, 0°C

Kako bismo uspješno identifikovali signale u $^1\text{H-NMR}$ -u koji pripadaju atomima vodonika iz piperidinskog dela molekula snimili smo 2D HSQC spektre jedinjenja **73-80**. Analizom spektralnih podataka jedinjenja, identifikovani su signali u protonskom $^1\text{H-NMR}$ spektru koji se kupluju sa atomima ugljenika u $^{13}\text{C-NMR}$ spektru. Na *Slici 20* dat je 2D HSQC spektar za jedinjenje **74**, a u *Tabeli 4* je prikazana pozicija signala u $^1\text{H-NMR}$ i $^{13}\text{C-NMR}$ spektrima ovog jedinjenja. U zagradama pored signala date su oznake za aksijalne (Ha) i ekvatorijalne (He) atome vodonika. Signali na 1,52 ppm (Ha), 1,63 ppm (Ha), 1,91 ppm (He), 1,99 ppm (He), 2,56-2,60 ppm, 2,67 ppm (Ha) i 4,63 (He) ppm u $^1\text{H-NMR}$ odgovaraju atomima vodonika koji se kupluju sa ugljenikovim atomima u $^{13}\text{C-NMR}$ (signali na 28,0 ppm, 28,7 ppm, 41,6 ppm, 45,2 ppm, 61,8 ppm) iz piperidinskog dela molekula. Signali u intervalu 3,11-3,14 ppm (Ha) u $^1\text{H-NMR}$ spektru odgovaraju vodonikovim atomima piperazina (ukupno četiri) i vodonikovom atomu piperidina koji se kupluju sa ugljenikovim atomima čiji su signali u $^{13}\text{C-NMR}$ spektru na pomeranjima od 50,9 ppm i 45,2 ppm, redom. Signal na 4,01-4,14 ppm (He) odgovara atomima vodonika iz metilenske (CH_2) grupe koji se kupluju sa atomom ugljenika čiji se signal u $^{13}\text{C-NMR}$ nalazi na 38,6 ppm i atomu vodonika iz piperidina koji se kupluje sa atomom ugljenika čiji se signal u $^{13}\text{C-NMR}$ -u nalazi na 45,2 ppm.

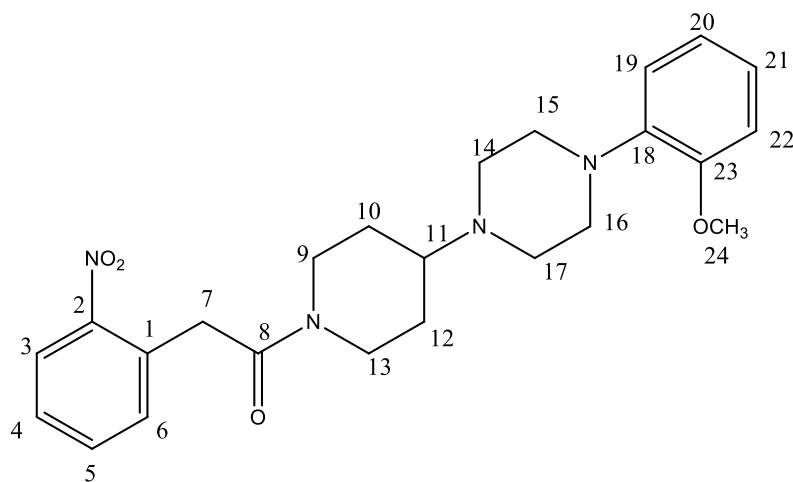
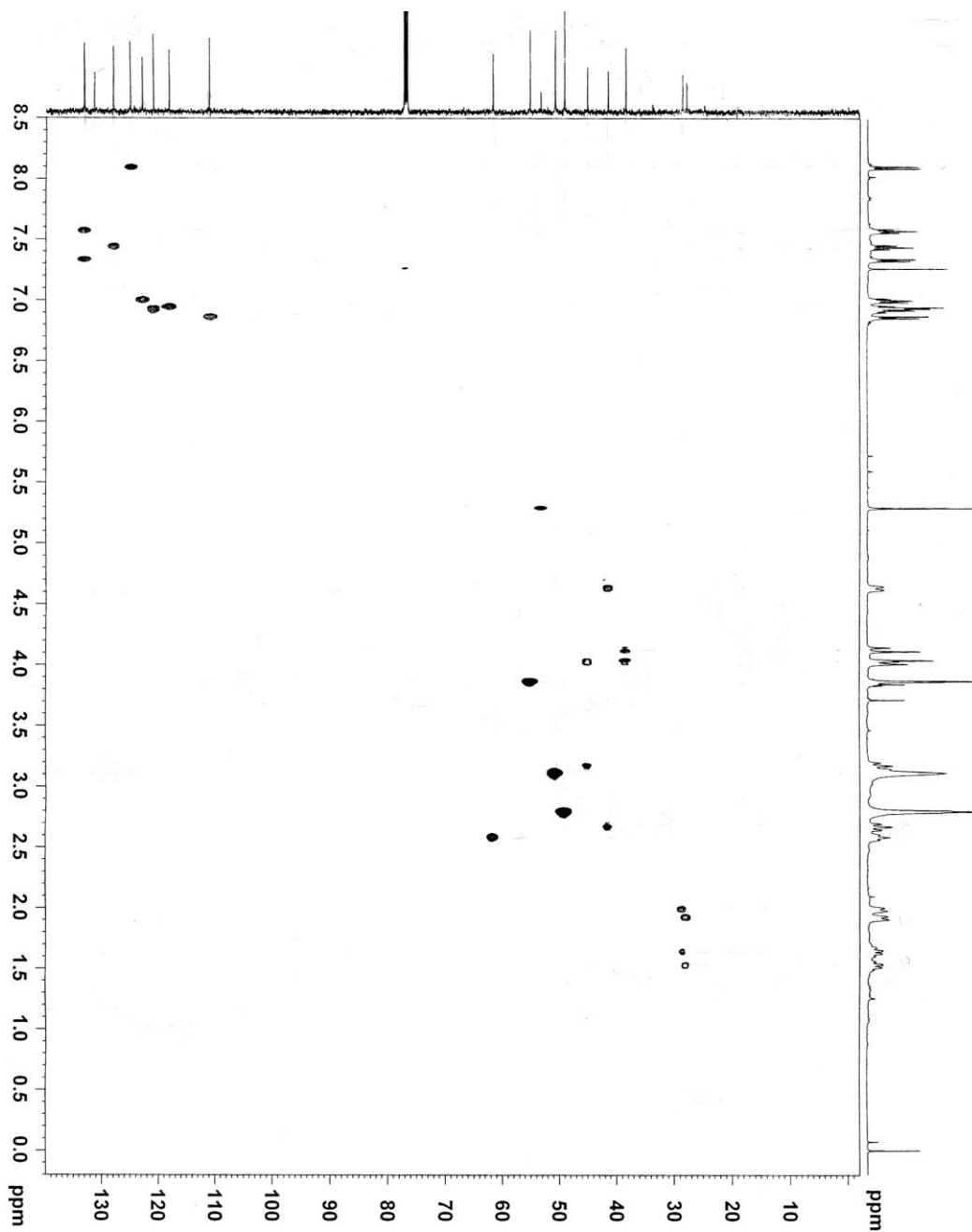


Tabela 4. Položaj signala u $^1\text{H-NMR}$ i $^{13}\text{C-NMR}$ spektru jedinjenja **74**

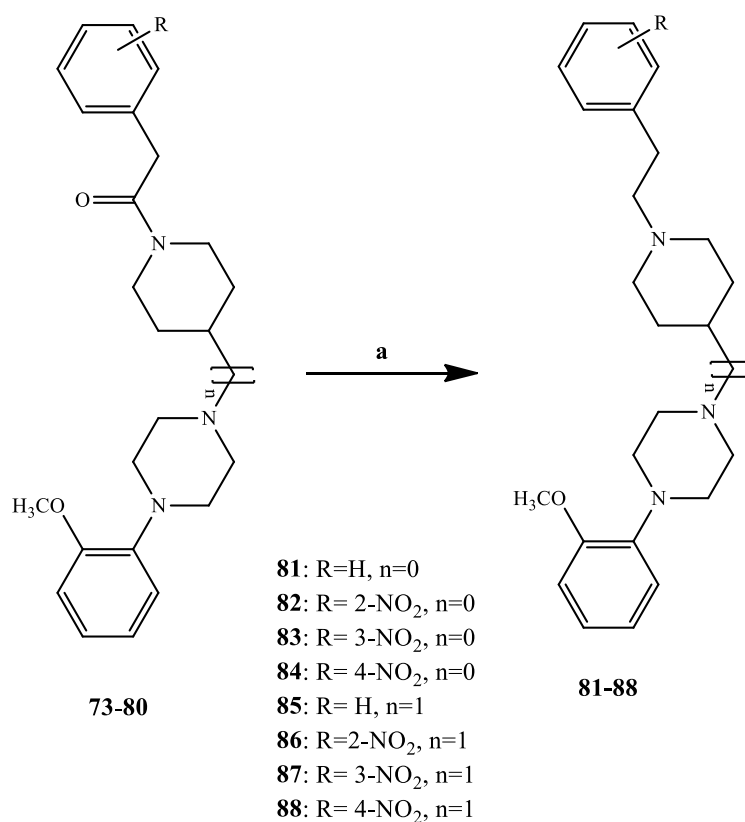
Broj C atoma	δ C (ppm)	Broj H atoma	δ H (ppm)	Broj C atoma	δ C (ppm)	Broj H atoma	δ H (ppm)
1	131,4	1	-	13	45,2	13; 13'	3,11-3,14; 4,04-4,14
2	149,0	2	-	14	49,2	14; 14'	2,79
3	125,1	3	8,09	15	50,9	15; 15'	3,11-3,14
4	128,1	4	7,43	16	50,9	16; 16'	3,11-3,14
5	133,2	5	7,56	17	49,3	17; 17'	2,79
6	133,3	6	7,33	18	152,2	18	-
7	38,6	7;7'	4,01-4,14	19	122,9	19	6,98-7,01
8	167,3	8	-	20	118,2	20	6,92-6,95
9	41,6	9; 9'	2,67; 4,63	21	121,0	21	6,92-6,95
10	28,0	10; 10'	1,52; 1,91	22	111,1	22	6,85-6,87
11	61,8	11	2,56-2,60	23	141,2	23	-
12	28,7	12; 12'	1,63;1,99	24	55,3	24; 24';24''	3,86



Slika 20. Hemijska struktura i položaj signala u ^1H -NMR i ^{13}C -NMR spektrima jedinjenja **74**

3.1.6. Sinteza 1-(2-metoksifenil)-4-(1-fenetilpiperidin-4-il)piperazina i 1-(2-metoksifenil)-4-[(1-fenetilpiperidin-4-il)metil]piperazina i njihovih nitro derivata

Za sintezu liganada **81-88** korišten je postupak redukcije u sistemu natrijum borhidrid, bor trifluorid eterat u diglimu, opisan za dobijanje jedinjenja **43**. Prinos dobijenih amina iznosi 50-57% i znatno je niži nego u slučaju jedinjenja **43** (*Shema 6*).



Shema 6. Sintetički put dobijanja liganada **81-88**. Reakcioni uslovi: a) jedinjenja **73-80**, NaBH₄, BF₃-Et₂O, diglim, -5°C.

Analizom spektralnih podataka HSQC spektra jedinjenja **81**, odredili smo položaj signala vodonikovih atoma u piperidinskom delu molekula. Na osnovu ovih rezultata urađena je asignacija i za ostala jedinjenja u seriji **81-88**.

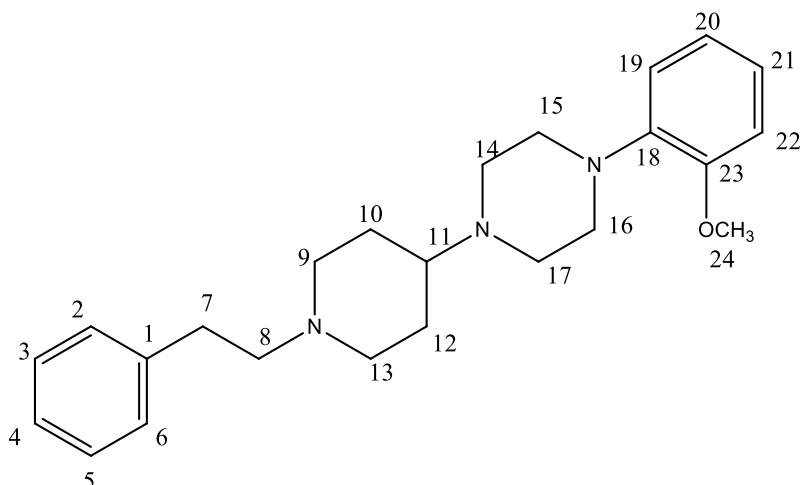
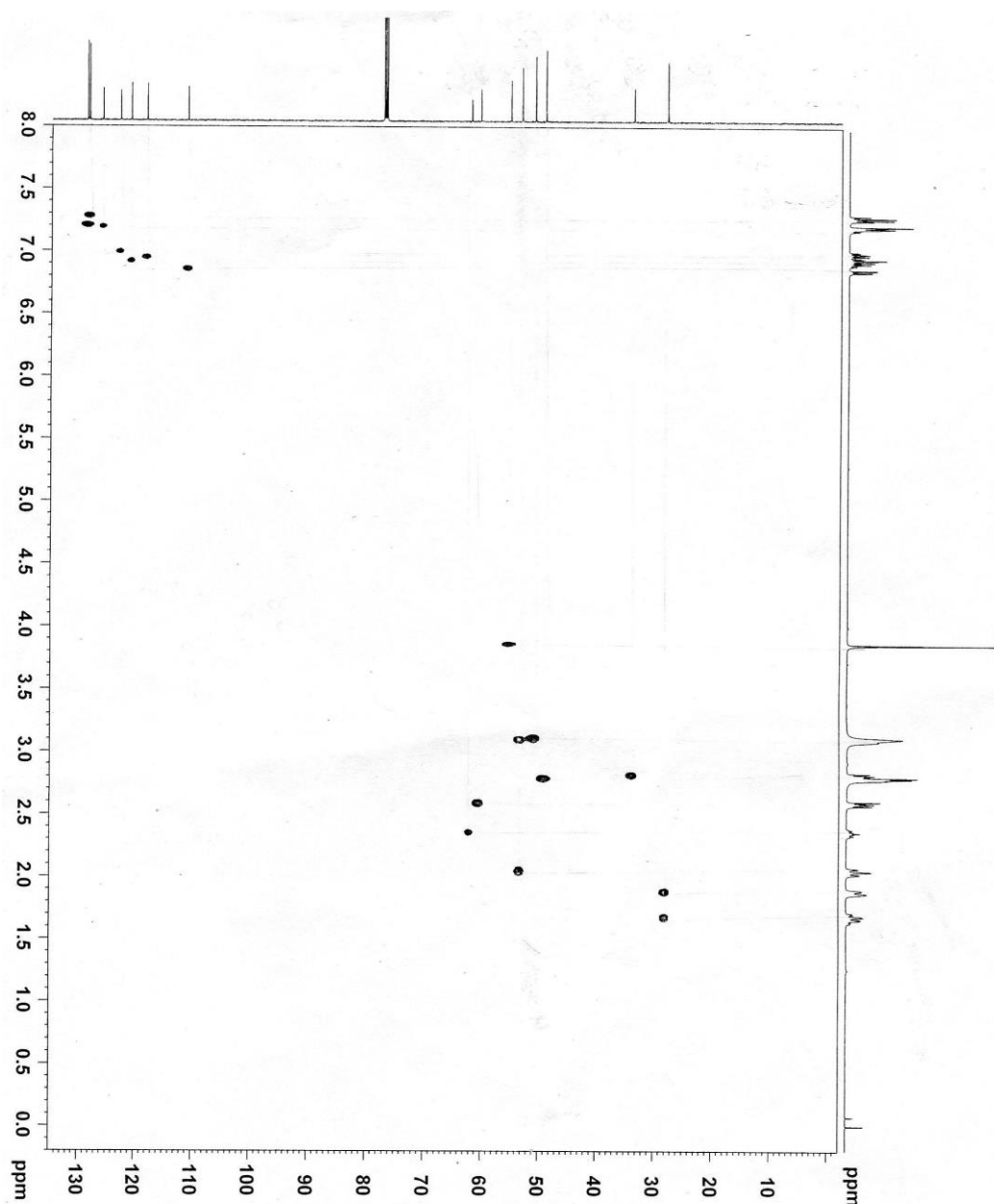


Tabela 5. Položaj signala u $^1\text{H-NMR}$ i $^{13}\text{C-NMR}$ spektru jedinjenja **81**

Broj C atoma	δ C (ppm)	Broj H atoma	δ H (ppm)	Broj C atoma	δ C (ppm)	Broj H atoma	δ H (ppm)
1	140,4	1	-	13	53,3	13; 13'	2,04; 3,08-3,10
2	128,3	2	7,26-7,29	14	49,1	14; 14'	2,77-2,82
3	128,6	3	7,17-7,21	15	51,0	15; 15'	3,08-3,10
4	125,9	4	7,17-7,21	16	51,0	16; 16'	3,08-3,10
5	128,6	5	7,17-7,21	17	49,1	17; 17'	2,77-2,82
6	128,3	6	7,26-7,29	18	152,2	18	-
7	33,8	7;7'	2,77-2,82	19	122,8	19	6,89-7,00
8	60,5	8;8'	2,57-2,60	20	118,1	20	6,89-7,00
9	53,3	9; 9'	2,04; 3,08-3,10	21	120,9	21	6,89-7,00
10	28,0	10; 10'	1,66; 1,87	22	111,0	22	6,84-6,86
11	62,1	11	2,35	23	141,1	23	-
12	28,0	12; 12'	1,66; 1,87	24	55,2	24; 24'; 24''	3,86



Slika 21. Hemijska struktura i položaj signala u ^1H -NMR i ^{13}C -NMR spektrima jedinjenja **81**

Na *Slici 21* dat je 2D HSQC spektar za jedinjenje **81**, a u *Tabeli 5* prikazana je pozicija signala u ^1H -NMR i ^{13}C -NMR spektrima ovog jedinjenja. U zagradama pored signala date su oznake za aksijalne (Ha) i ekvatorijalne atome vodonika. Signali na 1,66 ppm (Ha), 2,04 ppm (Ha), 1,87 ppm (He) i 2,35 ppm u ^1H -NMR odgovaraju atomima vodonika koji se kupluju sa ugljenikovim atomima u ^{13}C -NMR (signali na 28,0 ppm, 53,3 ppm, 62,1 ppm) iz piperidinskog dela molekula. Signal u intervalu 3,08-3,10 ppm

(He) u ^1H -NMR spektru odgovara vodonikovim atomima piperazina (ukupno četiri) i vodonikovom atomu piperidina koje se kupluju sa ugljenikovim atomima čiji su signali u ^{13}C -NMR spektru na pomeranjima od 51 ppm i 53,3 ppm, redom.

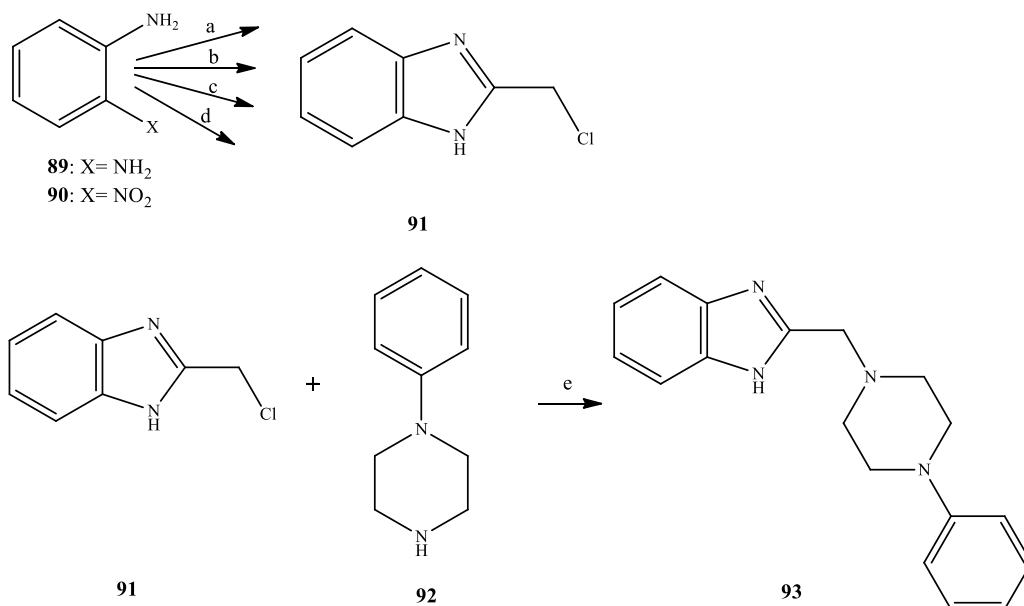
3.2. Sinteza liganada benzimidazol-1(2-metoksifenil)piperazinskog tipa 115-128

U ovom radu su ispitana dva pristupa za dobijanje liganada benzimidazol-1-(2-metoksifenil)piperazinskog tipa. Oba sintetička puta su prvo ispitana na sistemima koji kao proizvod daju ligand **115**, jer se smatralo da će ciklizacija u ovom slučaju ići sporo i da će se dobiti proizvod u niskim prinosima, što se kasnije ispostavilo kao tačno.

Prvi sintetički put koji je isplaniran prikazan je na *Shemi 7* podrazumevao je dobijanje 2-hlormetilbenzimidazola (**91**) u prvoj fazi reakcije, a potom alkilovanje 1-fenilpiperazina (**92**) u drugoj fazi reakcije kako bi se dobilo jedinjenje **93**.

U literaturi postoji veliki broj opsanih postupaka za sintezu benzimidazola¹¹⁵. Prilikom sinteze 2-hlormetilbenzimidazola ispitano je više reakcionih uslova:

1. Filipsovi uslovi¹¹⁶ koji podrazumevaju reakciju o-fenilendiamina i hlorsirćetne kiseline u prisustvu 6N HCl, pod reflusom u trajanju od 24 h.
2. Filipsovi uslovi u prisustvu kisele smole-Dowex-a.
3. Reakcija o-fenilendiamina i hloracetilhlorida na sobnoj temperaturi u dihloretanu kao rastvaraču u trajanju od 18 sati.
4. Sinteza 2-hlor-N-(2-nitrofenil)acetamida reakcijom o-nitroanilina i 2-hloracetilhlorida u prisustvu trietil amina kao baze u dihloretanu kao rastvaraču, na sobnoj temperaturi. Posle ovoga bi sledila reduktivna ciklizacija u 2-hlormetilbenzimidazol. Reakcija se odvija tako što se u ohlađen rastvor kalaj (II) hlorida u koncentrovanoj hlоровodoničnoj kiselini dodaje 2-hlor-N-(2-nitrofenil)acetamid u porcijama. Reakciona smeša se potom zagreva uz refluks u trajanju od 18 časova.



Shema 7. Planirani sintetički put dobijanja liganda **93**

Reakcioni uslovi: a) jedinjenje **89**, hlorsirćetna kiselina, 6N HCl, refluks 4 h; b) jedinjenje **89**, hlorsirćetna kiselina, 6N HCl, refluks, Dowex, c) jedinjenje **89**, hloracetilhlorid, dihloretan; d) jedinjenje **90**, 2-hloracetilhlorid, Et_3N , dihloretan, SnCl_2 , ccHCl ; e) K_2CO_3 , Et_3N , metil etil keton (MEK), 80°C

Od ispitanih reakcionih uslova zadovoljavajući prinos daje reakcija pod Filipsovim uslovima (80%), dok reakcija u prisustvu kisele smole Dowex ne daje očekivani proizvod.

Reakcijom o-fenilendiamina i hloracetilhlorida u metilen hloridu kao rastvaraču, nastaje 2-hlormetilbenzimidazol, ali u niskom prinosu i malog stepena čistoće.

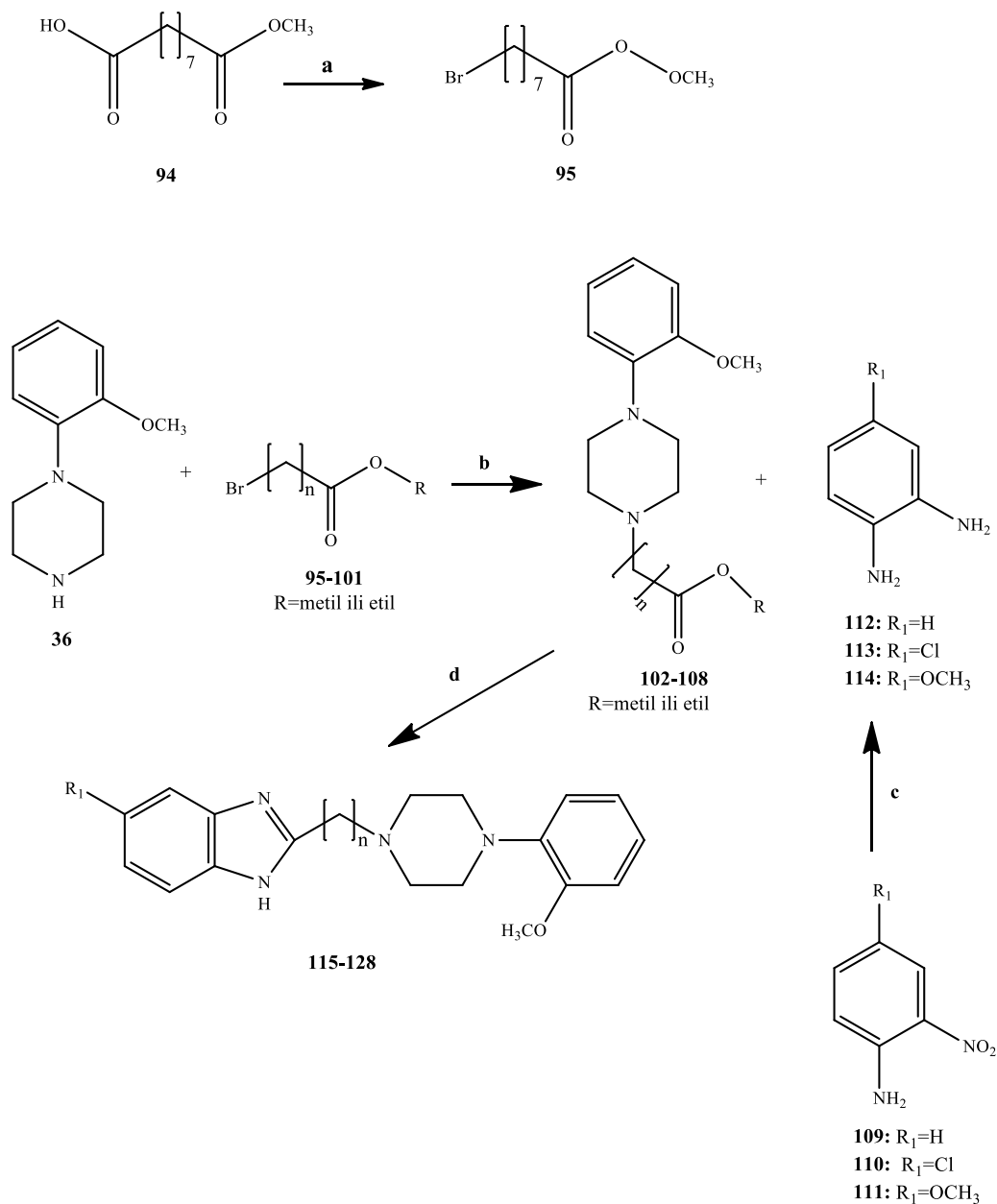
Reakcijom o-nitroanilina i 2-hloracetilhlorida u prisustvu trietil amina, kao baze, u dihloretanu nastaje 2-hlor-N-(2-nitrofenil)acetamid, ali reduktivna ciklizacija u kiseloj sredini daje smešu proizvoda iz koje nismo uspeli da izolujemo proizvod. U svim navedenim reakcijama dobijanja 2-hlormetilbenzimidazola najveći problem predstavlja njegova slaba rastvorljivost, pa se između ostalog i zbog toga odustalo od ovog sintetičkog puta.

Na ovaj način ne bi bilo moguće sintetisati jedinjenja sa dva ili više C atoma u mostu između benzimidazolskog i 1-(2-metoksifenil)piperazinskog dela molekula u dobrom prinosu, jer bi pri ovim reakcionim uslovima dolazilo do eliminacije i nastajali bi odgovarajući 2-alkenilbenzimidazoli, pa bi se zbog toga morali ispitati alternativni putevi dobijanja derivata 2-benzimidazola. To bi podrazumevalo recimo, sintezu 2-alkilcijanobenzimidazola, zatim njihovu hidrolizu do odgovarajućih karboksilnih kiselina, zatim pravljenje amida sa 1-(2-metoksifenil)piperazinom, a potom i njegovu redukciju do amina.

U daljem radu smo odlučili da ispitamo drugi pristup za dobijanje liganada benzimidazol-1-(2-metoksifenil)piperazinskog tipa, koji podrazumeva sintezu amino estara i njihovu ciklizaciju sa diaminima (*Shema 8*). Prednost ovog postupka u odnosu na prethodno opisani je manji broj faza, a i sve ligande je moguće dobiti pod istim reakcionim uslovima.

Kao polazno jedinjenje za sintezu liganada **115-128** iskorišteni su komercijalno dostupni metil- ili etil-haloestri **96-101** i metil 8-bromooktanoat **95** koji je sintetisan modifikovanom Hunsdiecker-ovom reakcijom¹¹⁷.

Borodin i Hunsdiecker su u svojim originalnim radovima u prvom koraku reakcije sintetisali anhidrovane srebro-karboksilate. Ove soli u reakciji sa bromom daju odgovarajuće alkil-halogenide sa jednim C atomom manje u nizu u odnosu na karboksilnu kiselinu koja je korištena kao polaz. Obzirom da je teško napraviti anhidrovane soli Ag(I), jer su jako nestabilne, reakcija je kasnije modifikovana korišćenjem Hg(II) soli, TI (I) soli itd^{118, 119}. U ovom radu je korišten crveni živa (II) oksid koji u kombinaciji sa bromom dopušta direktnu upotrebu karboksilnih kiselina kao substrata¹²⁰, što znatno olakšava izvođenje reakcije. Pri radu sa živa (II) oksidom



ligand	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128
R	H	H	H	H	H	H	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	Cl
n	1	2	3	4	5	6	7	4	5	6	7	4	5	6

Shema 8. Sintetički put za dobijanje liganada **115-128**

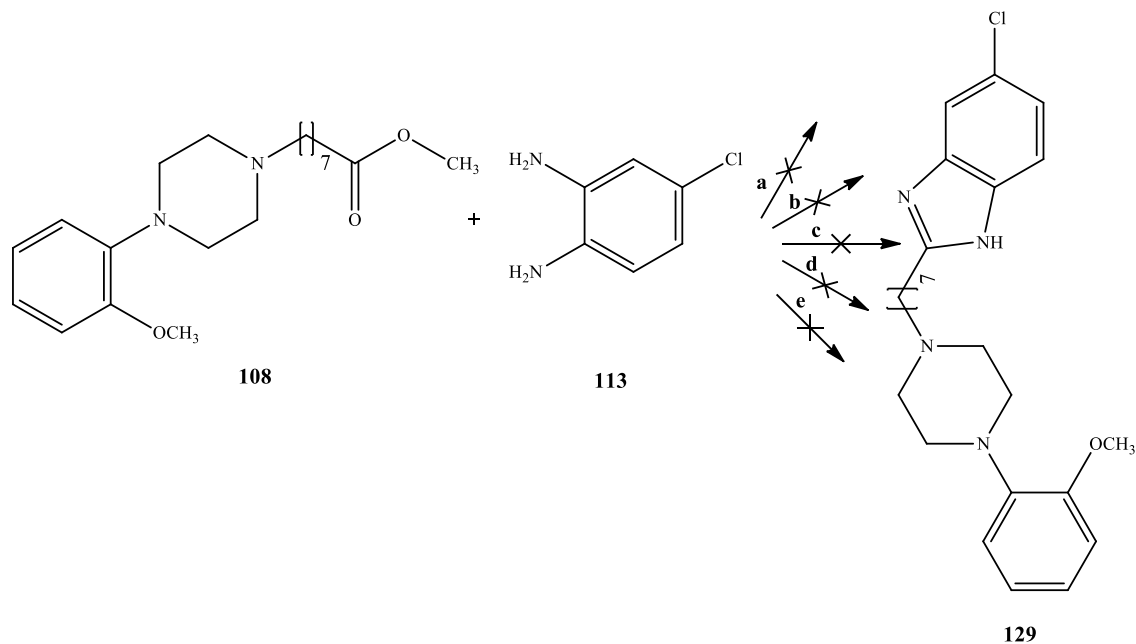
Reakcioni uslovi: a) Br₂, crveni HgO, anh. MgSO₄, CH₂Cl₂, 46 °C; b) K₂CO₃, Et₃N, metil etil keton (MEK), 80 °C, 24h; c) Rany-Ni, 1,2-dihloretan, hidrazin-hidrat, 30 °C d) 50% metansulfonska kiselina, M.W. 180 °C, 300 W, 45 min.

treba biti pažljiv jer je toksičan i ukoliko dospe u organizam (udisanjem aerosola, preko kože ili gutanjem), može da izazove oštećenje bubrega.

U rastvor mono metil estra azelainske kiseline **94** u CCl_4 dodaje se prvo anhidrovani magnezijum-sulfat, a potom veoma pažljivo i živa (II) oksid na sobnoj temperaturi. Smeša se greje na $80\text{ }^\circ\text{C}$ uz ukapavanje broma. Tok reakcije se prati hromatografski. Nakon završetka reakcije, reakciona smeša se ohladi na sobnu temperaturu i procedi kroz dijatomejsku zemlju. Višak rastvarača se upari, a proizvod je destilacijom pod sniženim pritiskom odvojen od ostatka reakcione smeše i dobijen u prinosu od 51%.

Alkilovanje 1-(2-metoksifenil)piperazina odgovarajućim metil ili etil haloestrom izvedeno je u metil etil ketonu korišćenjem anhidrovanog kalijum-karbonata kao baze uz zagrevanje na $80\text{ }^\circ\text{C}$. Tok reakcije se prati hromatografijom na tankom sloju. Nakon završetka reakcije (24h) reakciona smeša se obradi i nastaju proizvodi **102-108** u prinosu od 51-95%.

U sledećoj fazi reakcije odgovarajući amino estri **102-108**, prevedeni su u benzimidazole ciklizacijom sa diaminima **112-114**. Prethodno je bilo neophodno izredukovati nitro grupu nitroanilina **109-111** kako bi se dobili diamini. U literaturi je opisan veliki broj reakcija za redukciju nitro grupe. Najzastupljenije su redukcije pomoću metala $\text{Zn}^{121,122,123}$, $\text{Fe}^{124,125}$, $\text{Sn}^{126,127}$ i pomoću vodonika u prisustvu katalizatora^{128,129,130}. Ovom prilikom smo se odlučili za redukciju pomoću Ra-Ni i hidrazina u smeši dihlortetana i etanola²⁷, jer je na osnovu višegodišnjeg iskustva u našoj laboratoriji izabran ovaj pristup zbog jednostavnog izvođenja reakcije i visokih prinosa proizvoda. Nitro jedinjenje se rastvori u smeši etanola i dihloretana. Potom se prvo doda hidrazin-hidrat, a onda i Ra-Ni u malim porcijama. Smeša se meša na sobnoj temperaturi dok ne izreaguje nitro jedinjenje. Hromatografija na tankom sloju pokazuje nastajanje dva proizvoda od kojih jedan nestaje kada se smeša zagreje na temperaturi od $50\text{ }^\circ\text{C}$. Pretpostavljamo da je jedan od njih intermedijer koji zagrevanjem reakcione smeše prelazi u amin. Obrada reakcione smeše obuhvata ceđenje kroz dijatomejsku zemlju kako bi se odstranio Ra-Ni, a potom se filtrat uparava na sniženom pritisku do suva. Dobijeni amini se ne prečišćavaju dalje, već se kao takvi koriste za dobijanje benzimidazola **115-128**.



Shema 9. Pristupi u sintezi jedinjenja **129**

Reakcioni uslovi: a) 4N HCl, 180 °C; 24h, b) PPA, 180 °C; c) 4N HCl, 180 °C, MW, 300 W, d) 50% CH₃SO₃H, 180 °C, MW, 300 W; e) 4N HCl, 180 °C, MW, 300 W

Za dobijanje krajnjih proizvoda **115-128**, ciklizacijom odgovarajućih diamina i amino-estara, ispitano je više reakcionih uslova. Većinja njih nije davala kao proizvode ligande **115** i **116**. Pretpostavljamo da su razlog tome izražene sterne smetnje koje se javljaju prilikom ciklizacije.

1. Filipsovi uslovi podrazumevaju reakciju odgovarajućeg amino estera sa diaminom u rastvoru 4N HCl uz refluks. Ovim putem se uspešno dobija jedinjenje **117** u prinosu od 86%, dok ligande **115** i **116** nismo uspeli izolovati.
2. U pokušaju da sintetišemo jedinjenja **115** i **116** zagrevali smo amino estre **102** i **103** sa diaminom **112** na 180 °C u prisustvu PPA¹³¹. Nismo uspeli da izolujemo i prečistimo proizvode.
3. U reakciji amino estara **102** i **103** sa diaminom **112** u prisustvu 4N HCl u mikrotalasnom reaktoru na temperaturi od 180 °C i snazi od 300W, u toku

10 min. dobija se smeša jedinjenja iz koje nije moguće izolovati željene proizvode **115** i **116**.

4. U reakciji amino estra **102** i **103** i diamina **112** u 50% metansulfonskoj kiselini u mikrotalasnom reaktoru na temperaturi od 180 °C i maksimalnoj snazi od 300W u toku 30 min. dobijaju se željeni proizvodi **115** i **116**. Ligandi su izolovani u niskom prinosu od 16% i 36%. Kasnije je ovaj metod primenjen i na ostale amino estre i diamine i dobijeni su proizvodi **117-128** u prinosu od 48%-90%.

U planu je bila i sinteza jedinjenja **129** prikazanog na *Shemi 9*. Nažalost, ni jedan od gore pomenutih postupaka za ciklizaciju diamina i aminoestra nije dao očekivane rezultate.

3.3. Rezultati ispitivanja aktivnosti nivosintetisanih liganada

Posle sinteze i karakterizacije (IR, NMR, LC-MS), ligandi su okarakterisani farmakološki tj. određen je njihov afinitet vezivanja za dopaminske D2, serotoninske 5HT2a i $\alpha 1$ adrenergičke receptore.

Sinaptosomalne membrane, obogaćene dopaminskim D2 receptorima, izolovane su iz bazalne ganglije (*corpus striatum*), a sinaptosomalne membrane koje sadrže 5HT2a i $\alpha 1$ receptore iz prednje trećine kore velikog mozga (*frontal cortex*) pacova.

Za specifično obeležavanje radioligandima korišćeni su: [^3H]-spiperon za D2 receptore, [^3H]-ketanserin za 5HT2a receptore i [^3H]-prazosin za $\alpha 1$ receptore.

Testovima kompetitivnog vezivanja novih liganada za membranske receptore u prisustvu specifičnih radioliganada u *in vitro* uslovima, dobijene su vrednosti parametra K_i predstavljene kao srednja vrednost iz najmanje tri eksperimenta i izražene su u nanomolovima.

3.3.1. Rezultati kompetitivnog vezivanja liganada 1-(2-metoksifenil)piperazinskog tipa sa piperidinom u mostu

3.3.1.1. Rezultati kompetitivnog vezivanja 1-(1-benzilpiperidin-4-il)-4-(2-metoksifenil)piperazina i 1-(2-metoksifenil)-4-[1-(benzilpiperidin-4-metil)piperazina i njihovih nitro derivata

Karakteristike vezivanja novih jedinjenja **49-56** za dopaminske D2, serotoninске 5HT2a i α 1 adrenergičke receptore dati su u *Tabeli 6*.

Tabela 6. Afinitet i selektivnost vezivanja liganada **49-56** za D2, 5HT2a i α 1 receptore

Broj liganda	n	R	Ki (nM) \pm S.E.M		
			D2	5HT2a	α 1
49	0	H	736 \pm 24	>1000	>1000
50	0	2-NO ₂	521,5 \pm 13	>1000	134 \pm 15
51	0	3-NO ₂	937,5 \pm 35	>1000	229 \pm 24
52	0	4-NO ₂	>1000	>1000	148 \pm 13
53	1	H	341,5 \pm 12	>1000	301 \pm 19
54	1	2-NO ₂	30,6 \pm 1.2	>1000	191 \pm 12
55	1	3-NO ₂	258 \pm 11	>1000	434 \pm 16
56	1	4-NO ₂	200 \pm 12	>1000	406 \pm 22

Od svih jedinjenja u ovoj seriji, visok afinitet vezivanja za dopaminske D2 receptore ispoljava jedino ligand **54** (odnosno ligand sa nitro grupom u položaju 2 i metilenskim mostom između piperidinskog i piperazinskog prstena) sa Ki vrednošću od 30.6 nM i ponaša se kao selektivni ligand za ovu klasu receptora. Ligandi **50**, **53**, **55** i **56** pokazuju umeren afinitet vezivanja za D2 receptore sa manjim Ki vrednostima (200-521nM), dok su jedinjenja **51** i **52** neaktivna u odnosu na ovaj receptor.

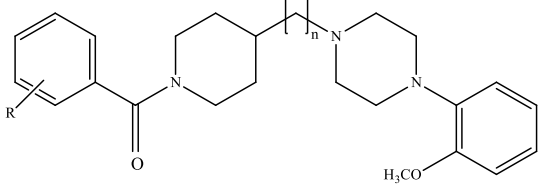
Sintetisani ligandi **49-56** ne stupaju u kompeticiju sa [³H]-ketanserinom, odnosno ne poseduju aktivnost ka 5HT2a receptorima.

Uvođenje nitro grupe kao supstituenta povećava afinitet svih sintetisanih liganada prema adrenergičkim α1 receptorima.

3.3.1.2. Rezultati kompetitivnog vezivanja {4-[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il]piperidin-1-il}fenilmetanona i (4-{[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il]metil}piperidin-1-il)fenilmetanona i njihovih nitro derivata

Iz ove grupe jedinjenja uspešno je sintetisano osam jedinjenja i određen je njihov afinitet vezivanja za dopaminske D2, serotoninske 5HT2a i α1 adrenergičke receptore. Rezultati bioloških aktivnosti datih liganada prikazan je u **Tabeli 7**.

Tabela 7. Afinitet i selektivnost vezivanja liganada **61-68** za D2, 5HT2a i α1 receptore

					
Broj liganda	n	R	D2	5HT2a	α1
			Ki (nM) ±S.E.M		
61	0	H	>1000	>1000	267.5± 18,2
62	0	2-NO ₂	>1000	>1000	>1000
63	0	3-NO ₂	755±21	>1000	546±15
64	0	4-NO ₂	905±28	>1000	579,5±9
65	1	H	189,5±12,1	>1000	304,5±12,1
66	1	2-NO ₂	219,5±14,4	>1000	>1000
67	1	3-NO ₂	300±16	>1000	440±21
68	1	4-NO ₂	334,5±17,8	>1000	260±19

Ligandi sa nitro grupom u položaju 3 i 4 kod kojih su piperidinski i piperazinski prstenovi direktno vezani, **63** i **64**, ispoljavaju slab afinitet vezivanja ka ovoj klasi receptora, dok nesupstituisani ligand **61** i ligand sa nitro grupom u položaju 2, **62**, ne pokazuju aktivnost ka D2 receptorima. Obrnuta situacija je kod liganada gde su piperidinski i piperazinski prstenovi povezani metilenskom grupom. Naime, ligandi **66-68** sa nitro grupom u položaju 2, 3 i 4 pokazuju slabiji afinitet vezivanja za dopaminske D2 receptore u odnosu na nesupstituisani ligand **65**.

Ligandi **61-68** ne stupaju u kompeticiju sa [³H]-ketanserinom, odnosno ne pokazuju aktivnost ka 5HT_{2a} klasi receptora.

Ligandi **61, 63, 64, 65, 67** i **68** poseduju umeren afinitet vezivanja za α 1 receptore sa Ki vrednostima u rasponu od 260-579 nM. Uvođenje nitro grupe u položaj 2, **62** i **66**, dovodi do smanjenja aktivnosti liganada ka ovoj klasi receptora, što može da ukazuje na postojanje sternih smetnji u ovom položaju.

3.3.1.3. Rezultati kompetitivnog vezivanja 1-{4-[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il]piperidin-1-il}-2-feniletanona, 1-(4-{[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il]metil}piperidin-1-il)-2-feniletanon i njihovih nitro derivata

Parametri vezivanja novosintetisanih jedinjenja **73-80** za određene klase receptora date su u *Tabeli 8*.

Ligandi **78** i **79** ispoljavaju umerenu aktivnost ka dopaminskim D2 receptorima, dok jedinjenja **73-77** i **80** ne pokazuju aktivnost ka ovoj klasi receptora. Uvođenje nitro grupe u molekul ima efekta samo kod liganada sa nitro grupom u položaju 2 ili 3, **78** i **79**, a kod kojih su piperidinski i piperazinski prstenovi povezani metilenskom grupom, jer dovodi do povećanja aktivnosti ka D2 receptorima u odnosu na nesupstituisani ligand **77**.

Ligandi iz ove serije nisu pokazali afinitet ka vezivanju za serotoninske 5HT_{2a} receptore.

Visok afinitet vezivanja za $\alpha 1$ receptore ispoljavaju jedinjenja **73** i **77** sa konstantom vezivanja od 50,1 i 39 nM, redom. Ligandi **74**, **75**, **78** i **79** poseduju umeren afinitet vezivanja za ovu klasu receptora, dok su ligandi **76** i **80** neaktivni prema ovoj klasi receptora. Primetno je da uvođenjem nitro grupe u molekul opada aktivnost ka ovoj klasi receptora.

Tabeli 8. Afinitet i selektivnost vezivanja liganada **73-80** za D2, 5HT2a i $\alpha 1$ receptore

Broj liganda	n	R	D ₂	5HT2a	$\alpha 1$
			Ki (nM) \pm S.E.M		
73	0	H	>1000	>1000	50,1 \pm 5,8
74	0	2-NO ₂	>1000	>1000	110 \pm 12,6
75	0	3-NO ₂	708 \pm 31	>1000	287 \pm 6
76	0	4-NO ₂	>1000	>1000	>1000
77	1	H	>1000	>1000	39 \pm 1
78	1	2-NO ₂	450 \pm 21	>1000	448,5 \pm 16,2
79	1	3-NO ₂	146 \pm 9	>1000	346,5 \pm 15,2
80	1	4-NO ₂	>1000	>1000	>1000

3.3.1.4. Rezultati kompetitivnog vezivanja 1-(2-metoksifenil)-4-(1-fenilpiperidin-4-il)piperazin i 1-(2-metoksifenil)-4-[(1-fenilpiperidin-4-il)metil]piperazin i njihovih nitro derivata

Parametri vezivanja novosintetisanih liganada **81-88** dati su u **Tabeli 9**.

Uvođenje nitro grupe u molekule kod kojih su piperidinski i piperazinski prstenovi direktno povezani, **81-84**, dovodi do povećanja afiniteta ka D2 receptorima. Najveći uticaj na povećanje aktivnosti ka ovoj klasi liganada ima nitro grupa u položaju 3, **83**. Slična je situacija i u seriji liganada kod kojih su piperidinski i piperazinski prstenovi povezani metilenskom mostom, **85-88**. Ligand **87** sa nitro grupom u položaju 3 pokazuje visok afinitet ka vezivanju za dopaminski D2 receptor sa vrednošću

Ki=54,2 nM i ponaša se kao selektivni ligand za ovu klasu receptora. Ligand **86** sa nitro grupom u položaju 2 poseduje umeren afinitet vezivanja za D2 receptore, dok ligand **88** sa nitro grupom u položaju 4 ne pokazuje aktivnost ka ovoj klasi receptora.

U seriji sintetisanih liganada **81-88**, najveći afinitet ka vezivnju za 5HT2a receptore poseduje nesupstituisani ligand **85**. Uvođenjem nitro grupe u molekule **86-88** postepeno opada aktivnost ka ovoj klasi receptora.

Tabela 9. Afinitet i selektivnost vezivanja liganada **81-88** za D2, 5HT2a i α 1 receptora

Broj liganda	n	R	Ki (nM) \pm S.E.M		
			D ₂	5HT2a	α 1
			81	0	H
82	0	2-NO ₂	500 \pm 15	560 \pm 20	324 \pm 13
83	0	3-NO ₂	229 \pm 12	634,5 \pm 13,4	>1000
84	0	4-NO ₂	360 \pm 17	>1000	>1000
85	1	H	>1000	293,5 \pm 13,6	690 \pm 18
86	1	2-NO ₂	319 \pm 11	487 \pm 22	>1000
87	1	3-NO ₂	54 \pm 2	550,5 \pm 6,3	>1000
88	1	4-NO ₂	>1000	>1000	678 \pm 22

Umeren afinitet ka vezivanju za α 1 receptore u seriji sintetisanih jedinjenja **81-88** poseduje ligand **82** sa nitro grupom u položaju 2 i direktno povezanim piperazinskim i piperidinskim prstenovima, dok su ostali ligandi u seriji neaktivni na ovoj klasi receptora.

3.3.2. Rezultati kompetitivnog vezivanja liganada benzimidazol-1(2-metoksifenil)piperazinskog tipa

Parametri vezivanja nosintetisanih liganada **115-128** dati su u *Tabeli 10*.

Ligandi **119**, **120**, **123** i **127** poseduju visok afinitet vezivanja za dopaminske D2 receptorima sa Ki vrednostima u rasponu od 12-25 nM. Ligandi **122**, **124**, **126** i **128** pokazuju umeren afinitet vezivanja za D2 receptore. Ligandi **123**, **124** i **127** se ponašaju kao selektivni ligandi za ovu klasu receptora. Primetno je da ligandi sa pet ili šest C atoma u mostu između 2-metoksifenilpiperazinskog i benzimidazolskog dela molekula predstavljaju optimalnu dužinu neophodnu za ispoljavanje povećanog afiniteta ka D2 receptorima. Takođe, molekul sa 5C atoma u mostu i sa metoksi grupom kao supstituentom u benzimidazolskom prstenu **123** poseduje veći afinitet vezivanja za ovu klasu receptora od odgovarajućeg nesupstituisanog analoga **119** i analoga sa hlorom kao supstituentom u položaju 5 benzimidazolskog dela molekula **127**. Uzrok ovome je verovatno taj što za razliku od hlora kao supstituenta, metoksi grupa ima mogućnost da nagradi vodoničnu vezu sa bočnim ostacima amino kiselina u vezivnom mestu D2 receptora.

Tabela 10. Afinitet i selektivnost vezivanja liganada **115-128** za D2, 5HT2a i $\alpha 1$ receptora

Broj liganda	n	R	D ₂	5HT2a	$\alpha 1$
			Ki (nM) \pm S.E.M		
115	1	H	>1000	>1000	>1000
116	2	H	>1000	346 \pm 11	79 \pm 4
117	3	H	>1000	388 \pm 24	69 \pm 10
118	4	H	>1000	400 \pm 4	64 \pm 1
119	5	H	23.6 \pm 0.4	257 \pm 15	22 \pm 2
120	6	H	16 \pm 2	263 \pm 22	82 \pm 11
121	7	H	>1000	327 \pm 20	>1000
122	4	OCH ₃	124 \pm 5	161 \pm 15	96 \pm 5
123	5	OCH ₃	12 \pm 3	451 \pm 21	301 \pm 22
124	6	OCH ₃	76 \pm 8	363 \pm 18	654 \pm 30
125	7	OCH ₃	>1000	>1000	>1000
126	4	Cl	109 \pm 9	202 \pm 24	248 \pm 5
127	5	Cl	25 \pm 3	332 \pm 18	107 \pm 5
128	6	Cl	102 \pm 3	206 \pm 22	240 \pm 23

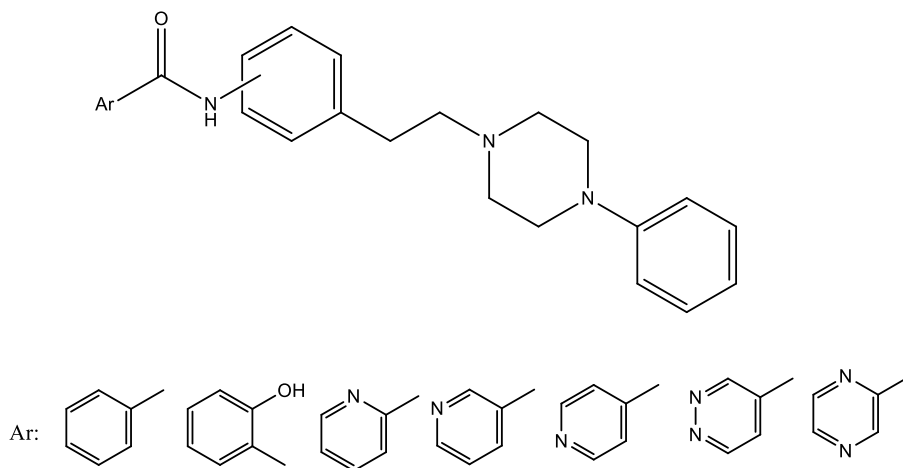
Povećavanjem dužine mosta između 2-metoksifenil piperazinskog i nesupstituisanog benzimidazolskog dela molekula, **115-121**, od 1 do 7 C atoma povećava se i afinitet vezivanja liganada za 5HT2a receptore. U slučaju liganada sa supstituentom u položaju 5 na benzimidazolskom prstenu **122-128**, bilo da je u pitanju metoksi ili hlora grupa, sa povećavanjem dužine mosta od 4 do 6 ili 7 C atoma dolazi do opadanja afiniteta vezivanja ka 5HT2a receptorima. Kod liganda sa 7 C atoma u mostu i metoksi grupom kao supstituentom u benzimidazolskom delu molekula **125** dolazi do naglog pada aktivnosti ka 5HT2a receptorima u odnosu na ligande **122-124**. Uvođenjem supstituenta (-OCH₃ ili -Cl) u benzimidazolski deo molekula kod liganada sa četiri C atoma u mostu opaža se pad u aktivnosti ka 5HT2a receptorima. Isti slučaj je i sa ligandima sa 5, 6 ili 7 C atoma u mostu.

Slično kao i u slučaju vezivanja za 5HT2a receptore, povećavanjem dužine mosta u seriji sintetisanih liganada **115-120** povećavanjem broja C atoma u mostu između 2-metoksifenilpiperazinskog i benzimidazolskog dela molekula dolazi do porasta aktivnosti ka α 1 receptorima. Uvođenjem metoksi grupe kao supstituenta, **122-125**, dolazi do opadanja aktivnosti ka ovoj klasi receptora. U seriji liganada koji u benzimidazolskom delu molekula imaju hlor kao supstituent, **126-128**, ligand sa 5 C atoma u mostu poseduje najveći afinitet vezivanja za α 1 receptore. Uvođenjem supstituenta (-OCH₃ ili -Cl) u benzimidazolski deo molekula kod liganada sa četiri C atoma u mostu opaža se pad u aktivnosti ka α 1 receptorima. Isti slučaj je i sa ligandima sa 5 i 6 C atoma u mostu.

3.4. Rezultati doking analize novosintetisanih liganada

Ispitivanje uticaja strukture liganda na njegov afinitet vezivanja za D2 receptore i modelovanje ovog receptora je godinama u fokusu istraživanja u našoj laboratoriji. Tokom godina sintetisan je veliki broj arilpiperazinskih derivata koji su biološki okarakterisani. Ispitan je, između ostalog i uticaj tipa supstitucije (*orto*, *meta*, *para*), dužine, fleksibilnosti, kao i uticaj supstituenata u aromatičnom delu molekula na

njegovu aktivnost ka dopaminskim D2 receptorima. Koristeći kristalnu strukturu D3 receptora od strane naše istraživačke grupe predložen je model D2 receptora koji poseduje dva mesta vezivanja: ortosterno mesto vezivanja (OBS) i alternativno mesto vezivanja koje delimično formira i druga ekstracelularna petlja (ec12)⁹³. Kako bi se ispitala validnost predloženog modela sintetisana je serija N-{[2-(4-fenil-piperazin-1il)-etil]-fenil}arilamida u koju čine su ligandi različitog oblika (*Slika 22*).



Slika 22. Struktura N-{[2-(4-fenil-piperazin-1il)-etil]-fenil}arilamida

Jedinjenja sa arilamidnim supstituentom u *orto* položaju nisu aktivna na dopaminsku D2 klasu receptora. Ligandi sa arilamidnim supstituentom u *meta* položaju poseduju visok i umeren afinitet vezivanja za ovu klasu receptora sa K_i vrednostima u intervalu od 71,6 do 470,8 nM, kao i jednjenja sa supstituentom u *para* položaju K_i od 19,41 do 722,7 nM.

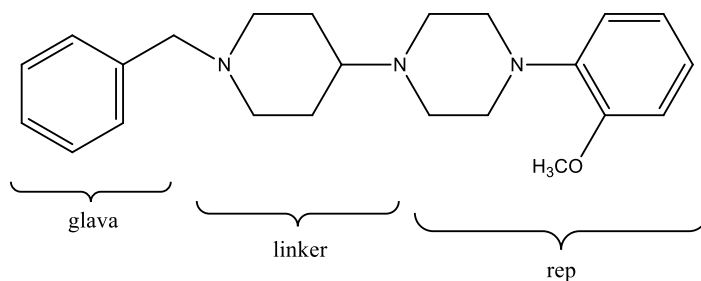
Doking analiza sintetisanih liganada na dopaminskom D2 receptoru je pokazala da svi aktivni ligandi iz ove serije (*meta* i *para* supstituisani) ostvaruju zajedničke interakcije sa ortosternim mestom vezivanja. Ove interakcije uključuju formiranje sonog mosta između protonovanog azota i Asp 114 (3.32), interakcije (edge to face, π - π steking interakcije itd.) između arilpiperazina i Phe 386 (6.44), Trp 390 (6.48), Tyr 420 (7.43) i formiranje vodonične veze između arilpiperidinskog dela molekula i Ser 194 (5.43) ili Ser 197 (5.46) i Ser 167 (4.57). Ligandi sa supstituentom u *para* položaju su linearnog oblika, duži su i mogu da dosegnu alternativno mesto vezivanja koje je smešteno u ec12 pri čemu se ostvaruju hidrofobne interakcije između aromatičnog dela

liganda i Ile 166, Leu 170, Leu 171, Ile 184, Phe 189, Val 190, Ile 397, His 397 i polarne interakcije između aromatičnog dela liganda i Asn 175.

U skladu sa ovim rezultatima sintetisali smo četiri serije 1-(2-metoksifenil)piperazina sa piperidinom u mostu (**49-56**, **61-68**, **73-80**, **81-88**). Cilj nam je bio da zahvaljujući različitoj dužini, različitom tipu supstitucije (*orto*, *meta*, *para*), rigidnosti, kao i grupama sa različitim elektronskim efektima u aromatičnom delu molekula dobijemo ligande koji se različito orjentišu u vezivnom mestu D2 receptora. Za očekivati je da će interakcije koje ligandi ostvare sa ovom klasom receptora doprineti boljoj spoznaji dela receptora koji čini alternativno mesto vezivanja i druga ekstracelularna petlja, s obzirom na to da ovaj deo receptora nije dovoljno ispitan, kako u pogledu prostornog rasporeda A.K., tako i po pitanju ključnih interakcija sa ligandima. Dobijeni rezultati poslužiće za formiranje boljeg teorijskog 3D modela D2 receptora.

Urađena je preliminarna doking analiza novosintetisanih ligandata na modelu D2 receptora dobijenom prema kristalnoj strukturi D3 receptora⁹³.

Vezivno mesto receptora je određeno na osnovu eksperimentalnih rezultata¹³² i Šredinger modula za generisanje vezivnog mesta¹³³. Svi ligandi su dokovani u protonovanom obliku, uz upotrebu OPLS_2005 polja sila. Inicijalna pozicija liganda u vezivnom mestu je bila nasumična, s tim da je protonovani azot liganda, pozicioniran u bilizini Asp 114 (3.32) D2 receptora. Posle inicijalnog pozicioniranja, doking procedura je izvršena bez dodatnih ograničenja.



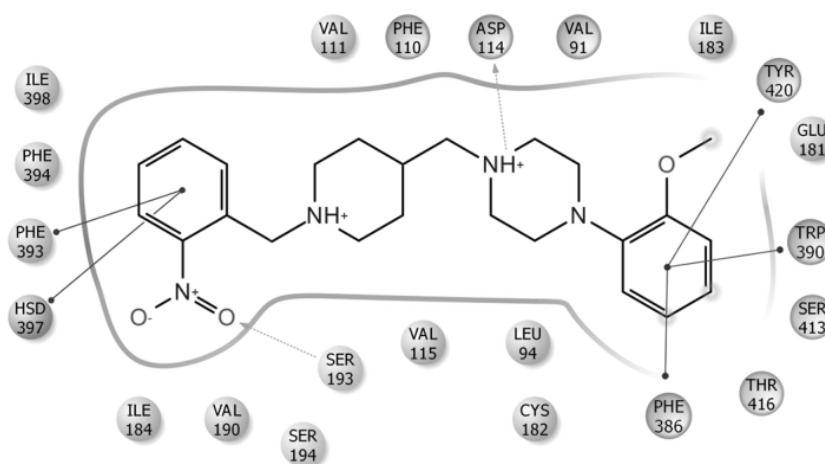
Slika 23. Delovi liganda (glava, linker, rep) prikazani na primeru 1-(1-benzilpiperidin-4-il)-4-(2-metoksifenil)piperazina (**49**)

Radi lakšeg objašnjavanja rezultata dobijenih preliminarnom doking analizom ligande smo podělili u tri celine (*Slika 23*):

1. Glava liganda koju čine benzil ili feniletil grupa u molekulu
2. Linker koji čini piperidinski deo molekula
3. Rep koji čini 1-(2-metoksifenil)piperazin.

Rep liganda je isti za sva ispitivana jedinjenja, dok su glava i linker podložni strukturnim promenama.

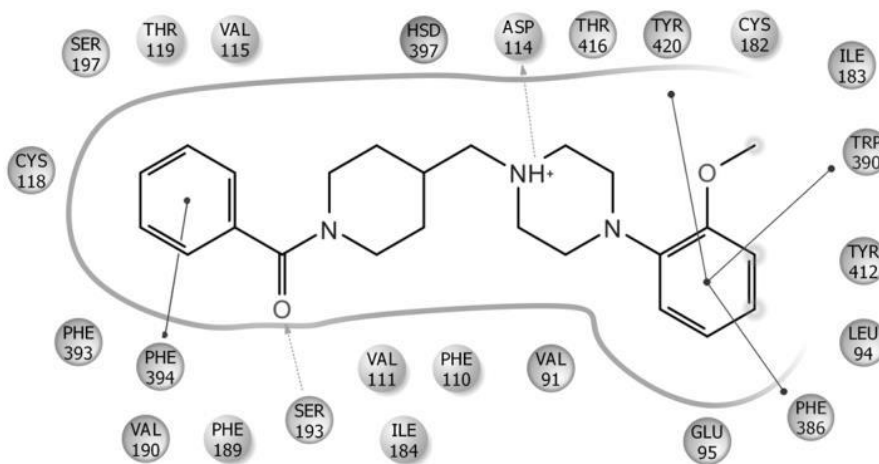
U seriji sintetisanih liganada **49-68**, jedinjenje **54** poseduje najveći afinitet vezivanja za dopaminske D2 receptore. Protonovani azot u repu liganda formira soni most sa Asp 114 (3.32), dok sam rep ostvaruje aromatične interakcije sa aminokiselinским ostacima u hidrofobnom džepu receptora: Phe 386 (6.44), Trp 390 (6.48), Tyr 420 (7.43). Na ovaj način ligand zauzima povoljnu poziciju za formiranje vodonične veze između nitro grupe u glavi liganda i Ser 193 (5.42). Navedene interakcije se ostvaruju između liganda i ortosternog mesta vezivanja D2 receptora (OBS). Doking analiza predviđa i formiranje hidrofobnih interakcija između glave liganda **54** i Phe 393 i His 397 u alternativnom mestu vezivanja receptora (*Slika 24*).



Slika 24. Rezultati doking analize jedinjenja **54**

Ligandi **55** i **56** zbog nepovoljne orijentacije koju zauzimaju u ortosternom mestu vezivanja nisu u mogućnosti da nagrađe vodoničnu vezu sa Ser 193 (5.42), što dovodi do smanjene aktivnosti ka dopaminskim D2 receptorima u odnosu na ligand **54**.

Ligandi **65-68** formiraju soni most sa Asp 114 (3.32), dok rep liganda ostvaruje aromatične interakcije sa amino kiselinama ostacima u hidrofobnom džepu [Phe 386 (6.44), Trp 390 (6.48), Tyr 420 (7.43)]. Kiseonik iz keto grupa u glavi liganda nagrađuje vodoničnu vezu sa Ser 193 (5.42). Glava liganada zbog smanjene fleksibilnosti ostvaruje aromatične interakcije samo sa Phe 394 u alternativnom mestu vezivanja dopaminskog D2 receptora, što dovodi do smanjene aktivnosti liganada **65-68** ka ovoj klasi receptora u odnosu na jedinjenje **54** (*Slika 25*).



Slika 25. Rezultati doking analize za ligand **65**

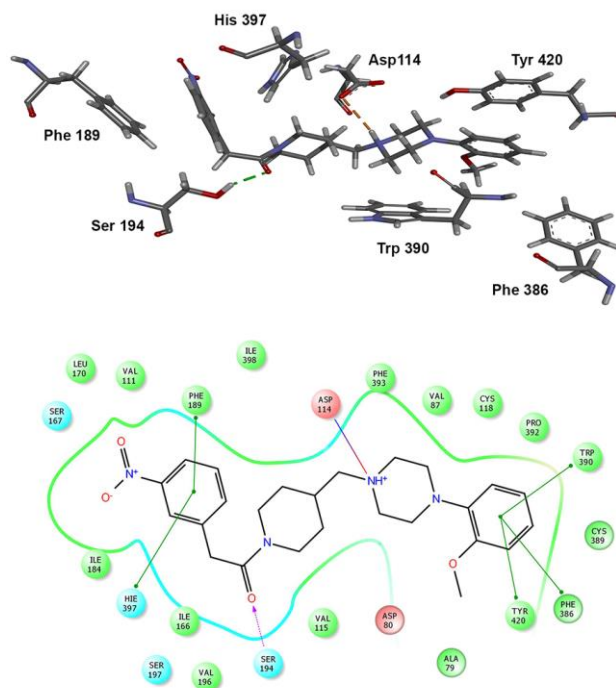
Ligandi **49-52**, **61-64** u ortosternom mestu vezivanja formiraju soni most sa Asp 114 (3.32). Rep liganda ostvaruje hidrofobne interakcije sa Phe 386 (6.44), Trp 390 (6.48), Tyr 420 (7.43). Zbog smanjene fleksibilnosti ovi molekuli nisu u stanju da nagrađe vodoničnu vezu sa Ser 193 (5.42), niti da ostvare interakcije sa amino kiselinama ostacima u alternativnom mestu vezivanja, te su neaktivni na ovoj klasi receptora. Produžavanjem linkera za metilensku jedinicu dobijaju se u svim slučajevima ligandi sa većim afinitetom vezivanja ka D2 receptorima, dok uvođenje nitro grupe u molekul ima efekta samo kod liganada **54**, koji pokazuje znatno veći

afinitet u odnosu na nesupstituisano jedinjenje **54**, jer nitro grupa formira vodoničnu vezu sa Ser 193(5.42).

Rezultati doking analize liganada **73-80** pokazuju da se ligandi vezuju u ortosternom mestu vezivanja na uobičajen način, tako što rep molekula formira soni most sa Asp 114 (3.32) i ostvaruje hidrofobne interakcije sa Phe 386 (6.44), Trp 390 (6.48), Tyr 420 (7.43). Linker i glava molekula zauzimaju prostor ograničen Asp 114 (3.32) i Ser 193(5.42) i Ser 194 (5.43).

Ligandi **73-76** nisu u stanju da zauzmu povoljnu orijentaciju u ortosternom mestu vezivanja receptora i da ostvare interakcije sa Ser 193 (5.42) i Ser 194 (5.43). Izuzetak je ligand **75** sa nitro grupom u položaju 3 aromatičnog dela molekula (glava liganda), preko koje ostvaruje slabu vodoničnu vezu sa Ser 194 (5.43), te zato ovaj ligand poseduje nešto veći afinitet vezivanja za dopaminske D2 receptore u odnosu na ligande **73, 74 i 76**.

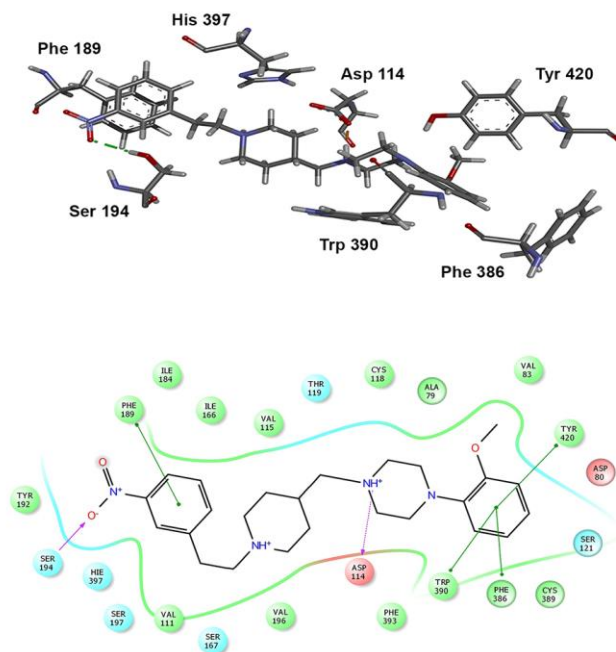
Uvođenjem dodatne metilenske grupe u linker **77-80**, molekul postaje duži i dobija mogućnost da slobodno rotira oko dva atoma ugljenika. Ovo dovodi do toga da ligandi **78 i 79** poseduju znatno veći afinitet vezivanja za D2 receptore u odnosu na **74 i 75**. Razlog tome je formiranje vodoničnih veza između kiseonika u keto grupi u glavi molekula **78 i 79** i Ser 194 (5.43) (*Slika 26*).



Slika 26. Rezultati doking analize jedinjenja **79**

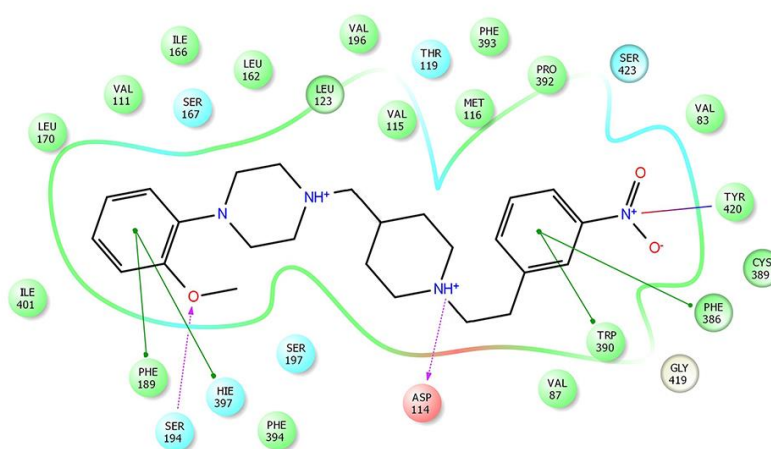
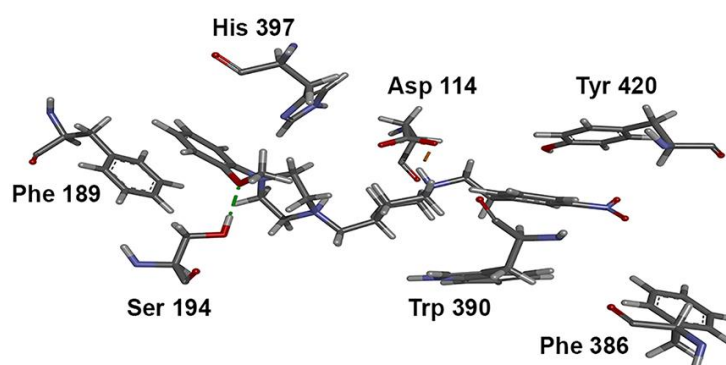
Kod liganada **81-88** na fiziološkom pH istovremeno su protonovani azot u piperidinskom (linker) i azot u piperazinskom delu molekula (rep). Shodno tome, postoje dva načina na koja se ovi ligandi mogu orijentisati u vezivnom mestu D2 receptora:

- Model po kojem se rep liganda smešta u ortosterno mesto vezivanja dopaminskog D2 receptora i ostvaruje hidrofobne interakcije sa Phe 386 (6.44), Trp 390 (6.48), Tyr 420 (7.43). Po ovom modelu glava liganda ostvaruje hidrofobne interakcije sa Phe 189 u alternativnom mestu vezivanja, a nitro grupa gradi vodoničnu vezu sa Ser 194 (5.43) (*Slika 27*).



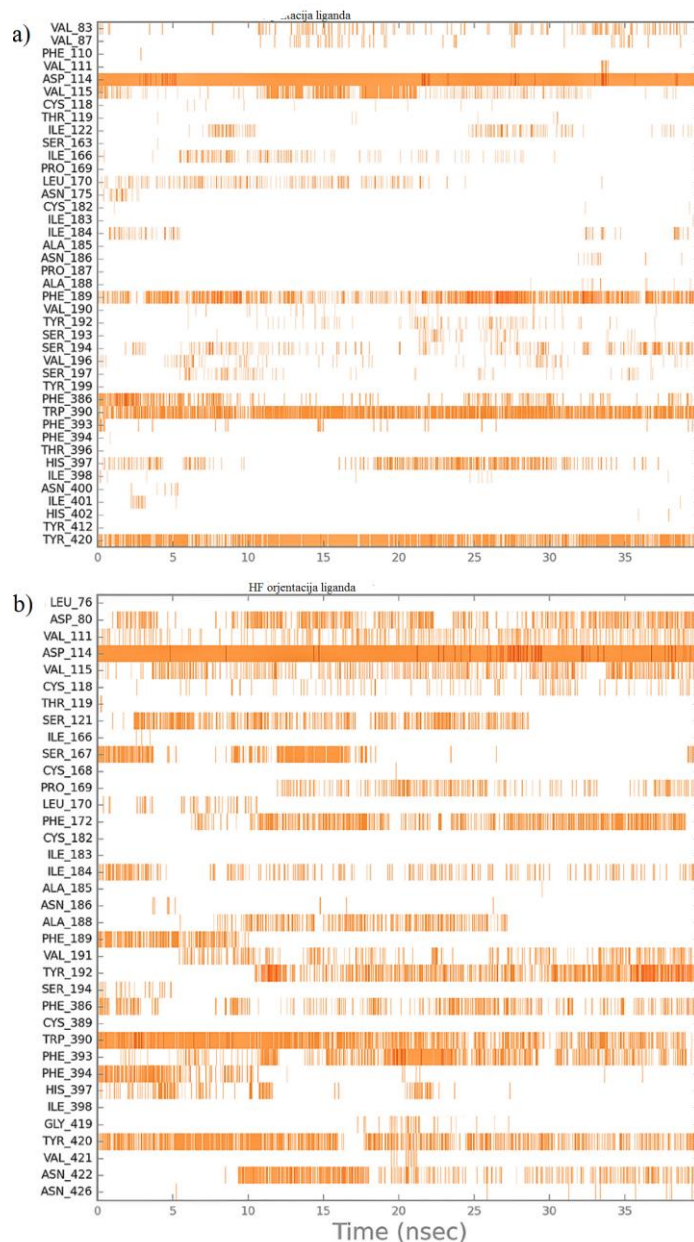
Slika 27. Model vezivanja liganda za D2 receptor kada je rep liganda smešten u ortosterno mesto vezivanja receptora prikazan na primeru liganda **87**

- Model po kojem se glava liganda smešta u ortosterno mesto vezivanja dopaminskog D2 receptora i ostvaruje hidrofobne interakcije sa A.K. u hidrofobnom džepu, dok OCH₃ grupa u repu liganda formira vodoničnu vezu sa Ser 194 (5.43). Nitro grupe u glavi liganda (**83**, **84**, **86** i **87**) grade vodonične veze sa Trp 390 (6.48) ili Tyr 420 (7.43) (**Slika 28**).



Slika 28. Model vezivanja liganda za D2 receptor kada je glava liganda smeštena u ortosterno mesto vezivanja receptora prikazan na primeru liganda **87**

Kako bi se odredila orijentacija liganda u mestu vezivanja dopaminskog D2 receptora poslužili smo se molekulskom dinamikom. Dobijeni rezultati ukazuju da je orijentacija liganada **81-88** u kojoj je glava smeštena u OBS stabilnija od one u kojoj se u ovo vezivno mesto receptora smešta rep liganda.. Na **Slici 29** prikazani su dijagrami koji opisuju prisutne interakcije između liganda **87** i aminokiselinskih ostataka u vezivnom mestu D2 receptora u toku 40 ns molekulske dinamike. Prvi dijagram opisuje interakcije koje se ostvaruju kada se se rep smešta u OBS, drugi u slučaju kada se glava smešta u OBS. Obe orijentacije liganda su stabilne tokom 40 ns molekulske dinamike, ali je broj interakcija koje ostvaruje glava liganda smeštena u OBS-u, daleko veći od interkacija koje ostvaruje rep liganda u OBS-u.



Slika 29. Dijagrami koji opisuju interakcije između liganda **87** i aminokiselinskih ostataka u ortosternom mestu vezivanja receptora u slučaju a) kada je rep smešten u OBS i b) kada je glava smeštena u OBS. Svaka narandžasta crtica predstavlja jednu ostvarenu receptor-ligand interakciju u jedinici vremena

Ligand u oba slučaja ostvaruje interakcije sa Asn 114 (3.32), ali kada je glava smeštena u OBS ligand ostvaruje interakcije sa Ser 167 (4.57) i Ser 121 (3.39), Tyr 192 (5.41), Phe 172 (4.62), koje nisu prisutne u slučaju kada se rep liganda smesti u ortosterno mesto vezivanja.

Ligandi **82** i **86** su u mogućnosti da nagrade slabu vodoničnu vezu sa Trp 390 (6.48) ili Tyr 420 (7.43). Ligand **86** poseduje nešto viši afinitet vezivanja za D2 receptore, verovatno je to posledica većeg stepena slobode u odnosu na **82**.

Ligand **87** poseduje visok afinitet vezivanja za D2 receptore i njegova dužina je optimalna za dobro vezivanje za D2 receptore. Glava liganda se smešta u ortosterno mesto vezivanja receptora ostvarujući hidrofobne interakcije sa Phe 386 (6.44), Trp 390 (6.48), a nitro grupa u glavi liganda gradi vodoničnu vezu sa Tyr 420 (7.43). Rep liganda ostvaruje hidrofobne interakcije sa Phe 187 i His 397 koji se nalaze u alternativnom mestu vezivanja, a nitro grupa gradi vodoničnu vezu sa Ser 194 (5.43) (*Slika 28*).

Ligand **88** je dugačak i ne može adekvatno da se smesti u vezivno mesto, pa zbog toga nije aktivan na ovoj klasi receptora.

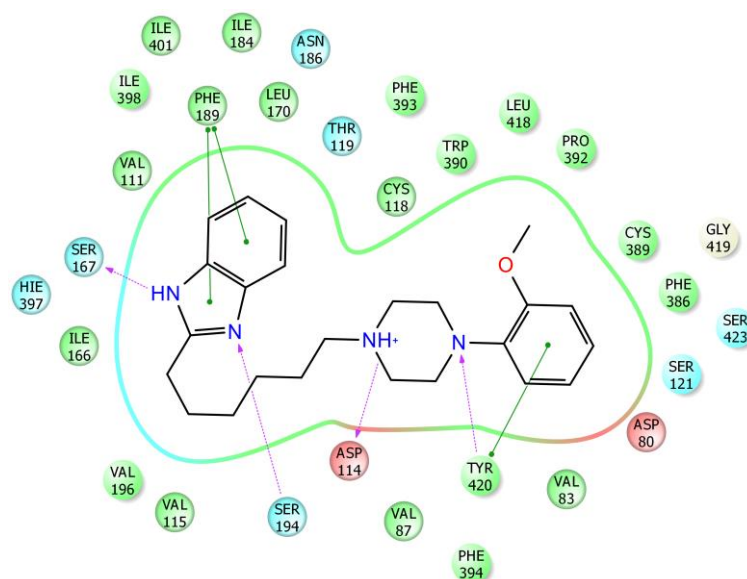
Oba azota su istovremeno protonovana i kod serije liganada **49-56** i kod njih je dominantna orijentacija molekula u kojoj se rep smešten u OBS (*Slika 24*). Kada se u vezivno mesto D2 receptora smesti glava molekula, tada je slobodna energija sistema ligand-receptor viša u odnosu na predhodni slučaj i zbog toga ova orijentacija liganda nije uzeta u dalje razmatranje. U seriji liganada **73-88**, dodavanje metilenske grupe u linker molekula utiče na porast afiniteta vezivanja za dopaminske D2 receptore. Uvođenje nitro grupe u aromatični deo glave molekula, utiče na porast aktivnosti ka D2 receptorima samo kada je nitro grupa u položaju 3, jer se tad formiraju dodatne vodonične veze koje nesupstituisani molekuli i molekuli sa nitro grupom u položaju 2 i 4 nisu u stanju da nagrade.

Zamena benzoil grupe fenilacetil grupom, **61-68**, ne utiče znatno na aktivnost, jer su dobijeni ligandi suviše rigidni da bi se povoljno orijentisali u ortosternom mestu vezivanja i formirali neophodne interakcije sa aminokiselinskim ostacima.

Međutim, zamena benzil-grupe u ligandima **49-56** fenetil-grupom **81-88** dovodi do drugačije orijentacije liganada u vezivnom mestu receptora. Značajna razlika u aktivnosti javlja se samo u slučaju liganda **87** koji je oko četiri puta aktivniji prema dopaminskim D2 receptorima, nego ligand **55**, jer je u stanju da nagradi dodatnu vodoničnu vezu sa Ser 194 (5.43). Ovaj način vezivanja liganada **81-88** u OBS-u je

neočekivan, ali je može biti značajan za dalja istraživanja na polju definisanja mesta vezivanja dopaminskih receptora.

Iz serije liganada **115-128** urađena je preliminarna doking analiza za jedinjenje **120** koje poseduje visok afinitet vezivanja za dopaminske D2 receptore. Ligand **120** formira soni most sa Asp 114 (3.32), dok rep liganda (2-metoksifenilpiperazinski deo) ostvaruje aromatične interakcije sa amino kiselinim ostacima u hidrofobnom džepu [Phe 386 (6.44), Trp 390 (6.48), Tyr 420 (7.43)]. Glava liganda (benzimidazolski deo) formira preko azotovih atoma vodonične veze sa Ser 167 (4.57) i Ser 194 (5.43) i hidrofobne interakcije sa Ile 166, Leu 170, Ile 184, Phe 189, Val 111, Ile 398, His 397 smeštenim u drugoj ekstracelularnoj petlji tj. alternativnom mestu vezivanja (*Slika 30*).



Slika 30. Rezultati doking analize za ligand **120**

4. EKSPERIMENTALNI DEO

Tačke topljenja su određivane na Boetius PHNK aparatu i nisu korigovane. Infracrveni (IR) spektri su snimani na spektrofotometru Thermo Scientific, ^1H NMR i ^{13}C NMR spektri na spektrofotometru Gemini 2000 (200 i 50 MHz), kao i na Bruker Ultrashied Advance III spektrofotometru (500 i 125 MHz) u CDCl_3 i d_6 -DMSO kao rastvaračima. Kao interni standard korišćen je tetrametilsilan. Maseni spektri su snimani na 6210 Time-of-Flight LC-MS sistemu (Agilent Technologies, Nemačka), dok je za analizu podataka korišćen MassHunter Workstation softver. Sinteze u mikrotalasnom reaktoru izvođene su u MicroSYNTH Milestone mikrotalasnom reaktoru. Tankoslojna hromatografija je rađena na pločama tipa POLYGRAM SIL G/UV254 od silika gela nanesenog na plastične folije (Macherey-Nagel, Nemačka), a supstance su prečišćavane "dry flash" hromatografijom za koju je korišćen Silika gel 60 (18-32). Za izolovanje membrana korišćen je homogenizer sa teflonskim tučkom koji pokreće elektromotor (B. Braun, Melsungen A.G., Nemačka) i ultracentrifuga BECKMAN L7-55. Radioaktivnost (Perkin-Elmer, Las GmbH, Rodgau, Nemačka) je merena na scintilacionom brojaču firme LKB Rackbeta Wallac1219.

4.1. Sinteza

Etil 4-[4-(2-metoksifenil)piperidin]-1-karboksilat (37): U jednogrlom balonu od 100 ml rastvori se 1,7 g (0,01 mol) 1-karbetoksi-4-piperidona (**35**) u 25 ml metanola (pH rastvora se podesi pomoću AcOH na 7) i doda se 3,24 g (0,02 mol) 1-(2-metoksifenil)piperazina (**36**). Uz mešanje se zatim dodaje 0,45 g (0,0072 mol) NaBH_3CN u porcijama, nakon čega se smeša meša 24 sata magnetnom mešalicom na sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije, reakciona smeša se zakiseli razblaženom HCl do pH 2, višak metanola se upari na vakuum uparivaču, a ostatak se zaalkališe 10% rastvorom NaOH i ekstrahuje metilen hloridom. Donji organski sloj se odvoji, osuši anh. Na_2SO_4 , procedi i upari na vakuum uparivaču. Dobijeni karbamat se prečišćava

hromatografski na silika gelu koristeći prvo metilen hlorid kao eluent, a potom i 1-5%-ne rastvore metanola u metilen hloridu. Prinos reakcije je: 88%. Ulje. **IR** (ATR, cm^{-1}): 2940,3, 1698,2, 1236,0, 1025,7, 757,0; **$^1\text{H-NMR}$** (200 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 1,25 (3H, t, $J=6,8$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1,46 (2H, qd, $J_1=4$ Hz, $J_2=12$ Hz, ^3CH i ^5CH piperidin), 1,87 (2H, d, $J=12,4$ Hz, piperidin), 2,45 (1H, tt, $J_1=11,2$ Hz, $J_2=3,4$ Hz, piperidin), 2,76-2,83 (6H, m, piperidin i piperazin), 3,02-3,15 (4H, m, piperazin), 3,85 (3H, s, OCH_3), 4,12 (2H, q, $J=6,8$ Hz, $J=7,2$ Hz, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$), 4,21-4,24 (2H, m, piperidin), 6,83-7,04 (4H, m, ArH); **$^{13}\text{C-NMR}$** (50 MHz, CDCl_3 δ/ppm): 14,4 (1C, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 27,9 (2C, piperidin), 43,1 (2C, piperidin), 49,0 (2C, piperazin), 50,7 (2C, piperazin), 55,1 (1C, OCH_3), 61,6 (1C, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 66,9 (1C, piperidin), 110,8 (1C, 2-metoksifenil grupa), 117,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,8 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,8 (1C, 2-metoksifenil grupa), 140,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 152,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 155,3 ($-\text{C}=\text{O}$); **MS** m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: izračunato za $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_3$ 348,2270, izmereno 348,2284.

Opšti postupak za hidrolizu karbamata 37 i 43: Karbamat **37** ili **43** (20 mmol) se rastvori u 60 ml cHCl i prebaci u teflonski sud od 100 ml namenjen za rad u mikrotalasnom reaktoru. Reakcija se odvija na temperaturi od 130°C , pri maksimalnoj snazi od 300W u toku 90 min. Nakon završetka reakcije, smeša se izlije u vodu, zaalkališe se 10% rastvorom NaOH i ekstrahuje metilen hloridom. Donji organski sloj se osuši nad anh. Na_2SO_4 , procedi i upari na vakuum uparivaču. Dobijeni amini se prečišćavaju hromatografijom na koloni koristeći metilen hlorid/metanol (90:10) kao eluent.

1-(2-Metoksifenil)-4-(piperidin-4-il)piperazin (38): Prinos: 50%. Ulje. **IR** (ATR, cm^{-1}): 3254,4, 1585,6, 1502,6, 1241,1, 1018,0; **$^1\text{H-NMR}$** (200 MHz, δ/ppm): 1,76 (2H, qd, $J=3,5$ Hz, $J=10,5$ Hz, piperidin), 1,98 (2H, d, $J=11,5$ Hz, piperidin), 2,49 (1H, tt, $J=3,5$ Hz, $J=10,5$ Hz, piperidin), 2,75-2,82 (6H, m, piperidin i piperazin), 3,09 (4H, s, piperazin), 3,37 (2H, d, $J=12,5$ Hz, piperidin), 3,86 (3H, s, OCH_3), 6,82-7,02 (4H, m, ArH); **$^{13}\text{C-NMR}$** (50 MHz, δ/ppm): 27,2 (2C, piperidin), 44,4 (2C, piperidin), 49,1 (2C, piperazin), 50,8 (2C, piperazin), 55,3 (1C, OCH_3), 60,2 (1C, piperidin), 111,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 141,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa); **MS** (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}$ 276,2070, izmereno 276,2066.

1-(2-Metoksifenil)-4-(piperidin-4-ilmetil)piperazin (44): Prinos: 54%. Ulje. **IR** (ATR, cm^{-1}): 3432,4, 1534,8, 1499,6, 1237,1, 1021,9; **$^1\text{H-NMR}$** (200 MHz, δ/ppm): 1,03-1,23 (2H, m, piperidin), 1,62-1,69 (1H, m, piperidin), 1,78 (2H, d, $J=13$ Hz, piperidin), 2,24 (2H, d, $J=6,8$ Hz, CH_2), 2,60-2,67 (6H, m, piperidin i piperazin), 3,05-3,10 (4H, m, piperazin), 3,86 (3H, s, OCH_3), 3,38-3,48 (2H, m, piperidin), 6,83-7,02 (4H, m, ArH); **$^{13}\text{C-NMR}$** (50 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 31,4 (2C, piperidin), 33,3 (1C, piperidin), 45,9 (2C, piperidin), 50,7 (2C, piperazin), 53,7 (2C, piperazin), 55,2 (1C, OCH_3), 65,0 (1C, CH_2), 111,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 121,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,8 (1C, 2-metoksifenil grupa), 141,5 (1C, 2-metoksifenil grupa), 152,3 (1C, 2-metoksifenil grupa); **MS** (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}$ 290,2227, izmereno 290,2223.

1-(Etoksikarbonil)piperidin-4-karboksilna kiselina (40): U dvogrlom balonu od 1 litra, koji je opremljen kapalicom, rastvori se piperidin-4-karboksilna kiselina (**39**) (20 g, 0,155 mol) u 200 ml vode, doda se 20 g NaCO_3 i meša se na sobnoj temperaturi na magnetnoj mešalici. U reakcionu smešu se ukapava rastvor od etil-hlorformijata (25,5 g, 0,28 mol) u 240 ml toluola. Smeša se meša na sobnoj temperaturi narednih 20 časova. Nakon toga se isključi mešanje, kako bi se razdvojili organski i vodeni sloj. U levku za odvajanje odvojiti gornji, organski, od donjeg, vodenog sloja. Donji sloj se zakiseli sa HCl i ekstrahuje metilen hloridom. Organski sloj se osuši nad anh. Na_2SO_4 , procedi i upari pod sniženim pritiskom. Prinos: 78%. Ulje. **IR** (ATR, cm^{-1}): 1732,7, 1673,5, 1033,2; **$^1\text{H-NMR}$** (200 MHz, δ/ppm): 1,26 (3H, t, $J=7,4$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1,66 (2H, qd, $J=10,4$ Hz, $J=4,4$ Hz, piperidin), 1,93 (2H, d, $J=13,5$ Hz, piperidin), 2,51 (1H, tt, $J=4$ Hz, $J=10,6$ Hz, piperidin), 2,85-2,99 (2H, m, piperidin), 4,03-4,19 (4H, m, piperidin i $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 8,43 (s, 1H, COOH); **$^{13}\text{C-NMR}$** (50 MHz, δ/ppm): 14,6 (1C, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 27,6 (2C, piperidin), 40,6 (1C, piperidin), 43,0 (2C, piperidin), 61,5 (1C, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$), 155,6 (1C, -C=O), 179,9 (1C, COOH); **MS** (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{NO}_4$ 202,1073, izmereno 202,1069.

Etil 4-(hlorokarbonil)piperidin-1-karboksilat (41): U jednogrlom balonu se odmeri 1-(etoksikarbonil)piperidin-4-karboksilna kiselina (**40**) (7,5 g, 0,0375 mol), i doda se tionil-hlorid (5,35 g, 0,045 mol) i 200 ml hloroforma. Smeša se meša, uz hlađenje, na magnetnoj mešalici. Nakon 2 sata, odvoje se višak tionil-hlorida i rastvarač pod

snižanim pritiskom. Dobijeni proizvod se ne prečišćava, već se odmah koristi za sintezu jedinjenja **42**.

Etil 4-[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-karbonil]piperidin-1-karboksilat (42): U dvogrli balon od 500 ml, opremljen kapalicom i termometrom, se sipa Et₃N (3,78 g, 0,0375 mol) i 1-(2-metoksifenil)piperazina (**36**) (6,07 g, 0,0375 mol) i doda se 150 ml hloroforma. Ovako pripremljena reakciona smeša se meša na magnetnoj mešalici i u nju se ukapava, prethodno napravljeno jedinjenje **41**, rastvoreno u 30 ml hloroforma, vodeći računa da temperatura ne pređe 5 °C. Po završenom ukapavanju, reakciona smeša se meša na sobnoj temperaturi, a tok reakcije se prati hromatografski. Nakon završetka reakcije smeša se ekstrahuje prvo sa razblaženim rastvorom Na₂CO₃, da se ukloni višak kiseline **40**, odvoji se donji organski sloj koji se onda ekstrahuje sa razblaženim rastvorom HCl da se ukloni višak 1-(2-metoksifenil)piperazina (**36**). Prinos: 85%. Ulje. **IR** (ATR, cm⁻¹): 1690,4, 1622,2, 1503,3, 1430,7, 1243,3, 1015,6; **¹H-NMR** (200 MHz, δ/ppm): 1,26 (3H, t, J=7,2 Hz, CH₂-CH₃), 1,70-1,88 (4H, m, piperidin), 2,63-2,90 (3H, m, piperidin), 3,00-3,09 (4H, m, piperazin), 3,67-3,83 (4H, m, piperazin), 3,88 (3H, s, OCH₃), 4,08-4,24 (4H, m, CH₂-CH₃, i piperidin), 6,83-7,09 (4H, m, ArH); **¹³C-NMR** (50 MHz, δ/ppm): 14,6 (1C, CH₂-CH₃), 28,2 (2C, piperidin), 38,1 (1C, piperidin), 43,2 (2C, piperidin), 50,5 (2C, piperazin), 51,1 (2C, piperazin), 55,3 (1C, OCH₃), 61,2 (1C, CH₂-CH₃), 111,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,3 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 123,6 (1C, 2-metoksifenil grupa), 140,3 (1C, 2-metoksifenil grupa), 152,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 155,4 (1C, O-C=O), 172,7 (1C, C=O); **MS** (m/z): [M+H]⁺ izračunato za C₂₀H₂₉N₃O₄ 376,2228, izmereno 376,2231.

Etil 4-[[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il]metil]piperidin-1-karboksilat (43): U trogrli balon od 100 ml, opremljen termometrom, kapalicom i refluks kondenzatorom sa ispiralicom kroz koju se provodi argon, sipa se 25 ml diglima, NaBH₄ (1 g, 0,025 mol) i jedinjenje **42** (3,76 g, 0,01 mol). Smeša se ohladi na -5 °C i u nju se ukapava rastvor bor trifluorid eterata (3,9 g, 0,025 mol) u trajanju od 40 min. Smeša se meša 1 sat na temperaturi ispod 5 °C, a potom se zagreva na 80-90 °C sat vremena. Nakon toga, smeša se ohladi na sobnu temperaturu, prvo se doda 10 ml vode, a zatim i 20 ml cc HCl. Smeša se 3 sata zagreva na vodenom kupatilu, a potom upari pod sniženim pritiskom do suva. Čvrsti ostatak se zaalkališe 10% rastvorom NaOH, ekstrahuje sa metilen hloridom, osuši nad anh. Na₂SO₄ i upari na vakuum uparivaču. Proizvod se prečišćava

hromatografijom na koloni koristeći (metilen hlorid/metanol) kao eluent. Prinos: 85%. Ulje. **IR** (ATR, cm^{-1}): 1691,3, 1499,0, 1432,0, 1225,4, 1017,0; **$^1\text{H-NMR}$** (200 MHz, δ/ppm): 1,00-1,14 (2H, m, piperidin), 1,25 (3H, t, $J=6,6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1,57-1,81 (3H, m, piperidin), 2,24 (2H, d, $J=6,6$ Hz, CH_2), 2,58-2,63 (4H, m, piperazin), 2,67-2,80 (2H, m, piperidin), 3,07 (4H, s, piperazin), 3,86 (3H, s, OCH_3), 4,00-4,17 (4H, m, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$, i piperidin), 6,84-7,04 (4H, m, ArH); **$^{13}\text{C-NMR}$** (50 MHz, δ/ppm): 14,7 (1C, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 30,7 (2C, piperidin), 33,5 (1C, piperidin), 43,9 (2C, piperidin), 50,7 (2C, piperazin), 53,9 (2C, piperazin), 55,3 (1C, OCH_3), 61,0 (1C, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 64,6 (1C, $\text{CH}_2\text{-N}$), 111,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,82 (1C, 2-metoksifenil grupa), 141,4 (1C, 2-metoksifenil grupa), 152,26 (1C, 2-metoksifenil grupa), 155,67 (1C, O-C=O); **MS** (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_3$ 362,2438, izmereno 362,2437.

Opšti postupak za alkilovanje 1-(2-metoksifenil)-4-(piperidin-4-il)piperazina (38) i 1-(2-metoksifenil)-4-(piperidin-4-ilmetil)piperazina (44): U jednogrlom balonu od 100 ml se napravi smeša jedinjenja **38** ili **44** (0,0018 mol), odgovarajućeg benzil halogenida **45-48** (0,0018 mol) i K_2CO_3 (0,0036 mol) u 25 ml CH_3CN . Rastvor se meša 48 sati na magnetnoj mešalici, na sobnoj temperaturi. Nakon toga se izlije u vodu, ekstrahuje metilen hloridom, donji organski sloj se osuši nad anh. Na_2SO_4 i upari pod sniženim pritiskom. Proizvodi se prečišćavaju hromatografijom na koloni, koristeći sistem metilen hlorid/metanol kao eluent.

1-(1-Benzilpiperidin-4-il)-4-(2-metoksifenil)piperazin (49): Prinos: 76%. Ulje; **IR** (ATR, cm^{-1}): 1590,7, 1450,5, 1237,0, 1019,6; **$^1\text{H-NMR}$** (200 MHz, δ/ppm): 1,65 (2H, qd, $J=3,2$ Hz, $J=11,8$ Hz, piperidin), 1,86 (2H, d, $J=11,2$ Hz, piperidin), 2,01 (2H, t, $J=11,2$ Hz, piperidin), 2,36 (1H, tt, $J=4$ Hz, $J=11,4$ Hz, piperidin), 2,76-2,81 (4H, m, piperazin), 2,97 (2H, d, $J=11,8$ Hz, piperidin), 3,09-3,14 (4H, m, piperazin), 3,51 (2H, s, $\text{CH}_2\text{-N}$), 3,85 (3H, s, OCH_3), 6,83-7,04 (4H, m, ArH), 7,22-7,33 (5H, m, ArH); **$^{13}\text{C-NMR}$** (50 MHz, δ/ppm): 27,8 (2C, piperidin), 49,2 (2C, piperidin), 50,7 (2C, piperazin), 53,0 (2C, piperazin), 55,2 (1C, OCH_3), 62,05 (1C, $\text{CH}_2\text{-N}$), 62,85 (1C, piperidin), 111,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 121,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 127,0 (1C, fenil grupa), 128,2 (2C, fenil grupa), 129,1 (2C, fenil grupa), 138,1 (1C, fenil grupa), 141,2 (1C,

2-metoksifenil grupa), 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa); **MS** (m/z): [M+H]⁺ izračunato za C₂₃H₃₁N₃O 366,2540, izmereno 366,2547.

1-(2-Metoksifenil)-4-[1-(2-nitrobenzil)piperidin-4-il]piperazin (50): Prinos: 80%. T.t 146 °C; **IR** (ATR, cm⁻¹): 1589,7, 1526,0, 1454,5, 1369,8, 1237,5, 1022,6; **¹H-NMR** (200 MHz, δ/ppm): 1,56 (2H, qd, J=3,2 Hz, J=11,8 Hz, piperidin), 1,82 (2H, d, J=11,8 Hz, piperidin), 2,01-2,12 (2H, m, piperidin), 2,29 (1H, tt, J=3,4 Hz, J=11,2 Hz, piperidin), 2,74-2,78 (4H, m, piperazin), 2,86 (2H, d, J=11,8 Hz, piperidin), 3,1 (4H, s, piperazin), 3,76 (2H, s, CH₂-N), 3,85 (3H, s, OCH₃), 6,83-7,04 (4H, m, ArH), 7,37 (1H, t, J=7,8 Hz, ArH), 7,53 (1H, t, J=7,2 Hz, ArH), 7,63 (1H, d, J=6,8 Hz, ArH), 7,81 (1H, d, J=6,8 Hz, ArH); **¹³C-NMR** (50 MHz, δ/ppm): 28,3 (2C, piperidin), 49,3 (2C, piperidin), 50,9 (2C, piperazine), 53,3 (2C, piperazin), 55,3 (1C, OCH₃), 58,8 (1C, CH₂-N), 61,9 (1C, C₄, piperidin), 111,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 124,3 (1C, 2-nitrofenil grupa), 127,7 (1C, 2-nitrofenil grupa), 130,8 (1C, 2-nitrofenil grupa), 132,4 (1C, 2-nitrofenil grupa), 134,3 (1C, 2-nitrofenil grupa), 141,3 (1C, 2-metoksifenil grupa), 149,7 (1C, 2-nitrofenil grupa), 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa); **MS** (m/z): [M+H]⁺ izračunato za C₂₃H₃₀N₄O₃ 411,2391, izmereno 411,2402.

1-(2-Metoksifenil)-4-[1-(3-nitrobenzil)piperidin-4-il]piperazin (51): Prinos: 86%. Ulje. **IR** (ATR, cm⁻¹): 1588,3, 1530,8, 1499,4, 1346,9, 1237,5, 1027,6; **¹H-NMR** (200 MHz, δ/ppm): 1,63 (2H, qd, J=3,2 Hz, J=10,7 Hz, piperidin), 1,86 (2H, d, J=11,8 Hz, piperidin), 2,05 (2H, t, J=11,8 Hz, piperidin), 2,34 (1H, tt, J=3,8 Hz, J=11,8 Hz, piperidin), 2,76-2,80 (4H, m, piperazin), 2,92 (2H, d, J=11,2 Hz, piperidin), 3,08-3,11 (4H, m, piperazin), 3,57 (2H, s, CH₂-N), 3,86 (3H, s, OCH₃), 6,83-7,04 (4H, m, ArH), 7,47 (1H, t, J=7,8 Hz, ArH), 7,67 (1H, d, J=7,2 Hz, ArH), 8,11 (1H, d, J=8,4 Hz, ArH), 8,2 (1H, s, ArH); **¹³C-NMR** (50 MHz, δ/ppm): 28,2 (2C, piperidin), 49,3 (2C, piperidin), 51,0 (2C, piperazin), 55,2 (2C, piperazin), 55,3 (1C, OCH₃), 62,0 (2C, CH₂-N i piperidin), 111,0 (1C, 2-metoksifenil piperazin), 118,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,3 (2C, 2-metoksifenil grupa i 3-nitrofenil grupa), 122,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 123,0 (1C, 3-nitrofenil grupa), 123,6 (1C, 3-nitrofenil grupa), 129,1 (1C, 3-nitrofenil grupa), 134,9 (1C, 3-nitrofenil grupa), 141,3 (1C, 2-metoksifenil grupa), 149,9 (1C, 3-nitrofenil grupa), 152,3 (1C, 2-metoksifenil grupa); **MS** (m/z): [M+H]⁺ izračunato za C₂₃H₃₀N₄O₃ 411,2391, izmereno 411,2389.

1-(2-Metoksifenil)-4-[1-(4-nitrobenzil)piperidin-4-il]piperazin (52): Prinos: 76%. T.t. 145 °C; **IR** (ATR, cm⁻¹): 1599,4, 1513,8, 1445,6, 1344,2, 1236,8, 1020,3; **¹H-NMR** (200 MHz, δ/ppm): 1,65 (2H, qd, J=3,4 Hz, J= 12,2 Hz, piperidin), 1,89 (2H, d, J=11,8 Hz, piperidin), 2,00-2,11 (2H, m, piperidin), 2,39 (1H, tt, J=4 Hz, J=11,2 Hz, piperidin), 2,80-2,84 (4H, m, piperazin), 2,92 (2H, d, J=11,8 Hz, piperidin), 3,12-3,14 (4H, m, piperazin), 3,58 (2H, s, CH₂-N), 3,86 (3H, s, OCH₃), 6,84-7,05 (4H, m, ArH), 7,59 (2H, d, J=9 Hz, ArH), 8,17 (2H, d, J=8,4 Hz, ArH); **¹³C-NMR** (50 MHz, δ/ppm): 28,1 (2C, piperidin), 49,3 (2C, piperidin), 50,7 (2C, piperazin), 53,2 (2C, piperazin), 55,3 (1C, OCH₃), 62,0 (2C, CH₂-N i piperidin), 111,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 121,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 123,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 123,5 (2C, 4-nitrofenil grupa), 129,3 (2C, 4-nitrofenil grupa), 141,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 146,8 (2C, 4-nitrofenil grupa), 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa); **MS** (m/z): [M+H]⁺ izračunato za C₂₃H₃₀N₄O₃ 411,2391, izmereno 411,2409.

1-[(1-Benzilpiperidin-4-il)metil]-4-(2-metoksifenil)piperazin (53): Prinos: 80%. T.t. 104,5 °C; **IR** (ATR, cm⁻¹): 1588,4, 1447,5, 1238,7, 1024,9; **¹H-NMR** (200 MHz, δ/ppm): 1,25 (2H, qd, J=2,8 Hz, J= 12 Hz, piperidin), 1,46-1,59 (1H, m, piperidin), 1,74 (2H, d, J=13 Hz, piperidin), 1,89-2,00 (2H, m, piperidin), 2,41 (2H, d, J=6,8 Hz, CH₂-N), 2,52 (4H, s, piperazin), 2,89 (2H, d, J=11,8 Hz, piperidin), 3,07 (4H, s, piperazin), 3,50 (2H, s, CH₂-N), 3,86 (3H, s, OCH₃), 6,83-7,04 (4H, m, ArH), 7,23-7,33 (5H, m, ArH); **¹³C-NMR** (50 MHz, δ/ppm): 31,0 (2C, piperidin), 33,1 (1C, piperidin), 50,7 (2C, piperazin), 53,8 (2C, piperidin), 53,9 (2C, piperazin), 55,3 (1C, OCH₃), 62,5 (1C, CH₂-N), 64,8 (1C, CH₂-N), 111,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,8 (1C, 2-metoksifenil grupa), 126,9 (1C, fenil grupa), 128,1 (2C, fenil grupa), 129,2 (2C, fenil grupa), 138,5 (1C, fenil grupa), 141,5 (1C, 2-metoksifenil grupa), 152,3 (1C, 2-metoksifenil grupa); **MS** (m/z): [M+H]⁺ izračunato za C₂₄H₃₃N₃O 380,2696, izmereno 380,2692.

1-(2-Metoksifenil)-4-[[1-(2-nitrobenzil)piperidin-4-il]metil]piperazin (54): Prinos: 82%. T.t. 100 °C; **IR** (ATR, cm⁻¹): 1589,1, 1532,6, 1499,5, 1314,2, 1236,1, 1026,4; **¹H-NMR** (200 MHz, δ/ppm): 1,21 (2H, qd, J₁=11,5 Hz, J₂=3 Hz, piperidin), 1,45-1,58 (1H, m, piperidin), 1,72 (2H, d, J=11,5 Hz, piperidin), 1,96-2,07 (2H, m, piperidin), 2,23 (2H, d, J=6,8 Hz, CH₂-N), 2,59-2,61 (4H, m, piperazin), 2,78 (2H, d, J=11,2 Hz, piperidin), 3,07 (4H, s, piperazin), 3,76 (2H, s, CH₂-N), 3,86 (3H, s, OCH₃), 6,83-7,03

(4H, m, ArH), 7,32-7,83 (4H, m, ArH); $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, δ/ppm): 31,1 (2C, piperidin), 33,1 (1C, piperidin), 50,7 (2C, piperazin), 53,9 (4C, piperidin i piperazin), 55,3 (1C, OCH_3), 63,5 (1C, $\text{CH}_2\text{-N}$), 64,9 (1C, $\text{CH}_2\text{-N}$), 111,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,8 (1C, 2-metoksifenil grupa), 124,3 (1C, 2-nitrofenil grupa), 127,6 (1C, 2-nitrofenil grupa), 130,8 (1C, 2-nitrofenil grupa), 132,4 (1C, 2-nitrofenil grupa), 134,7 (1C, 2-nitrofenil grupa), 141,5 (1C, 2-metoksifenil grupa), 149,8 (1C, 2-nitrofenil grupa), 152,3 (1C, 2-metoksifenil grupa); **MS** (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_3$ 425,2547, izmereno 425,2540.

1-(2-Metoksifenil)-4-[[1-(3-nitrobenzil)piperidin-4-il]metil]piperazin (**55**): Prinos: 80%. T.t. 132 °C; **IR** (ATR, cm^{-1}): 1594,7, 1534,2, 1444,9, 1342,3, 1251,5, 1030,8; $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, δ/ppm): 1,32 (2H, qd, $J=3,4$ Hz, $J=12$ Hz, piperidin), 1,48-1,64 (1H, m, piperidin), 1,76 (2H, d, $J=12$ Hz, piperidin), 1,95-2,06 (2H, m, piperidin), 2,25 (2H, d, $J=7,4$ Hz, $\text{CH}_2\text{-N}$), 2,60 (4H, s, piperazin), 2,85 (2H, d, $J=11,8$ Hz, piperidin), 3,07 (4H, s, piperazin), 3,57 (2H, s, $\text{CH}_2\text{-N}$), 3,86 (3H, s, OCH_3), 6,83-7,04 (4H, m, ArH), 7,47 (1H, t, $J=7,8$ Hz, ArH), 7,67 (1H, d, $J=8$ Hz, ArH), 8,10 (1H, d, $J=8,4$ Hz, ArH) 8,2 (1H, s, ArH); $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, δ/ppm): 31,0 (2C, piperidin), 33,1 (1C, piperidin), 50,7 (2C, piperazin), 53,8 (2C, piperidin), 53,9 (2C, piperazin), 55,3 (1C, OCH_3), 62,5 (1C, $\text{CH}_2\text{-N}$), 64,8 (1C, $\text{CH}_2\text{-N}$), 111,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (2C, 3-nitrofenil grupa i 2-metoksifenil grupa), 122,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,8 (1C, 3-nitrofenil grupa), 123,7 (1C, 3-nitrofenil grupa), 129,0 (1C, 3-nitrofenil grupa), 135,0 (1C, 3-nitrofenil grupa), 141,3 (1C, 2-metoksifenil grupa), 149,3 (1C, 3-nitrofenil grupa), 152,3 (1C, 2-metoksifenil grupa); **MS** (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_3$ 425,2547, izmereno 425,2552.

1-(2-Metoksifenil)-4-[[1-(4-nitrobenzil)piperidin-4-il]metil]piperazin (**56**): Prinos: 87%. T.t. 120,5 °C; **IR** (ATR, cm^{-1}): 1598,2, 1507,9, 1447,6, 1343,0, 1242,9, 1026,0; $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, δ/ppm): 1,26 (2H, qd, $J=3,8$ Hz, $J=10,6$ Hz, piperidin), 1,47-1,66 (1H, m, piperidin), 1,76 (2H, d, $J=11,8$ Hz, piperidin), 1,95-2,05 (2H, m, piperidin), 2,26 (2H, d, $J=6,4$ Hz, $\text{CH}_2\text{-N}$), 2,60-2,62 (4H, m, piperazin), 2,84 (2H, d, $J=11,2$ Hz, piperidin), 3,07 (4H, s, piperazin), 3,57 (2H, s, $\text{CH}_2\text{-N}$), 3,86 (3H, s, OCH_3), 6,83-7,04 (4H, m, ArH), 7,50 (2H d, $J=8,4$ Hz, ArH), 8,17 (2H, d, $J=8,4$ Hz, ArH); $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, δ/ppm): 31,0 (2C, piperidin), 33,0 (1C, piperidin), 50,6 (2C, piperazin), 53,9

(4C, piperidin i piperazin), 55,3 (1C, OCH₃), 62,5 (1C, CH₂-N), 64,8 (1C, CH₂-N), 111,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,8 (1C, 2-metoksifenil grupa), 123,4 (2C, 4-nitrofenil grupa), 129,4 (2C, 4-nitrofenil grupa), 141,4 (1C, 2-metoksifenil grupa), 147,0 (2C, 4-nitrofenil grupa), 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa); **MS** (m/z): [M+H]⁺ izračunato za C₂₄H₃₂N₄O₃ 425,2547, izmereno 425,2561.

Opšti postupak za acilovanje 1-(2-metoksifenil)-4-(piperidin-4-il)piperazina (38) i 1-(2-metoksifenil)-4-(piperidin-4-ilmetil)piperazina (44): U rastvor jedinjenja **38** ili **44** (0,0017 mol), Et₃N (0,0017 mol) i 1,7 ml CH₂Cl₂ ukapati na 0 °C rastvor benzoil ili nitrobenzoil hlorida **57-60** (0,0017 mol) u 0,36 ml CH₂Cl₂. Potom smešu mešati na magnetnoj mešalici naredna 72 sata. Nakon završetka reakcije, reakcionu smešu izliti u vodu, isprati 10% rastvorom K₂CO₃, ekstrahovati metilen hloridom, donji organski sloj osušiti nad anh. Na₂SO₄ i upariti pod sniženim pritiskom. Dobijeni proizvod se prečišćava hromatografijom na koloni korišćenjem metilen hlorid/metanola kao eluenta (90:10).

{4-[4-(2-Metoksifenil)piperazin-1-il]piperidin-1-il}(fenil)metanon (61): Prinos: 76%. T.t. 131,5° C; **IR** (ATR, cm⁻¹): 1626,6, 1234,1, 1024,3; **¹H-NMR** (200 MHz, δ/ppm): 1,55-2,17 (5H, m, piperidin), 2,56 (1H, tt, J=3,4 Hz, J=7,4 Hz, piperidin), 2,76-2,80 (5H, m, piperazin i piperidin), 3,109 (5H, s, piperazin i piperidin), 3,86 (3H, s, OCH₃), 4,75 (1H, s, piperidin), 6,84-7,05 (4H, m, ArH), 7,26-7,40 (5H, m, ArH); **¹³C-NMR** (50 MHz, δ/ppm): 28,2 (2C, piperidin), 47,1 (2C, piperidin), 49,4 (2C, piperazin), 50,9 (2C, piperazin), 55,3 (1C, OCH₃), 61,8 (1C, piperidin), 111,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 121,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 123,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 126,8 (2C, fenil grupa), 128,4 (2C, fenil grupa), 129,5 (1C, fenil grupa), 136,17 (1C, fenil grupa), 141,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 170,2 (1C, C=O); **MS** (m/z): [M+H]⁺ izmereno za C₂₃H₂₉N₃O₂ 380,2333, izmereno 380,2338.

{4-[4-(2-Metoksifenil)piperazin-1-il]piperidin-1-il}(2-nitrofenil)metanon (62): Prinos: 75%. T.t. 160 °C; **IR** (ATR, cm⁻¹): 1638,7, 1521,1, 1341,8, 1236,1, 1025,4; **¹H-NMR** (200 MHz, δ/ppm): 1,25-1,99 (5H, m, piperidin), 2,61 (1H, tt, J=3,4 Hz, J=10 Hz, piperidin), 2,78-2,83 (5H, m, piperazin i piperidin), 3,10-3,12 (5H, m, piperazin i

piperidin), 3,78 (1H, s, piperidin), 3,87 (3H, s, OCH₃), 6,85-7,06 (5H, m, ArH), 7,58-7,66 (1H, m, ArH), 7,72-7,78 (1H, m, ArH), 8,18-8,35 (1H, m, ArH); **¹³C-NMR** (50 MHz, δ/ppm): 27,7 (2C, piperidin), 47,1 (2C, piperidin), 49,3 (2C, piperazin), 50,8 (2C, piperazin), 55,3 (1C, OCH₃), 61,5 (1C, piperidin), 111,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 121,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 124,8 (1C, 2-nitrofenil grupa), 128,0 (1C, 2-nitrofenil grupa), 129,7 (1C, 2-nitrofenil grupa), 133,2 (1C, 2-nitrofenil grupa), 134,3 (1C, 2-nitrofenil grupa), 141,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 145,4 (1C, 2-nitrofenil grupa), 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 166,4 (1C, C=O); **MS** (m/z): [M+H]⁺ izračunato za C₂₃H₂₈N₄O₄ 425,2183, izmereno 425,2192.

{4-[4-(2-Metoksifenil)piperazin-1-il]piperidin-1-il}(3-nitrofenil)metanon (63): Prinos: 72%. T.t. 118,5 °C; **IR** (ATR, cm⁻¹): 1621,8, 1531,0, 1351,3, 1244,8, 1025,3; **¹H-NMR** (200 MHz, δ/ppm): 1,53-1,63 (2H, m, piperidin), 1,88-2,16 (2H, m, piperidin), 2,62 (1H, tt, J=3,4 Hz, J=11,4 Hz, piperidin), 2,73-2,83 (5H, m, piperazin i piperidin), 3,10-3,15 (5H, m, piperazin i piperidin), 3,50-3,73 (1H, m, piperidin), 3,82 (3H, s, OCH₃), 4,74-4,79 (1H, m, piperidin), 6,82-7,06 (4H, m, ArH), 7,46-7,68 (2H, m, ArH), 8,18-8,39 (2H, m, ArH); **¹³C-NMR** (50 MHz, δ/ppm): 27,9 (2C, piperidin), 46,9 (2C, piperidin), 49,3 (2C, piperazin), 50,7 (2C, piperazin), 55,3 (1C, OCH₃), 61,5 (1C, piperidin), 111,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 121,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 123,0 (1C, 3-nitrofenil grupa), 124,4 (1C, 3-nitrofenil grupa), 129,8 (1C, 3-nitrofenil grupa), 132,9 (1C, 3-nitrofenil grupa), 137,7 (1C, 3-nitrofenil grupa), 141,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 148,0 (1C, 3-nitrofenil grupa), 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 167,5 (1C, C=O); **MS** (m/z): [M+H]⁺ izmereno za C₂₃H₂₈N₄O₄ 425,2183, izmereno 425,2195.

{4-[4-(2-Metoksifenil)piperazin-1-il]piperidin-1-il}(4-nitrofenil)metanon (64): Prinos: 70%. T.t. 156,5 °C; **IR** (ATR, cm⁻¹): 1630,1, 1522,0, 1352,0, 1233,0, 1024,5; **¹H-NMR** (200 MHz, δ/ppm): 1,47-2,07 (5H, m, piperidin), 2,57-2,61 (1H, m, piperidin), 2,79 (4H, s, piperazin), 2,87 (1H, s, piperidin), 3,11 (4H, s, piperazin), 3,66 (1H, m, piperidin), 3,86 (3H, s, OCH₃), 4,73-4,76 (1H, m, piperidin), 6,85-7,02 (4H, m, ArH), 7,56-7,58 (2H m, ArH), 8,27-8,29 (2H, m, ArH); **¹³C-NMR** (50 MHz, δ/ppm): 28,0 (2C, piperidin), 47,0 (2C, piperidin), 49,4 (2C, piperazin), 50,9 (2C, piperazin), 55,3 (1C, OCH₃), 61,5 (1C, piperidin), 111,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,2 (1C,

2-metoksifenil grupa), 121,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 123,09 (1C, 2-metoksifenil grupa), 123,9 (2C, 4-nitrofenil grupa), 127,9 (2C, 4-nitrofenil grupa), 141,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 142,3 (1C, 4-nitrofenil grupa), 148,4 (1C, 4-nitrofenil grupa), 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 167,9 (1C, C=O); **MS** (m/z): [M+H]⁺ izračunato za C₂₃H₂₈N₄O₄ 425,2183, izmereno 425,2186.

(4-[[4-(2-Metoksifenil)piperazin-1-il]metil]piperidin-1-il)(fenil)metanon (**65**): Prinos: 68%. Ulje. **IR** (ATR, cm⁻¹): 1629,3, 1239,0, 1130,4; **¹H-NMR** (200 MHz, δ/ppm): 1,24-125 (2H, m, piperidin), 1,80-1,85 (3H, m, piperidin), 2,28-2,29 (2H, m, CH₂-N), 2,62 (5H, s, piperazin i piperidin), 3,07 (5H, s, piperazin i piperidin), 3,70 (1H, s, piperidin), 3,86 (3H, s, OCH₃), 4,72 (1H, s, piperidin), 6,84 (1H, m, ArH), 6,89 (2H, m, ArH), 6,94 (1H, m, ArH), 6,97 (5H, m, ArH); **¹³C-NMR** (50 MHz, δ/ppm): 30,7 (2C, piperidin), 33,8 (1C, piperidin), 48,0 (2C, piperidin), 50,6 (2C, piperazin), 53,9 (2C, piperazin), 55,3 (1C, OCH₃), 64,4 (1C, CH₂-N), 111,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 121,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 126,8 (2C, fenil grupa), 128,4 (2C, fenil grupa), 129,4 (1C, fenil grupa), 136,5 (1C, fenil grupa), 141,4 (1C, 2-metoksifenil grupa), 152,3 (1C, 2-metoksifenil grupa), 170,3 (1C, C=O); **MS** (m/z): [M+H]⁺ izračunato za C₂₄H₃₁N₃O₂ 394,2489, izmereno 394,2488.

(4-[[4-(2-Metoksifenil)piperazin-1-il]metil]piperidin-1-il)(2-nitrofenil)metanon (**66**): Prinos: 73%. T.t. 128 °C; **IR** (ATR, cm⁻¹): 1628,4, 1524,2, 1343,5, 1235,7, 1114,5; **¹H-NMR** (200 MHz, δ/ppm): 1,06-1,09 (2H, m, piperidin), 1,59 (2H, s, CH₂-N), 1,68-1,72 (3H, m, piperidin), 2,24-2,33 (1H, m, piperidin), 2,61 (4H, s, piperazin), 2,84-2,88 (1H, m, piperidin), 3,02 (4H, s, piperazin), 3,36 (1H, s, piperidin), 3,85 (3H, s, OCH₃), 4,73-4,78 (1H, m, piperidin), 6,84 (1H, d, J=8,5 Hz, ArH), 6,89-6,94 (2H, m, ArH), 6,97-7,00 (1H, m, ArH), 7,38 (1H, s, ArH), 7,55 (1H, t, J=8,5 Hz, ArH), 7,69 (1H, t, J=7,5 Hz, ArH), 8,19 (1H, d, J=8,5 Hz, ArH); **¹³C-NMR** (50 MHz, δ/ppm): 29,9 (2C, piperidin), 33,6 (1C, piperidin), 46,7 (2C, piperidin), 50,7 (2C, piperazin), 53,9 (2C, piperazin), 55,3 (1C, OCH₃), 64,2 (1C, CH₂-N), 111,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 121,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 124,8 (1C, 2-nitrofenil grupa), 128,0 (1C, 2-nitrofenil grupa), 129,6 (1C, 2-nitrofenil grupa), 133,5 (1C, 2-nitrofenil grupa), 134,4 (1C, 2-nitrofenil grupa), 141,4 (1C, 2-metoksifenil grupa), 145,3 (1C, 2-nitrofenil grupa), 152,3 (1C,

2-metoksifenil grupa), 170,3 (1C, C=O); **MS** (m/z): $[M+H]^+$ izračunato za $C_{24}H_{30}N_4O_4$ 439,2340, izmereno 439,2348.

(4-[[4-(2-Metoksifenil)piperazin-1-il]metil]piperidin-1-il)(3-nitrofenil)metanon (67):
Prinos: 80%. T.t. 117 °C; **IR** (ATR, cm^{-1}): 1630,6, 1533,1, 1351,6, 1243,6, 1109,9;
¹H-NMR (200 MHz, δ/ppm): 1,15-1,17 (2H, m, piperidin), 1,82-1,94 (3H, m, piperidin), 2,30 (2H, s, CH₂-N), 2,62 (4H, s, piperazin), 2,84 (1H, s, piperidin), 3,07 (5H, s, piperazin i piperidin), 3,64-3,66 (1H, m, piperidin), 3,86 (3H, s, OCH₃), 4,73 (1H, s, piperidin), 6,84-6,86 (1H, m, ArH), 6,89-6,94 (2H, m, ArH), 6,97-7,00 (1H, m, ArH), 7,58-7,62 (1H, m, ArH), 7,74 (1H, m, ArH), 8,26-8,28 (2H, m, ArH); **¹³C-NMR** (50 MHz, δ/ppm): 30,4 (2C, piperidin), 33,6 (1C, piperidin), 47,9 (2C, piperidin), 50,6 (2C, piperazin), 53,8 (2C, piperazin), 55,3 (1C, OCH₃), 64,2 (1C, CH₂-N), 111,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,8 (1C, 2-metoksifenil grupa), 124,2 (1C, 3-nitrofenil grupa), 128,0 (1C, 3-nitrofenil grupa), 129,7 (1C, 3-nitrofenil grupa), 132,9 (1C, 3-nitrofenil grupa), 138,0 (1C, 3-nitrofenil grupa), 141,3 (1C, 2-metoksifenil grupa), 149,8 (1C, 3-nitrofenil grupa), 152,3 (1C, 2-metoksifenil grupa), 167,2 (1C, C=O); **MS** (m/z): $[M+H]^+$ izračunato za $C_{24}H_{30}N_4O_4$ 439,2340, izmereno 439,2357.

(4-[[4-(2-Metoksifenil)piperazin-1-il]metil]piperidin-1-il)(4-nitrofenil)metanon (68):
Prinos: 85%. T.t. 120 °C; **IR** (ATR, cm^{-1}): 1630,7, 1519,0, 1347,9, 1239,4, 1012,9;
¹H-NMR (200 MHz, δ/ppm): 1,11-1,13 (2H, m, piperidin), 1,79-1,87 (2H, m, piperidin), 1,95 (1H, m, piperidin), 2,28-2,30 (2H, m, CH₂-N), 2,62 (5H, s, piperazin i piperidin), 3,07 (5H, s, piperazin i piperidin), 3,59 (1H, d, J=12,5 Hz, piperidin), 3,86 (3H, s, OCH₃), 4,71 (1H, d, J=12 Hz, piperidin), 6,84-6,86 (1H, m, ArH), 6,89-6,94 (2H, m, ArH), 6,97-7,01 (1H, m, ArH), 7,55 (2H, d, J=9 Hz, ArH), 8,26 (2H, d, J=9 Hz, ArH); **¹³C-NMR** (50 MHz, δ/ppm): 30,4 (2C, piperidin), 33,6 (1C, piperidin), 47,8 (2C, piperidin), 50,6 (2C, piperazin), 53,9 (2C, piperazin), 55,30 (1C, OCH₃), 64,19 (1C, CH₂-N), 111,14 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 123,8 (2C, 4-nitrofenil grupa), 127,8 (2C, 4-nitrofenil grupa), 141,4 (1C, 2-metoksifenil grupa), 142,6 (1C, 4-nitrofenil grupa), 148,2 (1C, 4-nitrofenil grupa), 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 167,8 (1C, C=O); **MS** (m/z): $[M+H]^+$ izračunato za $C_{24}H_{30}N_4O_4$ 439,2340, izmereno 439,2360.

Opšti postupak za sintezu jedinjenja 73-80: Rastvor fenetil ili nitrofenetil sirćetne kiseline **69-72** (0,0149mol), jedinjenja **38** ili **44** (0,0149 mol), DCC (0,028 mol) u 10 ml CH₃CN se meša pola sata na 0 °C na magnetnoj mešalici, a potom 24 sata na sobnoj temperaturi. Nakon toga, smeša se procedi i upari pod sniženim pritiskom. Dobijeni proizvod se prečišćava hromatografijom na koloni koristeći metilen hlorid/metanol kao eluent (90:10).

1-{4-[4-(2-Metoksifenil)piperazin-1-il]piperidin-1-il}-2-(fenil)etanon (73): Prinos: 80%. Ulje. **IR** (ATR, cm⁻¹): 1638,7, 1240,5, 1027,0; **¹H-NMR** (500 MHz, δ/ppm): 1,20 (1H, qd, J=4 Hz, J=10,5 Hz, piperidin), 1,43 (1H, qd, J=4 Hz, J=11,5 Hz, piperidin), 1,77 (1H, d, J=12,5 Hz, piperidin), 1,89 (1H, d, J=13 Hz, piperidin), 2,46 (1H, tt, J=3,5 Hz, J=8 Hz, piperidin), 2,60 (1H, t, J=12,5 Hz, piperidin), 2,69-2,71(4H, m, piperazin), 2,96 (1H, t, J=11 Hz, piperidin), 3,07 (4H, s, piperazin), 3,74 (2H, s, CH₂), 3,85 (3H, s, OCH₃), 3,92 (1H, d, J=13,5 Hz, piperidin), 4,69 (1H, d, J=13,5 Hz, piperidin), 6,84-6,86 (1H, m, ArH), 6,90-6,93 (2H, m, ArH), 6,97-7,00 (1H, m, ArH), 7,23-7,26 (3H, m, ArH), 7,302-7,33 (2H, m, ArH); **¹³C-NMR** (125 MHz, δ/ppm): 28,0 (1C, piperidin), 28,6 (1C, piperidin), 41,1 (1C, CH₂), 41,3 (1C, piperidin), 45,5 (1C, piperidin), 49,2 (2C, piperazin), 50,9 (2C, piperazin), 55,3 (1C, OCH₃), 61,7 (1C, piperidin), 111,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 126,7 (1C, fenil grupa), 128,5 (2C, fenil grupa), 128,7 (2C, fenil grupa), 135,2 (1C, fenil grupa), 141,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 169,2 (1C, C=O); **MS:** m/z [M+H]⁺ izračunato za C₂₄H₃₁N₃O₂ 394,2450, izmereno 394,2495.

1-{4-[4-(2-Metoksifenil)piperazin-1-il]piperidin-1-il}-2-(2-nitrofenil)etanon (74): Prinos: 84%. T.t. 87 °C; **IR** (ATR, cm⁻¹): 1648,0, 1500,3, 1350,5, 1238,5, 1027,5; **¹H-NMR** (500 MHz, δ/ppm): 1,52 (1H, qd, J=4,5 Hz, J=12 Hz, piperidin), 1,63 (1H, qd, J=3,5 Hz, J=10 Hz, piperidin), 1,91 (1H, d, J=12,5 Hz, piperidin), 1,99 (1H, d, J=12,5 Hz, piperidin), 2,56-2,60 (1H, m, piperidin), 2,67 (1H, t, J=11,5 Hz, piperidin), 2,79 (4H, s, piperazin), 3,11-3,14 (5H, m, piperazin i piperidin), 3,86 (3H, s, OCH₃), 4,01-4,14 (3H, m, piperidin i CH₂), 4,63 (1H, d, J=13,5 Hz, piperidin), 6,85-6,87 (1H, m, ArH), 6,92-6,95 (2H, m, ArH), 6,98-7,01 (1H, m, ArH), 7,33 (1H, d, J=7,5 Hz, ArH), 7,43 (1H, t, J=8 Hz, ArH), 7,56 (1H, t, J=7,5 Hz, ArH), 8,09 (1H, d, J=8 Hz, ArH); **¹³C-NMR** (125 MHz, δ/ppm): 28,0 (1C, piperidin), 28,7 (1C, piperidin), 38,6

(1C, CH₂), 41,6 (1C, piperidin), 45,2 (1C, piperidin), 49,3 (2C, piperazin), 50,9 (2C, piperazin), 55,3 (1C, OCH₃), 61,8 (1C, piperidin), 111,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 121,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 125,1 (1C, 2-nitrofenil grupa), 128,1 (1C, 2-nitrofenil grupa), 131,4 (1C, 2-nitrofenil grupa), 133,2 (1C, 2-nitrofenil grupa), 133,3 (1C, 2-nitrofenil grupa), 141,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 149,0 (1C, 2-nitrofenil grupa), 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 167,3 (1C, C=O); **MS**: m/z [M+H]⁺ izračunato za C₂₄H₃₀N₄O₄ 439,2301, izmereno 439,2333.

1-{4-[4-(2-Metoksifenil)piperazin-1-il]piperidin-1-il}-2-(3-nitrofenil)etanon (**75**):
Prinos: 69%. Ulje. **IR** (ATR, cm⁻¹): 1643,2, 1500,6, 1349,4, 1240,2, 1026,8; **¹H-NMR** (500 MHz, δ/ppm): 1,43 (1H, qd, J=3,5 Hz, J=8,5 Hz, piperidin), 1,48 (1H, qd, J=4 Hz, J=10 Hz, piperidin), 1,93 (2H, s, piperidin i piperidin), 2,53 (1H, tt, J=7 Hz, J=3,5 Hz, piperidin), 2,67 (1H, t, J=12,5 Hz, piperidin), 2,74 (4H, s, piperazin), 3,09 (5H, m, piperazin i piperidin), 3,82 (2H, s, CH₂), 3,86 (3H, s, OCH₃), 3,95 (1H, d, J=11,5 Hz, piperidin), 4,66 (1H, d, J=13 Hz, piperidin), 6,85-6,87 (1H, m, ArH), 6,91-6,94 (2H, m, ArH), 6,98-7,02 (1H, m, ArH), 7,49-7,52 (1H, m, ArH), 7,61 (1H, d, J=8 Hz, ArH), 8,11-8,13 (2H, m, ArH); **¹³C-NMR** (125 MHz, δ/ppm): 28,0 (1C, piperidin), 28,80 (1C, piperidin), 39,9 (1C, CH₂), 41,5 (1C, piperidin), 45,4 (1C, piperidin), 49,3 (2C, piperazin), 50,9 (2C, piperazin), 55,30 (1C, OCH₃), 61,55 (1C, piperidin), 111,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,13 (1C, 2-metoksifenil grupa), 121,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,0 (1C, 3-nitrofenil grupa), 123,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 123,0 (1C, 3-nitrofenil grupa), 129,4 (1C, 3-nitrofenil grupa), 135,3 (1C, 3-nitrofenil grupa), 137,2 (1C, 3-nitrofenil grupa), 141,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 148,3 (1C, 3-nitrofenil grupa), 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 167,76 (1C, C=O); **MS**: m/z [M+H]⁺ izračunato za C₂₄H₃₀N₄O₄ 439,2301, izmereno 439,2346.

1-{4-[4-(2-Metoksifenil)piperazin-1-il]piperidin-1-il}-2-(4-nitrofenil)etanon (**76**):
Prinos: 70%. Ulje. **IR** (ATR, cm⁻¹): 1645,1, 1500,8, 1345,9, 1240,5, 1027,0; **¹H-NMR** (500 MHz, δ/ppm): 1,29-1,50 (2H, m, piperidin), 1,88-1,95 (2H, m, piperidin), 2,50 (1H, tt, J=3,5 Hz, J=11 Hz, piperidin), 2,66 (1H, t, J=13 Hz, piperidin), 2,75 (4H, m, piperazin), 3,07 (5H, m, piperazin i piperidin), 3,83 (2H, s, CH₂), 3,86 (3H, s, OCH₃), 3,91 (1H, d, J=13,5 Hz, piperidin), 4,66 (1H, d, J=13,5 Hz, piperidin), 6,85-6,86 (1H, m, ArH), 6,91-6,94 (2H, m, ArH), 6,98-7,02 (1H, m, ArH), 7,42 (2H, d, J=8,5 Hz, ArH),

8,19 (2H, d, J=8,5 Hz, ArH); ¹³C-NMR (125 MHz, δ/ppm): 28,0 (1C, piperidin), 28,9 (1C, piperidin), 40,3 (1C, CH₂), 41,5 (1C, piperidin), 45,5 (1C, piperidin), 49,3 (2C, piperazin), 50,9 (2C, piperazin), 55,3 (1C, OCH₃), 61,5 (1C, piperidin), 111,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 121,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 123,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 123,8 (2C, 4-nitrofenil grupa), 129,8 (2C, 4-nitrofenil grupa), 141,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 142,78 (1C, 4-nitrofenil grupa), 146,9 (1C, 4-nitrofenil grupa), 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 167,6 (1C, C=O); **MS**: m/z [M+H]⁺ izračunato za C₂₄H₃₀N₄O₄ 439,2301, izmereno 439,2245.

1-(4-{[4-(2-Metoksifenil)piperazin-1-il]metil}piperidin-1-il)-2-(fenil)etanon (77):
Prinos: 74%. Ulje. **IR** (ATR, cm⁻¹): 1638,1, 1240,2, 1017,0; ¹H-NMR (500 MHz, δ/ppm): 0,87 (1H, qd, J=4 Hz, J=11,5 Hz, piperidin), 1,07 (1H, qd, J=4 Hz, J=11 Hz, piperidin), 1,69-1,72 (1H, m, piperidin), 1,79 (1H, d, J=13 Hz, piperidin), 1,90-1,93 (1H, m, piperidin), 2,18 (2H, dd, J=2,5 Hz, J=6 Hz, CH₂-N), 2,56-2,61 (5H, m, piperazin i piperidin), 2,94 (1H, t, J=13,5 Hz, piperidin), 3,05 (4H, s, piperazin), 3,73 (2H, s, CH₂), 3,84 (4H, m, OCH₃ i piperidin), 4,63 (1H, d, J=13,5 Hz, piperidin), 6,84-6,85 (1H, m, ArH), 6,90-6,93 (2H, m, ArH), 6,96-7,00 (1H, m, ArH), 7,23-7,26 (3H, m, ArH), 7,29-7,32 (2H, m, ArH); ¹³C-NMR (125 MHz, δ/ppm): 30,4 (1C, piperidin), 31,1 (1C, piperidin), 33,5 (1C, piperidin), 41,2 (1C, CH₂), 42,0 (1C, piperidin), 46,3 (1C, piperidin), 50,6 (2C, piperazin), 53,8 (2C, piperazin), 55,3 (1C, OCH₃), 64,3 (1C, CH₂-N), 111,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,8 (1C, 2-metoksifenil grupa), 126,6 (1C, fenil grupa), 128,5 (2C, fenil grupa), 128,6 (2C, fenil grupa), 135,3 (1C, fenil grupa), 141,3 (1C, 2-metoksifenil grupa), 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 169,2 (1C, C=O); **MS**: m/z [M+H]⁺ izračunato za C₂₅H₃₃N₃O₂ 408,26063, izmereno 408,26387.

1-(4-{[4-(2-Metoksifenil)piperazin-1-il]metil}piperidin-1-il)-2-(2-nitrofenil)etanon (78):
Prinos: 65%. Ulje. **IR** (ATR, cm⁻¹): 1645,4, 1500,1, 1349,7, 1239,9, 1016,4; ¹H-NMR (500 MHz, δ/ppm): 1,11-1,17 (1H, m, piperidin), 1,26 (1H, qd, J=3,5 Hz, J=11,5 Hz, piperidin), 1,80-1,83 (2H, m, piperidin), 1,92 (1H, d, J=12 Hz, piperidin), 2,28 (2H, d, J=7 Hz, CH₂-N), 2,61-2,66 (5H, m, piperazin i piperidin), 3,08-3,16 (5H, m, piperazin i piperidin), 3,86 (3H, s, OCH₃), 3,96-4,13 (3H, m, CH₂ i piperidin), 4,58 (1H, d, J=13 Hz, piperidin), 6,85-6,86 (1H, m, ArH), 6,89-6,6,95 (2H, m, ArH), 6,97-7,01 (1H, m, ArH), 7,32-7,33 (1H, m, ArH), 7,41-7,44 (1H, m, ArH), 7,54-7,57 (1H, m, ArH),

8,08 (1H, m, ArH); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, δ/ppm): 30,5 (1C, piperidin), 31,2 (1C, piperidin), 33,6 (1C, piperidin), 38,6 (1C, CH_2), 42,4 (1C, piperidin), 46,0 (1C, piperidin), 50,6 (2C, piperazin), 53,9 (2C, piperazin), 55,3 (1C, OCH_3), 64,3 (1C, $\text{CH}_2\text{-N}$), 111,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,8 (1C, 2-metoksifenil grupa), 125,0 (1C, 2-nitrofenil grupa), 128,0 (1C, 2-nitrofenil grupa), 131,6 (1C, 2-nitrofenil grupa), 133,2 (1C, 2-nitrofenil grupa), 133,2 (1C, 2-nitrofenil grupa), 141,4 (1C, 2-metoksifenil grupa), 149,0 (1C, 2-nitrofenil grupa), 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 167,2 (1C, C=O); **MS**: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_4$ 453,2457, izmereno 453,2491.

1-(4-{[4-(2-Metoksifenil)piperazin-1-il]metil}piperidin-1-il)-2-(3-nitrofenil)etanon (79): Prinos: 69%. Ulje. **IR** (ATR, cm^{-1}): 1640,9, 1501,1, 1342,2, 1246,0, 1012,9; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, δ/ppm): 1,02-1,16 (2H, m, piperidin), 1,89-1,87 (3H, m, piperidin), 2,29 (2H, d, $J=6,5$ Hz, $\text{CH}_2\text{-N}$), 2,61-2,65 (5H, m, piperazin i piperidin), 3,02-3,08 (5H, m, piperazin i piperidin), 3,81 (2H, s, CH_2), 3,86-3,89 (4H, m, OCH_3 i piperidin), 4,61 (1H, d, $J=13,5$ Hz, piperidin), 6,85-6,86 (1H, m, ArH), 6,91-6,92 (2H, m, ArH), 6,98-7,01 (1H, m, ArH), 7,48-7,51 (1H, m, ArH), 7,60-7,61 (1H, m, ArH), 8,11-8,12 (2H, m, ArH); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, δ/ppm): 30,4 (1C, piperidin), 31,2 (1C, piperidin), 33,3 (1C, piperidin), 39,9 (1C, CH_2), 42,2 (1C, piperidin), 46,2 (1C, piperidin), 50,3 (2C, piperazin), 53,4 (2C, piperazin), 55,3 (1C, OCH_3), 64,0 (1C, $\text{CH}_2\text{-N}$), 111,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 121,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 121,9 (1C, 3-nitrofenil grupa), 123,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 124,0 (1C, 3-nitrofenil grupa), 129,4 (1C, 3-nitrofenil grupa), 135,4 (1C, 3-nitrofenil grupa), 137,2 (1C, 3-nitrofenil grupa), 141,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 148,3 (1C, 3-nitrofenil grupa), 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 167,8 (1C, C=O); **MS**: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_4$ 453,2457, izmereno 453,2487.

1-(4-{[4-(2-Metoksifenil)piperazin-1-il]metil}piperidin-1-il)-2-(4-nitrofenil)etanon (80): Prinos: 72%. Ulje. **IR** (ATR, cm^{-1}): 1641,6, 1518,8, 1345,9, 1237,3, 1020,8; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, δ/ppm): 0,95-1,14 (2H, m, piperidin), 1,77-1,84 (3H, m, piperidin), 2,27 (2H, d, $J=6,5$ Hz, $\text{CH}_2\text{-N}$), 2,60-2,65 (5H, m, piperazin i piperidin), 3,00-3,08 (5H, m, piperazin i piperidin), 3,82 (2H, s, CH_2), 3,85 (4H, s, OCH_3 i piperidin), 4,62 (1H, d, $J=13$ Hz, piperidin), 6,85-6,86 (1H, m, ArH), 6,91-6,92 (2H, m, ArH), 6,98-7,01 (1H, m, ArH), 7,41 (2H, d, $J=8,5$ Hz, ArH), 8,18 (2H, d, $J=8,5$ Hz, ArH); $^{13}\text{C-NMR}$

(125 MHz, δ /ppm): 30,4 (1C, piperidin), 31,3 (1C, piperidin), 33,4 (1C, piperidin), 40,5 (1C, CH₂), 42,2 (1C, piperidin), 46,3 (1C, piperidin), 50,4 (2C, piperazin), 53,4 (2C, piperazin), 55,3 (1C, OCH₃), 64,1 (1C, CH₂-N), 111,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 121,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 123,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 123,8 (2C, 4-nitrofenil grupa), 129,9 (2C, 4-nitrofenil grupa), 141,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 142,9 (1C, 4-nitrofenil grupa), 146,9 (1C, 4-nitrofenil grupa) 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 167,8 (1C, C=O); **MS**: m/z [M+H]⁺ izračunato za C₂₅H₃₂N₄O₄ 453,2457, izmereno 453,2501.

Opšti postupak za dobijanje jedinjenja 81-88: Za redukciju ovih jedinjenja koristi se propis korišten za dobijanje etil 4-{[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il]metil}piperidin-1-karboksilata (**43**).

1-(2-Metoksifenil)-4-(1-fenilpiperidin-4-il)piperazin (81): Prinos: 54%. T.t. 119 °C; **IR** (ATR, cm⁻¹): 1589,0, 1451,1, 1241,1, 1030,3; **¹H-NMR** (500 MHz, δ /ppm): 1,66 (2H, qd, J=3,5 Hz, J=12,5 Hz, piperidin), 1,87 (2H, d, J=12,5 Hz, piperidin), 2,04 (2H, t, J=11,5 Hz, piperidin), 2,35 (1H, tt, J=3,5 Hz, J=11,5 Hz, piperidin), 2,57-2,60 (2H, m, CH₂-N), 2,77-2,82 (6H, m, piperazin i CH₂), 3,08-3,10 (6H, m, piperazin i piperidin), 3,86 (3H, s, OMe), 6,84-6,86 (1H, m, ArH), 6,89-7,00 (3H, m, ArH), 7,17-7,21 (3H, m, ArH), 7,26-7,29 (2H, m, ArH); **¹³C-NMR** (125 MHz, δ /ppm): 28,0 (2C, piperidin), 33,8 (1C, CH₂), 49,1 (2C, piperazin), 51,0 (2C, piperazin), 53,3 (2C, piperidin), 55,2 (1C, OMe), 60,5 (1C, CH₂-N), 62,1 (1C, piperidin), 111,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,8 (1C, 2-metoksifenil grupa), 125,9 (1C, fenil grupa), 128,3 (2C, fenil grupa), 128,6 (2C, fenil grupa), 140,4 (1C, fenil grupa), 141,3 (1C, 2-metoksifenil grupa), 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa); **MS** (m/z): [M+H]⁺ izračunato za C₂₄H₃₃N₃O 380,2657, izmereno 380,2688,

1-(2-Metoksifenil)-4-[1-(2-nitrofenetil)piperidin-4-il]piperazin (82): Prinos: 56%. T.t. 96 °C; **IR** (ATR, cm⁻¹): 1593,2, 1522,8, 1456,4, 1346,9, 1241,8, 1023,4; **¹H-NMR** (500 MHz, δ /ppm): 1,65 (2H, qd, J=3,5 Hz, J=10 Hz, piperidin), 1,88 (2H, d, J=12 Hz, piperidin), 2,12 (2H, t, J=11,5 Hz, piperidin), 2,36 (1H, tt, J=4 Hz, J=11,5 Hz, piperidin), 2,63-2,67 (2H, m, CH₂-N), 2,78-2,80 (4H, m, piperazin), 3,05-3,12 (8H, m, piperazin, piperidin i CH₂), 3,86 (3H, s, OMe), 6,84-6,86 (1H, m, Ar), 6,89-7,01 (3H, m, ArH), 7,33-7,39 (2H, m, Ar), 7,49-7,53 (1H, m, ArH), 7,88-7,90 (1H, m, ArH);

¹³C-NMR (125 MHz, δ /ppm): 27,9 (2C, piperidin), 30,6 (1C, CH₂), 49,2 (2C, piperazin), 50,8 (2C, piperazin), 53,0 (2C, piperidin), 55,3 (1C, OCH₃), 58,9 (1C, CH₂-N), 62,9 (1C, piperidin), 111,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,8 (1C, 2-metoksifenil grupa), 124,6 (1C, 2-nitrofenil grupa), 127,1 (1C, 2-nitrofenil grupa), 132,4 (1C, 2-nitrofenil grupa), 132,8 (1C, 2-nitrofenil grupa), 135,4 (1C, 2-nitrofenil grupa), 141,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 149,5 (1C, 2-nitrofenil grupa), 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa); **MS** (m/z): [M+H]⁺ izračunato za C₂₄H₃₂N₄O₃ 425,2508, izmereno 425,2540.

1-(2-Metoksifenil)-4-[1-(3-nitrofenetil)piperidin-4-il]piperazin (83): Prinos: 50%. Ulje. **IR** (ATR, cm⁻¹): 1588,3, 1521,2, 1450,4, 1349,8, 1239,7, 1029,6; **¹H-NMR** (500 MHz, δ /ppm): 1,64 (2H, qd, J=3,5 Hz, J=10 Hz, piperidin), 1,90 (2H, d, J=12,5 Hz, piperidin), 2,07 (2H, t, J= 10 Hz, piperidin), 2,35 (1H, tt, J=3 Hz, J=11,5 Hz, piperidin), 2,60-2,63 (2H, m, CH₂-N), 2,79-2,80 (4H, m, piperazin), 2,93 (2H, t, J=7,5 Hz, CH₂), 3,05-3,11 (6H, m, piperazin i piperidin), 3,86 (3H, s, OCH₃), 6,85-6,86 (1H, m, ArH), 6,91-7,01 (3H, m, ArH), 7,44 (1H, t, J=8 Hz, ArH), 7,54 (1H, d, J=7,5 Hz, ArH) 8,05-8,09 (2H, m, ArH); **¹³C-NMR** (125 MHz, δ /ppm): 28,1 (2C, piperidin), 33,3 (1C, CH₂), 49,2 (2C, piperazin), 50,9 (2C, piperazin), 53,2 (2C, piperidin), 55,3 (1C, OCH₃), 59,9 (1C, CH₂-N), 62,0 (1C, piperidin), 111,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 121,1 (1C, 3-nitrofenil grupa), 122,8 (1C, 2-metoksifenil grupa), 123,5 (1C, 3-nitrofenil grupa), 129,1 (1C, 3-nitrofenil grupa), 135,0 (1C, 3-nitrofenil grupa), 141,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 142,5 (1C, 3-nitrofenil grupa), 148,2 (1C, 3-nitrofenil grupa), 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa); **MS** (m/z): [M+H]⁺ izračunato za C₂₄H₃₂N₄O₃ 425,2508, izmereno 425,2559.

1-(2-Metoksifenil)-4-[1-(4-nitrofenetil)piperidin-4-il]piperazin (84): Prinos: 57%. Ulje. **IR** (ATR, cm⁻¹): 1599,8, 1512,9, 1450,4, 1347,8, 1240,7, 1020,6; **¹H-NMR** (500 MHz, δ /ppm): 1,67 (2H, qd, J=3,5 Hz, J=12 Hz, piperidin), 1,93 (2H, d, J=12,5 Hz, piperidin), 2,09 (2H, t, J=11,5 Hz, piperidin), 2,41 (1H, tt, J=4 Hz, J=11,5 Hz, piperidin), 2,61-2,64 (2H, m, CH₂-N), 2,82-2,95 (6H, m, piperazin i CH₂), 3,06-3,14 (6H, m, piperazin i piperidin), 3,86 (3H, s, OCH₃), 6,85-7,02 (4H, m, ArH), 7,27-7,37 (2H, m, ArH), 8,12-8,14 (2H, m, ArH); **¹³C-NMR** (125 MHz, δ /ppm): 27,8 (2C, piperidin), 33,5 (1C, CH₂), 49,1 (2C, piperazin), 50,6 (2C, piperazin), 53,0 (2C, piperidin), 55,2 (1C, OMe), 59,2 (1C, CH₂-N), 62,9 (1C, piperidin), 111,0 (1C,

2-metoksifenil grupa), 118,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 123,5 (2C, 4-nitrofenil grupa), 129,9 (2C, 4-nitrofenil grupa), 141,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 146,4 (1C, 4-nitrofenil grupa), 148,2 (1C, 4-nitrofenil grupa), 152,1 (1C, 2-metoksifenil grupa); **MS** (m/z): [M+H]⁺ izračunato za C₂₄H₃₂N₄O₃ 425,2508, izmereno 425,2547.

1-(2-Metoksifenil)-4-[(1-fenetilpiperidin-4-il)metil]piperazin (85): Prinos: 54%. Ulje. **IR** (ATR, cm⁻¹): 1590,1, 1450,4, 1243,6, 1025,5; **¹H-NMR** (500 MHz, δ/ppm): 1,31 (2H, qd, J=3,5 Hz, J=12 Hz, piperidin), 1,54-1,58 (1H, m, piperidin), 1,81 (2H, d, J=12,5 Hz, piperidin), 2,02 (2H, t, J=10,5 Hz, piperidin), 2,26 (2H, d, J=7 Hz, CH₂-N), 2,57-2,61 (6H, m, piperazin i CH₂-CH₂-N), 2,81-2,84 (2H, m, CH₂-CH₂-N), 2,89 (1H, t, J=6,5 Hz, piperidin), 3,03 (1H, d, J=11 Hz, piperidin), 3,08 (4H, s, piperazin), 3,86 (3H, s, OCH₃), 6,84-6,86 (1H, m, ArH), 6,91-7,00 (3H, m, ArH), 7,19-7,29 (5H, m, ArH); **¹³C-NMR** (125 MHz, δ/ppm): 30,9 (2C, piperidin), 33,2 (1C, CH₂-CH₂-N), 33,7 (1C, piperidin), 50,6 (2C, piperazin), 52,5 (2C, piperidin), 53,7 (2C, piperazin), 55,2 (1C, OCH₃), 61,0 (1C, CH₂-CH₂-N), 64,8 (1C, CH₂-N), 111,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,7 (1C, 2-metoksifenil grupa), 125,9 (1C, fenil grupa), 128,3 (2C, fenil grupa), 128,6 (2C, fenil grupa), 140,5 (1C, fenil grupa), 141,4 (1C, 2-metoksifenil grupa), 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa); **MS** (m/z): [M+H]⁺ izračunato za C₂₅H₃₅N₃O 394,2814, izmereno 394,2846.

1-(2-Metoksifenil)-4-[[1-(2-nitrofenetil)piperidin-4-il]metil]piperazin (86): Prinos: 55%. Ulje. **IR** (ATR, cm⁻¹): 1591,9, 1525,9, 1451,1, 1349,5, 1241, 1026,4; **¹H-NMR** (500 MHz, δ/ppm): 1,31 (2H, qd, J=3,5 Hz, J=13 Hz, piperidin), 1,55-1,59 (1H, m, piperidin), 1,80 (2H, d, J=12 Hz, piperidin), 2,12 (2H, t, J=12 Hz, piperidin), 2,27 (2H, d, J=7 Hz, CH₂-N), 2,61-2,70 (6H, m, piperazin i CH₂-CH₂-N), 3,02-3,14 (8H, m, piperazin, CH₂-CH₂-N i piperidin), 3,86 (3H, s, OCH₃), 6,84-6,86 (1H, m, ArH), 6,89-6,95 (2H, m, ArH), 6,97-7,00 (1H, m, ArH), 7,32-7,36 (1H, m, ArH), 7,38-7,40 (1H, m, ArH), 7,50-7,53 (1H, m, ArH), 7,88-7,90 (1H, m, ArH); **¹³C-NMR** (125 MHz, δ/ppm): 22,8 (2C, piperidin), 30,3 (1C, CH₂-CH₂-N), 33,7 (1C, piperidin), 50,6 (2C, piperazin), 53,4 (2C, piperidin), 53,8 (2C, piperazin), 55,3 (1C, OCH₃), 59,1 (1C, CH₂-CH₂-N), 64,6 (1C, CH₂-N), 111,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,7 (1C, 2-metoksifenil

grupa), 124,6 (1C, 2-nitrofenil grupa), 127,1 (1C, 2-nitrofenil grupa), 132,4 (1C, 2-nitrofenil grupa), 132,8 (1C, 2-nitrofenil grupa), 135,4 (1C, 2-nitrofenil grupa), 141,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 149,5 (1C, 2-nitrofenil grupa), 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa); **MS** (m/z): [M+H]⁺ izračunato za C₂₅H₃₄N₄O₃ 439,2665, izmereno 439,2694.

1-(2-Metoksifenil)-4-[[1-(3-nitrofenetil)piperidin-4-il]metil]piperazin (87): Prinos: 50%. Ulje. **IR** (ATR, cm⁻¹): 1589,1, 1523, 1454,1, 1347,8, 1238,3, 1026,4; **¹H-NMR** (500 MHz, δ/ppm): 1,25-1,34 (2H, m, piperidin), 1,55-1,60 (1H, m, piperidin), 1,81 (2H, d, J=11,5 Hz, piperidin), 2,05 (2H, t, J=10,5 Hz, piperidin), 2,27 (2H, d, J=7 Hz, CH₂-N), 2,61-2,64 (6H, m, piperazin i CH₂-CH₂-N), 2,91-2,94 (2H, m, CH₂-CH₂-N), 3,01 (2H, d, J=6,5 Hz, piperidin), 3,08 (4H, s, piperazin), 3,86 (3H, s, OCH₃), 6,85-6,86 (1H, m, ArH) 6,89-6,95 (2H, m, ArH), 6,97-7,01 (1H, m, ArH), 7,44 (1H, t, J=8 Hz, Ar), 7,54 (1H, d, J=7,5 Hz, ArH), 8,05-8,09 (2H, m, ArH); **¹³C-NMR** (125 MHz, δ/ppm): 30,9 (2C, piperidin), 33,2 (1C, CH₂-CH₂-N), 33,2 (1C, piperidin), 50,6 (2C, piperazin), 53,7 (2C, piperazin), 53,9 (2C, piperidin), 55,3 (1C, OCH₃), 60,0 (1C, CH₂-CH₂-N), 64,7 (1C, CH₂-N), 111,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 121,2 (1C, 3-nitrofenil grupa), 122,8 (1C, 2-metoksifenil grupa), 123,5 (1C, 3-nitrofenil grupa), 129,1 (1C, 3-nitrofenil grupa), 135,0 (1C, 3-nitrofenil grupa), 141,4 (1C, 2-metoksifenil grupa), 142,5 (1C, 3-nitrofenil grupa), 148,3 (1C, 3-nitrofenil grupa), 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa); **MS** (m/z): [M+H]⁺ izračunato za C₂₅H₃₄N₄O₃ 439,2665, izmereno 439,2713.

1-(2-Metoksifenil)-4-[[1-(4-nitrofenetil)piperidin-4-il]metil]piperazin (88): Prinos: 54%. Ulje. **IR** (ATR, cm⁻¹): 1599,5, 1519,1, 1452,9, 1344,6, 1242,2, 1021,3; **¹H-NMR** (500 MHz, δ/ppm): 1,25-1,43 (2H, m, piperidin), 1,55-1,60 (1H, m, piperidin), 1,81 (2H, d, J=12 Hz, piperidin), 2,05 (2H, t, J=10 Hz, piperidin), 2,27 (2H, d, J=7 Hz, CH₂-N), 2,60-2,64 (6H, m, piperazin i CH₂-CH₂-N), 2,89-3,08 (8H, m, piperazin, CH₂-CH₂-N i piperidin), 3,86 (3H, s, OCH₃), 6,80-7,00 (4H, m, ArH), 7,23-7,27 (2H, m, ArH), 8,11-8,14 (2H, m, ArH); **¹³C-NMR** (125 MHz, δ/ppm): 30,8 (2C, piperidin), 33,1 (1C, CH₂-CH₂-N), 33,4 (1C, piperidin), 50,5 (2C, piperazin), 53,7 (2C, piperazin), 53,8 (2C, piperidin), 55,2 (1C, OCH₃), 59,8 (1C, CH₂-N), 64,6 (1C, piperidin), 111,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,7 (1C, 2-metoksifenil grupa), 123,5 (2C, 4-nitrofenil grupa), 129,4 (2C, 4-nitrofenil grupa), 141,3 (1C, 2-metoksifenil grupa), 146,4 (1C, 4-nitrofenil grupa),

148,4 (1C, 4-nitrofenil grupa) 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa); **MS** (m/z): $[M+H]^+$ izračunato za $C_{25}H_{34}N_4O_3$ 439,2665, izmereno 439,2700.

Sinteza metil 8-bromooktanoata (95): U dvogrlom balonu koji je opremljen refluks kondenzatorom i kapalicom napravi se rastvor od metil estra azelainske kiseline (**94**) (0,175 mol) i 250 ml ugljentetrahlorida. U rastvor se potom pažljivo, u struji argona, doda anh. $MgSO_4$ (0,175 mol) i crveni HgO (0,263 mol). Smeša se zagreva na $80\text{ }^\circ C$ uz ukapavanje broma (0,263 mol) u toku 30 min. Tok reakcije se prati hromatografski. Po završetku reakcije reakciona smeša se ohladi na sobnu temperaturu i procedi kroz dijatomejsku zemlju. Filtrat se ekstrahuje 10% rastvorom $NaHCO_3$, donji organski sloj se odvoji, osuši nad anh. Na_2SO_4 i upari pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod se prečišćava destilacijom pod sniženim pritiskom. Prinos: 51%. Ulje. **IR** (ATR, cm^{-1}): 2933,9, 1738,4, 1436,9, 1240,5, 1173,4; **1H -NMR** (200 MHz, δ/ppm): 1,35-1,47 (6H, m, CH_2), 1,57-1,68 (2H, m, CH_2), 1,79-1,92 (2H, m, CH_2), 2,28-2,39 (2H, m, CH_2), 3,41 (2H, t, $J=8\text{ Hz}$, CH_2), 3,67 (3H, s, OCH_3); **^{13}C -NMR** (50 MHz, δ/ppm): 24,3 (1C, CH_2), 27,9 (1C, CH_2), 28,3 (1C, CH_2), 28,9 (1C, CH_2), 32,41 (1C, CH_2), 33,9 (2C, CH_2), 51,3 (1C, OCH_3), 174,2 (C=O); **MS** (m/z): $[M+H]^+$ izračunato za $C_9H_{17}BrO_2$ 237,0446, izmereno 237,0488.

Uopšteni postupak za sintezu jedinjenja 102-108: U dvogrlom balonu koji je opremljen refluks kondenzatorom i termometrom napravi se smeša 1-(2-metoksifenil)piperazina (**36**) (0,084 mol), trietilamina (0,0874 mol), K_2CO_3 (0,175 mol) i odgovarajućeg haloestra **95-101** (0,084 mol) u metil etil ketonu (100 ml). Smeša se meša 24 sata na $80\text{ }^\circ C$. Reakciona smeša se ohladi, izlije u hladnu vodu i ekstrahuje metilen hloridom. Donji organski sloj se odvoji, osuši nad anh, Na_2SO_4 i upari pod sniženim pritiskom. Dobijeni proizvod se prečišćava hromatografijom na koloni koristeći metilen hlorid/metanol kao eluent (95:5).

Metil 2-[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il]acetat (102): Prinos: 95%. Narandžasti kristali. T.t. $50\text{ }^\circ C$; **IR** (ATR, cm^{-1}): 2820,2, 1724,3, 1500,9, 1451,7, 1241,4, 1027,1, 751,3; **1H -NMR** (200 MHz, δ/ppm): 2,75-2,80 (4H, m, piperazin), 3,12-3,17 (4H, m, piperazin), 3,29 (2H, s, CH_2), 3,73 (3H, s, OCH_3), 3,85 (3H, s, 2-metoksifenil grupa), 6,83-7,04 (4H, m, ArH); **^{13}C -NMR** (50 MHz, δ/ppm): 50,2 (2C, piperazin), 51,6 (1C, OCH_3), 53,2 (2C, piperazin), 55,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 59,4 (1C, CH_2-N), 111,0

(1C, 2-metoksifenil grupa), 118,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 141,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 152,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 170,6 (1C, C=O); **MS**: (m/z) [M+H]⁺ izračunato za C₁₄H₂₀N₂O₃ 265,1507, izmereno 265,1549.

Etil 3-[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il]propanoat (103): Prinos: 84%. Ulje. **IR** (ATR, cm⁻¹): 2818,6, 1734,0, 1501,0, 1452,7, 1241,3, 1026,5, 749,6; **¹H-NMR** (200 MHz, δ/ppm): 1,27 (3H, t, J=7,4 Hz, CH₂CH₃), 2,50-2,58 (2H, m, CH₂), 2,66-2,71 (4H, m, piperazin), 2,75-2,82 (2H, m, CH₂), 3,07-3,12 (4H, m, piperazin), 3,86 (3H, s, OCH₃), 4,16 (2H, q, J=7,4 Hz, J=11,4 Hz, OCH₂), 6,84-7,04 (4H, m, ArH); **¹³C-NMR** (50 MHz, δ/ppm): 14,0 (1C, CH₃), 32,1 (1C, CH₂), 50,4 (2C, piperazin), 52,9 (2C, piperazin), 53,5 (1C, OCH₃), 55,1 (1C, CH₂-N), 60,2 (1C, OCH₂), 111,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,00 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,80 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,73 (1C, 2-metoksifenil grupa), 141,12 (1C, 2-metoksifenil grupa), 152,08 (1C, 2-metoksifenil grupa), 172,35 (1C, C=O); **MS**: (m/z) [M+H]⁺ izračunato za C₁₆H₂₄N₂O₃ 293,1821, izmereno 293,1858.

Etil 4-[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il]butanoat (104): Prinos: 87%. Ulje. **IR** (ATR, cm⁻¹): 2817,0, 1732,8, 1501,1, 1452,5, 1241,3, 1028,1, 750,6; **¹H-NMR** (200 MHz, δ/ppm): 1,25 (3H, t, J= 7,4 Hz, CH₂CH₃), 1,78-1,92 (2H, m, CH₂), 2,32-2,47 (4H, m, CH₂), 2,62-2,66 (4H, m, piperazin), 3,08 (4H, s, piperazin), 3,85 (3H, s, OCH₃), 4,13 (2H, q, J= 6,6 Hz, J= 7,4 Hz, OCH₂), 6,83-7,03 (4H, m, ArH); **¹³C-NMR** (50 MHz, δ/ppm): 14,1 (1C, CH₃), 22,0 (1C, CH₂), 32,19 (1C, CH₂), 50,5 (2C, piperazin), 53,2 (2C, piperazin), 55,2 (1C, OCH₃), 57,6 (1C, CH₂-N), 60,1 (1C, OCH₂), 111,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,8 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,7 (1C, 2-metoksifenil grupa), 141,3 (1C, 2-metoksifenil grupa), 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 173,5 (1C, C=O); **MS**: (m/z) [M+H]⁺ izračunato za C₁₇H₂₆N₂O₃ 307,1977, izmereno 307,2015.

Metil 5-[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il]pentanoat (105): Prinos: 69%. Ulje. **IR** (ATR, cm⁻¹): 2818,4, 1737,6, 1500,9, 1450,9, 1241,1, 1027,2, 751,1; **¹H-NMR** (200 MHz, δ/ppm): 1,47-1,57 (4H, m, CH₂), 2,20-2,35 (4H, m, CH₂), 2,54 (4H, s, piperazin), 3,00 (4H, s, piperazin), 3,53-3,56 (3H, m, OCH₃), 3,72-3,74 (3H, m, 2-metoksifenil grupa), 6,74-6,88 (4H, m, ArH); **¹³C-NMR** (50 MHz, δ/ppm): 22,4 (1C, CH₂), 25,8 (1C, CH₂), 33,4 (1C, CH₂), 50,1 (2C, piperazin), 50,9 (1C, OCH₃), 52,9 (2C, piperazin), 54,8 (1C,

2-metoksifenil grupa), 57,7 (1C, CH₂-N), 110,6 (1C, 2-metoksifenil grupa), 117,6 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,5 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,3 (1C, 2-metoksifenil grupa), 140,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 151,8 (1C, 2-metoksifenil grupa), 173,4 (1C, C=O); (m/z) [M+H]⁺ izračunato za C₁₇H₂₆N₂O₃ 307,1977, izmereno 307,2005.

Etil 6-[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il]heksanoat (106): Prinos: 91%. Ulje. **IR** (ATR, cm⁻¹): 2814,2, 1734,5, 1501,2, 1452,5, 1240,9, 1029,8, 748,0; **¹H-NMR** (200 MHz, δ/ppm): 1,21 (3 H, t, J=7,4 Hz, CH₂CH₃), 1,27-1,39 (2H, m, CH₂), 1,45-1,70 (4H, m, CH₂), 2,23-2,40 (4H, m, CH₂), 2,60 (4H, s, piperazin), 3,06 (4H, s, piperazin), 3,81 (3H, s, OCH₃), 4,02-4,14 (2H, m, OCH₂), 6,79-7,00 (4H, m, ArH); **¹³C-NMR** (50 MHz, δ/ppm): 14,1 (1C, CH₃), 24,7 (1C, CH₂), 26,4 (1C, CH₂), 27,0 (1C, CH₂), 34,1 (1C, CH₂), 50,5 (2C, piperazin), 53,3 (2C, piperazin), 55,1 (1C, OCH₃), 58,42 (1C, CH₂-N), 60,0 (1C, OCH₂), 111,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,8 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,7 (1C, 2-metoksifenil grupa), 141,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 152,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 173,6 (1C, C=O); **MS**: (m/z) [M+H]⁺ izračunato za C₁₉H₃₀N₂O₃ 335,2290, izmereno 335,2334.

Etil 7-[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il]heptanoat (107): Prinos: 92%. Ulje. **IR** (ATR, cm⁻¹): 2818,4, 1734,5, 1501,4, 1450,3, 1240,1, 1028,6, 750,3; **¹H-NMR** (200 MHz, δ/ppm): 1,20 (3H, t, J=7,4 Hz, CH₂-CH₃), 1,28-1,33 (4H, m, CH₂), 1,38-1,66 (4H, m, CH₂), 2,21-2,38 (4H, m, CH₂), 2,59 (4H, s, piperazin), 3,05 (4H, s, piperazin), 3,80 (3H, s, OCH₃), 4,07 (2H,q, J=7,2 Hz, J=7,4 Hz, OCH₂), 6,78 (4H, m, ArH); **¹³C-NMR** (50 MHz, δ/ppm): 14,0 (1C, CH₃), 24,6 (1C, CH₂), 26,5 (1C, CH₂), 27,0 (1C, CH₂), 28,8 (1C, CH₂), 34,0 (1C, CH₂), 50,4 (2C, piperazin), 53,29 (2C, piperazin), 55,1 (1C, OCH₃), 58,5 (1C, CH₂-N), 59,9 (1C, OCH₂), 110,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 117,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,8 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,6 (1C, 2-metoksifenil grupa), 141,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 152,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 173,6 (1C, CO); **MS**: (m/z) [M+H]⁺ izračunato za C₂₀H₃₂N₂O₃ 349,2447, izmereno 349,2483.

Metil 8-[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il]oktanoat (108): Prinos: 82,8%. Ulje. **IR** (ATR, cm⁻¹): 2828,2, 1754,6, 1521,4, 1448,8, 1236,3, 1025,6, 755,4; **¹H-NMR** (200 MHz, δ/ppm): 1,25-1,32 (6H, m, CH₂), 1,53-1,66 (4H, m, CH₂), 2,26-2,43 (4H, m, CH₂), 2,65-2,67 (4H, m, piperazin), 3,10 (4H, s, piperazin), 3,66 (3H, s, OCH₃), 3,86 (3H, s, 2-metoksifenil grupa), 6,83-7,04 (4H, m, ArH); **¹³C-NMR** (50 MHz, δ/ppm): 24,8 (1C,

CH₂), 26,7(1C, CH₂), 27,3 (1C, CH₂), 29,1 (2C, CH₂), 34,0 (1C, CH₂), 50,6 (2C, piperazin), 51,3 (1C, OCH₃), 53,4 (2C, piperazin), 55,3 (1C, 2-metoksifenil grupa), 58,8 (1C, CH₂-N), 111,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 118,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,8 (1C, 2-metoksifenil grupa), 141,3 (1C, 2-metoksifenil grupa), 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 174,2 (1C, C=O); **MS**: (m/z) [M+H]⁺ izračunato za C₂₀H₃₂N₂O₃ 349,2447, izmereno 349,2484.

Uopšteni postupak za sintezu diamina 112-114: Ra/Ni (0,4–0,5 g) se dodaje, u malim porcijama uz mešanje, u reakcionu smešu koja sadrži odgovarajući nitro anilin **109-111** (6,5 mmol), 12 ml EtOH, 12 ml 1,2-dihloretana i (2 ml, 20 mmol) hidrazin-hidrata, na 30 °C. Nakon završenog dodavanja Ra/Ni reakciona smeša se zagreva na vodenom kupatilu (50 °C, 60 min,) i procedi kroz dijatomejsku zemlju. Filtrat se upari pod sniženim pritiskom i koristi u sledećoj fazi sinteze bez prečišćavanja.

Uopšteni postupak za sintezu jedinjenja 115-128: Odgovarajući estar **102-108** (3,5 mmol) i diamin **112-114** (3,5 mmol) se suspenduje u 8 ml 50% metansulfonske kiseline i prenese se u teflonski sud. Reakciona smeša se zagreva u mikrotalasnom reaktoru na temperaturi od 180 °C u trajanju od 45 min, pri snazi od 300 W. Nakon hlađenja reakciona smeša se izlije u ledenu vodu i zaalkališe sa zasićenim rastvorom NaOH. Proizvod se ekstrahuje metilen hloridom, a višak rastvarača se upari pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na koloni koristeći metilen hlorid/metanol kao eluent.

2-[[4-(2-Metoksifenil)piperazin-1-il]metil]-1H-benzo[d]imidazol (115): Prinos:16%. Ulje. **IR** (ATR, cm⁻¹): 2817,2, 1502,0, 1455,7, 1240,3, 1026,5, 743,0; **¹H-NMR** (200 MHz, δ/ppm): 2,74 (4H, m, piperazin), 3,08 (4H, m, piperazin), 3,84 (3H, s, OCH₃), 3,91 (2H, s, CH₂), 6,83 (3H, m, ArH), 6,97 (1H, m, ArH), 7,20 (3H, m, ArH), 7,51 (1H, m, ArH); **¹³C-NMR** (50 MHz, δ/ppm): 50,3 (2C, piperazin), 53,5 (2C, piperazin), 55,3 (1C, OCH₃), 56,3 (1C, CH₂-N), 111,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 115,0 (2C, benzimidazol), 118,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,4 (1C, 2-metoksifenil grupa), 123,1 (2C, benzimidazol), 138,4 (2C, benzimidazol), 140,8 (1C, 2-metoksifenil grupa), 151,7 (1C, 2-metoksifenil grupa), 152,2 (1C, benzimidazol); **MS**: (m/z) [M+H]⁺ izračunato za C₁₉H₂₂N₄O 323,1827, izmereno 323,1852.

2-{2-[4-(2-Metoksifenil)piperazin-1-il]etil}-1H-benzo[d]imidazol (**116**): Prinos: 36,5%; Ulje. **IR** (ATR, cm⁻¹): 2818,4, 1500,6, 1456,7, 1240,0, 1026,3, 745,2; **¹H-NMR** (200 MHz, δ/ppm): 2,77-2,81 (4H, m, piperazin), 2,85 (2H, t, J=6 Hz, CH₂), 3,11-3,17 (6H, m, piperazin i CH₂) 3,87 (3H, s, OCH₃), 6,90 (2H, t, J=8,4 Hz, ArH), 6,97-7,03 (2H, m, ArH), 7,16-7,26 (2H, m, ArH), 7,52-7,57 (2H, m, ArH i benzimidazol); **¹³C-NMR** (50 MHz, δ/ppm): 25,0 (1C, CH₂), 50,8 (2C, piperazin), 52,9 (2C, piperazin), 55,3 (1C, OCH₃), 58,1 (1C, CH₂-N), 111,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 114,7 (2C, benzimidazol), 118,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 123,2 (2C, benzimidazol), 138,6 (2C, benzimidazol), 140,8 (1C, 2-metoksifenil grupa), 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 154,5 (1C, benzimidazol); **MS**: (m/z) [M+H]⁺ izračunato za C₂₀H₂₄N₄O 337,1984, izmereno 337,2020.

2-{3-[4-(2-Metoksifenil)piperazin-1-il]propil}-1H-benzo[d]imidazol (**117**): Prinos: 55,7%. Ulje. **IR** (ATR, cm⁻¹): 2825,5, 1500,7, 1452,9, 1241,4, 1026,5, 746,5; **¹H-NMR** (200 MHz, δ/ppm): 1,96-2,08 (2H, m, CH₂), 2,64 (2H, t, J=5,6 Hz, CH₂), 2,76 (4H, s, piperazin), 3,11 (2H, t, J=6,2 Hz, CH₂), 3,20 (4H, s, piperazin), 3,87 (3H, s, OCH₃), 6,87-7,10 (4H, m, ArH), 7,15-7,26 (2H, m, ArH), 7,51-7,56 (2H, m, ArH); **¹³C-NMR** (50 MHz, δ/ppm): 23,2 (1C, CH₂), 28,9 (1C, CH₂), 50,4 (2C, piperazin), 53,5 (2C, piperazin), 55,3 (1C, OCH₃), 58,8 (1C, CH₂-N), 111,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 114,5 (2C, benzimidazol), 118,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 121,8 (1C, 2-metoksifenil grupa), 123,0 (2C, benzimidazol), 138,7 (2C, benzimidazol), 140,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 155,4 (1C, benzimidazol); **MS**: (m/z) [M+H]⁺ izračunato za C₂₁H₂₆N₄O 351,2140, izmereno 351,2168.

2-{4-[4-(2-Metoksifenil)piperazin-1-il]butil}-1H-benzo[d]imidazol (**118**): Prinos: 90,6%. Ulje. **IR** (ATR, cm⁻¹): 2818,3, 1499,7, 1456,0, 1244,1, 1028,9, 793,3; **¹H-NMR** (200 MHz, δ/ppm): 1,55-1,69 (2H, m, CH₂), 1,83-1,97 (2H, m, CH₂), 2,42 (2H, t, J=6,8 Hz, CH₂), 2,63 (4H, s, piperazin), 2,97 (2H, t, J=6,8 Hz, CH₂), 3,11(4H, s, piperazin), 3,84 (3H, s, OCH₃), 6,83-6,95 (3H, m, ArH), 6,97-7,09 (1H, m, ArH), 7,14-7,31 (2H, m, ArH), 7,51-7,55 (2H, m, ArH); **¹³C-NMR** (50MHz, δ/ppm): 25,4 (1C, CH₂), 26,0 (1C, CH₂), 28,8 (1C, CH₂), 50,3 (2C, piperazin), 53,2 (2C, piperazin), 55,2 (1C, OCH₃), 57,2 (1C, CH₂-N), 111,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 114,5 (2C,

benzimidazol), 118,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 121,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 123,1 (2C, benzimidazol), 138,6 (2C, benzimidazol), 140,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 152,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 155,4 (1C, benzimidazol); **MS**: (m/z) [M+H]⁺ izračunato za C₂₂H₂₈N₄O 365,2297, izmereno 365,2326.

2-{5-[4-(2-Metoksifenil)piperazin-1-il]pentil}-1H-benzo[d]imidazol (119): Prinos: 43%. Braon kristali. T.t. 63 °C; **IR** (ATR, cm⁻¹): 2825,2, 1500,3, 1454,9, 1240,7, 1023,6, 752,8; **¹H-NMR** (200 MHz, δ/ppm): 1,34-1,47 (2H, m, CH₂), 1,59-1,74 (2H, m, CH₂), 1,79-1,98 (2H, m, CH₂), 2,53-2,61 (2H, m, CH₂), 2,84-2,95 (6H, m, benzimidazol i piperazin), 3,17-3,21 (4H, m, piperazin), 3,86 (3H, s, OCH₃), 6,85-7,07 (4H, m, ArH), 7,15-7,22 (2H, m, ArH), 7,52-7,58 (2H, m, ArH); **¹³C-NMR** (50 MHz, δ/ppm): 25,5 (1C, CH₂), 26,6 (1C, CH₂), 27,8 (1C, CH₂), 28,8 (1C, CH₂), 49,9 (2C, piperazin), 53,0 (1C, OCH₃), 55,2 (2C, piperazin), 57,9 (1C, CH₂-N), 111,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 114,5 (2C, benzimidazol), 118,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 121,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 123,1 (2C, benzimidazol), 138,5 (2C, benzimidazol), 140,8 (1C, 2-metoksifenil grupa), 152,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 155,31 (1C, benzimidazol); **MS**: (m/z) [M+H]⁺ izračunato za C₂₃H₃₀N₄O 379,2453, izmereno 379,2479.

2-{6-[4-(2-Metoksifenil)piperazin-1-il]heksil}-1H-benzo[d]imidazol (120): Prinos: 69%; Braon kristali T.t. 134 °C; **IR** (ATR, cm⁻¹): 2828,5, 1503,0, 1454,6, 1240,6, 1019,5, 750; **¹H-NMR** (200 MHz, δ/ppm): 1,25-1,57 (6H, m, CH₂), 1,76-1,91 (2H, m, CH₂), 2,33-2,40 (2H, m, CH₂), 2,60-2,66 (4H, m, piperazin), 2,89 (2H, t, J=8 Hz, CH₂), 3,10 (4H, s, piperazin), 3,85 (3H, s, OCH₃), 6,84-7,03 (4H, m, ArH), 7,16 (2H, m, ArH), 7,51 (2H, m, ArH); **¹³C-NMR** (50 MHz, δ/ppm): 26,1 (1C, CH₂), 26,9 (1C, CH₂), 28,0 (1C, CH₂), 28,9 (1C, CH₂), 29,1 (1C, CH₂), 50,3 (2C, piperazin), 53,2 (2C, piperazin), 55,2 (1C, OCH₃), 58,4 (1C, CH₂-N), 111,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 114,5 (2C, benzimidazol), 118,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 121,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 123,0 (2C, benzimidazol), 138,6 (2C, benzimidazol), 141,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 155,4 (1C, benzimidazol); **MS**: (m/z) [M+H]⁺ izračunato za C₂₄H₃₂N₄O 393,2610, izmereno 393,2632.

2-{7-[4-(2-Metoksifenil)piperazin-1-il]heptil}-1H-benzo[d]imidazol (121): Prinos: 72%. Ulje. **IR** (ATR, cm⁻¹): 2962,9, 1497,9, 1449,6, 1261,7, 1026,4, 744,5; **¹H-NMR** (200 MHz, δ/ppm): 1,26-1,49 (8H, m, CH₂), 1,79-1,86 (2H, m, CH₂), 2,35-2,42 (2H, m, CH₂), 2,68 (4H, s, piperazin), 2,89 (2H, t, J=8 Hz, CH₂), 3,13 (4H, s, piperazin), 3,85 (3H, s, OCH₃), 6,84-7,26 (8H, m, ArH); **¹³C-NMR** (50 MHz, δ/ppm): 26,5 (1C, CH₂), 27,2 (1C, CH₂), 28,1 (1C, CH₂), 29,05 (1C, CH₂), 29,3 (2C, CH₂), 50,4 (2C, piperazin), 53,4 (2C, piperazin), 55,3 (1C, OCH₃), 58,7 (1C, CH₂-N), 111,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 114,6 (2C, benzimidazol), 118,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 121,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 123,0 (2C, benzimidazol), 138,5 (2C, benzimidazol), 141,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 155,3 (1C, benzimidazol); **MS**: (m/z) [M+H]⁺ izračunato za C₂₅H₃₄N₄O 407,2766, izmereno 407,2805.

5-Metoksi-2-{4-[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il]butil}-1H-benzo[d]imidazol (122): Prinos: 88%. Ulje. **IR** (ATR, cm⁻¹): 2817,0, 1498,4, 1458,2, 1237,6, 1027, 751,2; **¹H-NMR** (200 MHz, δ/ppm): 1,60-1,76 (2H, m, CH₂), 1,84-1,98 (2H, m, CH₂), 2,49 (2H, t, J=7,4 Hz, CH₂), 2,69 (4H, s, piperazin), 2,96 (2H, t, J=7,2 Hz, CH₂), 3,16 (4H, s, piperazin), 3,82 (3H, s, 2-metoksifenil grupa), 3,87 (3H, s, 5-metoksibenzimidazol), 6,81-7,07 (7H, m, ArH), **¹³C-NMR** (50 MHz, δ/ppm): 25,1 (1C, CH₂), 25,9 (1C, CH₂), 28,4 (1C, CH₂), 50,5 (2C, piperazin), 53,3 (2C, piperazin), 55,3 (1C, 2-metoksifenil grupa), 55,8 (1C, 5-metoksibenzimidazol), 57,1 (1C, CH₂-N), 111,2 (3C, 2-metoksifenil grupa i benzimidazol), 118,2 (2C, 2-metoksifenil grupa i benzimidazol), 121,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 123,17 (2C, 2-metoksifenil grupa i benzimidazol), 141,0 (2C, 2-metoksifenil grupa i benzimidazol), 152,3 (1C, 2-metoksifenil grupa), 154,0 (1C, benzimidazol), 156,7 (1C, benzimidazol); **MS**: (m/z) [M+H]⁺ izračunato za C₂₃H₃₀N₄O₂ 395,2402, izmereno 395,2433.

5-Metoksi-2-{5-[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il]pentil}-1H-benzo[d]imidazol (123): Prinos: 73%. Ulje. **IR** (ATR, cm⁻¹): 2832,2, 1500,2, 1455,8, 1242,6, 1027,7, 752,9; **¹H-NMR** (200 MHz, δ/ppm): 1,51-1,71 (4H, m, CH₂), 1,80-1,94 (2H, m, CH₂), 2,44 (2H, t, J=7,2 Hz, CH₂), 2,67 (4H, s, piperazin), 2,90 (2H, t, J=7,2 Hz, CH₂), 3,13 (4H, s, piperazin), 3,82 (3H, s, 2-metoksifenil grupa), 3,86 (3H, s, 5-metoksibenzimidazol), 6,81-7,02 (4H, m, ArH), 7,40-7,44 (1H, m, ArH), 7,51 7,55 (1H, m, ArH), 7,67-7,73 (1H, m, ArH); **¹³C-NMR** (50 MHz, δ/ppm): 25,5 (1C, CH₂), 26,5 (1C, CH₂), 27,7 (1C,

CH₂), 28,8 (1C, CH₂), 49,9 (2C, piperazin), 53,1 (2C, piperazin), 55,3 (1C, 2-metoksifenil grupa), 55,8 (1C, 5-metoksibenzimidazol), 58,1 (1C, CH₂-N), 97,6 (1C, benzimidazol), 111,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 111,6 (1C, benzimidazol), 115,3 (1C, benzimidazol), 118,5 (1C, 2-metoksifenil grupa), 121,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 124,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 132,6 (1C, benzimidazol), 138,2 (1C, benzimidazol), 139,7 (1C, 2-metoksifenil grupa), 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 154,7 (1C, benzimidazol), 156,0 (1C, benzimidazol); **MS**: (m/z) [M+H]⁺ izračunato za C₂₄H₃₂N₄O₂ 409,2559, izmereno 409,2600.

5-Metoksi-2-{6-[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il]heksil}-1H-benzo[d]imidazol (**124**):
Prinos: 67%. Ulje. **IR** (ATR, cm⁻¹): 2856,0, 1501,3, 1457,2, 1247,5, 1026,2, 753,3; **¹H-NMR** (200 MHz, δ/ppm): 1,25-1,49 (4H, m, CH₂), 1,62-1,80 (4H, m, CH₂), 2,40 (2H, t, J=8 Hz, CH₂), 2,69 (4H, s, piperazin), 2,84 (2H, t, J=7,4 Hz, CH₂), 3,12 (4H, s, piperazin), 3,79 (3H, s, 2-metoksifenil grupa), 3,84 (3H, s, 5-metoksibenzimidazol), 6,81-7,00 (4H, m, ArH), 7,38-7,42 (1H, m, ArH), 7,50-7,55 (1H, m, ArH), 7,68-7,73 (1H, m, ArH); **¹³C-NMR** (50 MHz, δ/ppm): 25,8 (1C, CH₂), 26,8 (1C, CH₂), 27,8 (1C, CH₂), 28,9 (1C, CH₂), 29,0 (1C, CH₂), 50,1 (2C, piperazin), 53,1 (2C, piperazin), 55,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 55,2 (1C, 5-metoksibenzimidazol), 58,2 (1C, CH₂-N), 97,6 (1C, benzimidazol), 111,1 (2C, 2-metoksifenil grupa i benzimidazol), 115,2 (1C, benzimidazol), 118,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 121,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 123,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 130,9 (1C, benzimidazol), 138,8 (1C, benzimidazol), 140,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 152,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 154,9 (1C, benzimidazol), 155,9 (1C, benzimidazol); **MS**: (m/z) [M+H]⁺ izračunato za C₂₅H₃₄N₄O₂ 423,2715, izmereno 423,2757.

5-Metoksi-2-(7-(4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il)heptil)-1H-benzo[d]imidazol (**125**):
Prinos: 62%. Ulje. **IR** (ATR, cm⁻¹): 2927,7, 1501,3, 1499, 1453,5, 1240,3, 1026,6, 748,2; **¹H-NMR** (200 MHz, δ/ppm): 1,25-1,58 (10H, m, CH₂), 2,16-2,85 (4H, m, CH₂), 2,85 (4H, s, piperazin), 3,15 (4H, s, piperazin), 3,81 (3H, s, 2-metoksifenil grupa), 3,85 (3H, s, 5-metoksibenzimidazol), 6,84-7,26 (7H, m, ArH); **¹³C-NMR** (50 MHz, δ/ppm): 25,1 (1C, CH₂), 26,9 (1C, CH₂), 27,4 (1C, CH₂), 28,0 (1C, CH₂), 28,9 (1C, CH₂), 29,3 (1C, CH₂), 49,5 (2C, piperazin), 52,3 (2C, piperazin), 55,3 (2C, OCH₃ i 2-metoksifenil grupa), 57,7 (1C, CH₂-N), 97,6 (1C, benzimidazol), 110,6 (1C, 2-metoksifenil grupa), 114,9 (2C, benzimidazol), 117,8 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,8 (1C, 2-metoksifenil

grupa), 123,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 140,5 (3C, 2-metoksifenil grupa i benzimidazol), 152,4 (1C, 2-metoksifenil grupa), 154,9 (1C, benzimidazol), 155,9 (1C, benzimidazol); **MS**: (m/z) $[M+H]^+$ izračunato za $C_{26}H_{36}N_4O_2$ 437,2872, izmereno 437,2911.

5-Hloro-2-{4-[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il]butil}-1H-benzo[d]imidazol (**126**):
Prinos: 88%. Ulje. **IR** (ATR, cm^{-1}): 2811,0, 1501,1, 1447,5, 1239,6, 1027,4, 751,2; **1H -NMR** (200 MHz, δ/ppm): 1,59-1,69 (2H, m, CH_2), 1,82-1,96 (2H, m, CH_2), 2,43 (2H, t, $J=7,2$ Hz, CH_2), 2,64 (4H, s, piperazin), 2,95 (2H, t, $J=6,6$ Hz, CH_2), 3,12 (4H, s, piperazin), 3,84 (s, 3H, OCH_3), 6,84-7,02 (4H, m, ArH), 7,04-7,06 (1H, m, ArH), 7,12-7,17 (1H, m, ArH), 7,26-7,49 (1H, m, ArH); **^{13}C -NMR** (50 MHz, δ/ppm): 25,2 (1C, CH_2), 25,8 (1C, CH_2), 28,4 (1C, CH_2), 50,4 (2C, piperazin), 53,2 (2C, piperazin), 55,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 57,1 (1C, CH_2-N), 111,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 114,4 (1C, benzimidazol), 115,1 (1C, benzimidazol), 118,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,4 (1C, 2-metoksifenil grupa), 123,2 (1C, benzimidazol), 127,4 (1C, benzimidazol), 137,3 (1C, benzimidazol), 139,6 (1C, benzimidazol) 140,8 (1C, 2-metoksifenil grupa), 152,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 156,7 (1C, benzimidazol); **MS**: (m/z) $[M+H]^+$ izračunato za $C_{22}H_{27}ClN_4O$ 399,1946, izmereno 399,1937.

5-Hloro-2-{5-[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il]pentil}-1H-benzo[d]imidazol (**127**):
Prinos: 65%. Ulje. **IR** (ATR, cm^{-1}): 2824,8, 1500,7, 1450,7, 1241,2, 1027,0, 749,9; **1H -NMR** (200 MHz, δ/ppm): 1,30-1,44 (2H, m, CH_2), 1,47-1,61 (2H, m, CH_2), 1,76-1,91 (2H, m, CH_2), 2,38 (2H, t, $J=8$ Hz, CH_2), 2,64 (4H, s, piperazin), 2,89 (2H, t, $J=8$ Hz, CH_2), 3,12 (4H, s, piperazin), 3,85 (3H, s, OCH_3), 6,84-7,06 (4H, m, ArH) 7,13-7,18 (1H, m, ArH), 7,40 7,50 (2H, m, ArH); **^{13}C -NMR** (50 MHz, δ/ppm): 26,0 (1C, CH_2), 26,6 (1C, CH_2), 27,7 (1C, CH_2), 29,0 (1C, CH_2), 50,3 (2C, piperazin), 53,3 (1C, 2-metoksifenil grupa), 55,3 (2C, piperazin), 58,2 (1C, CH_2-N), 111,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 114,6 (2C, benzimidazol), 118,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 121,0 (1C, 2-metoksifenil grupa), 122,5 (1C, 2-metoksifenil grupa), 123,2 (1C, benzimidazol), 127,6 (1C, benzimidazol), 141,0 (3C, 2-metoksifenil grupa i benzimidazol), 152,2 (1C, 2-metoksifenil grupa), 156,3 (1C, benzimidazol); **MS**: (m/z) $[M+H]^+$ izračunato za $C_{23}H_{29}ClN_4O$ 413,2103, izmereno 413,2089.

5-Hloro-2-{6-[4-(2-metoksifenil)piperazin-1-il]heksil}-1H-benzo[d]imidazol (128):
Prinos: 74%. Ulje. **IR** (ATR, cm⁻¹): 2825,8, 1500,6, 1451,2, 1241,8, 1027,6, 750,4;
¹H-NMR (200 MHz, δ/ppm): 1,29-1,45 (6H, m, CH₂), 1,72-1,83 (2H, m, CH₂), 2,37
(2H, t, J=8,6 Hz, CH₂), 2,62 (4H, s, piperazin), 2,86 (2H, t, J=7,4 Hz, CH₂), 3,09 (4H,
s, piperazin), 3,83 (3H, s, OCH₃), 6,83-6,97 (4H, m, ArH), 7,12-7,18 (1H, m, ArH),
7,38-7,47 (2H, m, ArH); **¹³C-NMR** (50 MHz, δ/ppm): 26,3 (1C, CH₂), 26,9 (1C, CH₂),
27,9 (1C, CH₂), 28,9 (1C, CH₂), 29,1 (1C, CH₂), 50,5 (2C, piperazin), 53,3 (2C,
piperazin), 55,2 (1C, OCH₃), 58,4 (1C, CH₂-N), 111,1 (1C, 2-metoksifenil grupa), 114,5
(2C, benzimidazol), 118,16 (1C, 2-metoksifenil grupa), 120,9 (1C, 2-metoksifenil
grupa), 122,5 (1C, 2-metoksifenil grupa), 123,1 (1C, benzimidazol), 127,5 (1C,
benzimidazol), 141,0 (3C, 2-metoksifenil grupa i benzimidazol), 152,14 (1C,
2-metoksifenil grupa), 156,51 (1C, benzimidazol); **MS**: (m/z) [M+H]⁺ izračunato za
C₂₄H₃₁ClN₄O 427,2259, izmereno 427,2241.

4.2. Izolovanje sinaptosomalnih membrana iz mozga pacova

Pacovi su žrtvovani dekapitacijom pomoću aparature za giljotiranje. Lobanje su odmah otvarane, mozgovci kompletno izvađeni i potapani u hladni fiziološki rastvor, da bi potom na ledu disekcijom bilo izdvojeno tkivo striatuma (izvor dopaminskih D2 receptora) i frontalnih delova cerebralnog korteksa (izvor serotoninskih 5HT_{2a} i α₁ adrenergičkih receptora). Ova tkiva su sakupljena iz mozgova 30 životinja, izmerena im je ukupna masa m_t , da bi u odnosu na nju bila resuspendovana u desetostruko većoj zapremini V_t ($V_t:m_t=10:1$) ledenog pufera za homogenizaciju (striatum: 50 mM Tris, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, pH 7,5; korteks: 50 mM Tris, pH 7,7). Tkiva su homogenizovana u staklenom homogenizeru sa teflonskim tučkom (6 zaveslaja, 800 r.p.m.), a homogenati su dva puta taloženi centrifugiranjem (15 min., 4 °C, 20000 r.p.m.). Finalni talozi su resuspendovani u puferu za homogenizaciju u 20 puta većoj zapremini u odnosu na početnu masu i sa završnim koncentracijama proteina oko 0,6-0,7 mg/ml¹³⁴. Kao takvi su zamrznuti u tečnom azotu, i čuvani na -70 °C do upotrebe u testovima kompeticije u kojima su korišteni kao izvor dopaminskih D2, serotoninskih 5HT_{2a} i α₁ adrenergičkih receptora.

4.3. Testovi kompetitivnog vezivanja radioliganda na membranama izolovanim iz mozga pacova

Za specifično obeležavanje radioligandima korišteni su: 0,2 nM [³H]-spiperon za D2 receptore, 1 nM [³H]-ketanserin za serotoninске 5HT2a receptore, a 1 nM [³H]-prazosin za α 1 adrenergičke receptore. Finalne koncentracije radioliganda su odgovarale literaturnim vrednostima K_d, jer je pri tim uslovima reakcija najosetljivija. Pošto [³H]-spiperon pokazuje afinitet vezivanja za D2 i 5HT2a receptore, da bi se sprečilo njegovo vezivanje za 5HT2a receptore, obeleženom spiperonu je dodat neobeleženi ketanserin u finalnoj koncentraciji od 50 nM. Finalne koncentracije ispitivanog liganda bile su u rasponu od 10⁻⁴-10⁻¹⁰ M. Nespecifično vezivanje je odrađeno u prisustvu 10 μ M spiperona za D2 receptore, 1 μ M ketanserina za 5HT2a i 1 μ M prazosina za α 1 adrenergičke receptore. Reakcija kompeticije je izvođena u ukupnoj zapremini od 400 μ l za D2 i 200 μ l za 5HT2a i α 1 adrenergičke receptore. Uzorci su inkubirani 10 min. na 37 °C, reakcija je prekidana hladnim puferom (1 ml) i uzorci su filtrirani na vakuumu kroz Whatman GF/C filtre. Filtri su ispirani dva puta sa po 5 ml odgovarajućeg pufera (50 mM TRIS, pH 7,7 za 5HT2a i α 1 adrenergičke receptore; 50 mM Tris, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, pH 7,5 za D2 receptore) da bi se uklonio nevezani obeležen ligand. Nakon sušenja u trajanju od 2h na temperaturi od 80 °C, filtri su unošeni u scintilacioni koktel na bazi toluola i merena je radioaktivnost na scintilacionom brojaču. Svi eksperimenti su rađeni u triplikatu i ponovljeni najmanje dva puta. Dobijeni rezultati su obrađeni u programu Graph Pad Prism¹³⁵.

4.4. Doking analiza

4.4.1. Priprema modela receptora

Model dopaminskog D2 receptora (D2DR) je dobijen homologim modelovanjem⁹³ prema kristalnoj strukturi dopaminskog D3 receptora. Vezivno mesto D2DR je određeno upotrebom Grid modula Schrodinger Maestro paketa programa¹³³ navodeći Asp 114 (3.32) kao centar vezivnog mesta, posle čega je kompjuter odredio dostupne bočne ostatke receptora, koji se nalaze u šupljini oko Asp 114.

4.4.2. Priprema modela liganada

Strukture svih liganada, nacrtane su u programu ChemDraw, posle čega su kao *.mol format fajla, eksportovani u Schrodinger Maestro paket programa. Upotrebom modula LigPrep i Epik, ligandi su pripremljeni, tako što im je optimizovana početna 3D struktura, pretragom energetski najpovoljnije konformacije i dodato naelektrisanje pod fiziološkim uslovima (pH=7+/-2). Ovako pripremljeni ligandi, korišteni su u doking analizi.

4.4.3. Doking analiza

Doking analiza, rađena je u Glide modulu Schrodinger Maestro paketa programa. Polazni parametri su bili sledeći: D2DR grid, dobijen upotrebom Grid modula, zajedno sa ligandima koji su dobijeni upotrebom LigPrep modula. Početna pozicija liganda unutar mesta vezivanja je bila proizvoljna. Xtra Precision (XP) Glide doking je urađen sa ograničenjem da dobijene strukture moraju imati soni most između liganda i Asp 114 (3.32). Druga ograničenja nisu postavljena. Dobijene strukture su

ručno pregledane i one sa najvećim brojem receptor-ligand interakcija, odabrane su za dalju analizu.

4.4.4. Prikaz rezultata

Rezultati su prikazani kao 3D model i kao 2D dijagram interakcija, upotrebom Lig.Int. modula Schrodinger Maestro paketa programa.

5. ZAKLJUČAK

1. U okviru ove doktorske disertacije uspešno je sintetisano i okarakterisano 46 novih liganada. Ligandi su razvrstani u dve serije: ligandi sa piperidinskim prstenom u mostu između glave (benzil, benzoil, fenetil, fenacetil grupe sa odgovarajućim supstituentima) i repa (2-metoksifenilpiperazin) i ligandi sa različitom dužinom alkil mosta između glave (supstituisani benzimidazoli) i repa (2-metoksifenilpiperazin). Za sve novosintetisane ligande određen je farmakološki profil vezivanja za dopaminske D2, serotoninске 5HT2a i adrenergičke $\alpha 1$ receptore u testovima kompetitivnog vezivanja sa radioaktivno obeleženim ligandima.
2. U seriji liganada sa piperidinskim mostom između glave i repa sintetisane su četiri podserije sa različitim supstituentima na piperidinskim azotom. U okviru svake podserije, sintetisani su i testirani ligandi kod kojih je piperazin bio direktno ili preko metilenskog mosta vezan u položaju 4 za piperidinski prsten. Sintetisane podserije se razlikuju po supstituentima na piperidinskom prstenu: 1. benzil i nitrobenzil derivati; 2. benzoil i nitrobenzoil derivati; 3. fenilacetil i nitrofenilacetil derivati i 4. fenetil i nitrofenetil derivati.
3. U seriji sintetisanih liganada sa benzil i nitrobenzil supstuentima na piperidinskom prstenu, svi ligandi pokazuju afinitet prema D2 i adrenergičkim $\alpha 1$ receptorima i odsustvo afiniteta prema 5HT2a receptorima. Uvođenje metilenskog mosta između piperazinskog i piperidinskog prstena utiče na porast aktivnosti ka dopaminskim D2 receptorima. Ligand sa nitro grupom u položaju 2 na benzil ostatku vezanom za piperidinski prsten i metilenskim mostom između piperazinskog i piperidinskog prstena pokazao je najveći afinitet prema D2 receptorima. Preliminarna doking analiza predviđa postojanje aromatičnih interakcija između aminokiselinskih ostataka u hidrofobnom džepu: Phe 386 (6.44), Trp 390 (6.48), Tyr 420 (7.43), uspostavljanje vodoničnih veza između nitro grupe u glavi liganda i Ser 193 (5.42), kao i formiranje hidrofobnih interakcija između glave liganda **54** i Phe 393 i His 397 u alternativnom mestu vezivanja (ecl2).
4. Zamenom benzil ostatka benzoil ostatkom, dobijeni su ligandi sa manjim afinitetom prema dopaminskim D2 receptorima, u poređenju sa benzil derivatima.

U ovom slučaju supstituenti nemaju efekta na afinitet prema D2 receptorima. Ligand sa benzoil grupom vezanom za piperidinski prsten i metilenskim mostom između piperazinskog i piperidinskog prstena (**65**) pokazao je najveći afinitet prema D2 receptorima. Preliminarna doking analiza predviđa formiranje sonog mosta sa Asp 114 (3.32), dok rep liganda ostvaruje aromatične interakcije sa amino kiselinskim ostacima u hidrofobnom džepu [Phe 386 (6.44), Trp 390 (6.48), Tyr 420 (7.43)]. Kiseonik iz benzoil grupe u glavi liganda nagrađuje vodoničnu vezu sa Ser 193 (5.42). Glava liganada zbog smanjene fleksibilnosti ostvaruje aromatične interakcije samo sa Phe 394 u alternativnom mestu vezivanja dopaminskog D2 receptora (ec12). Svi ligandi su neaktivni prema 5HT2a. Prema adrenergičkim α 1 receptorima pokazuju umerenu aktivnost, sa izuzetkom 2-nitro derivata, koji ne pokazuju afinitet prema ovim receptorima.

5. U seriji fenilacetil derivata, samo su ligandi sa nitro grupom u položaju 3 pokazali umereni afinitet prema dopaminskim receptorima, pri čemu ponovo ligand sa metilenskim mostom između piperazinskog i piperidinskog prstena pokazuje veći afinitet. Nesupstituisani ligandi pokazuju visok afinitet prema adrenergičkim α 1 receptorima, dok uvođenje nitro grupe smanjuje afinitet. Svi ligandi pokazuju odsustvo afiniteta prema 5HT2a receptorima.
6. U seriji fenetil supstituisanih derivata, dobiveni su ligandi sa umerenim afinitetom prema D2 receptorima, sa izuzetkom 3-nitro derivata koji pokazuje visok afinitet prema D2 receptorima. Ova serija je jedina pokazala umereni afinitet prema 5HT2a receptorima i odsustvo afiniteta prema adrenergičkim α 1 receptorima. Uvođenjem dodatne metilenske grupe u linker u seriji jedinjenja **73-88**, molekul postaje duži i dobija mogućnost da slobodno rotira oko dva atoma ugljenika. Ovo dovodi do toga da ligandi **78** i **79** poseduju znatno veći afinitet vezivanja za D2 receptore u odnosu na **74** i **75**. Preliminarna doking analiza razlike u aktivnosti objašnjava formiranjem vodoničnih veza između kiseonika u karbonilnoj grupi u glavi molekula **78** i **79** i Ser 194 (5.43).
7. U seriji liganada sa različitom dužinom alkil mosta između benzimidazolskog dela i 2-metoksifenilpiperazina utvrđeno je da najveći afinitet prema dopaminskim D2 receptorima pokazuju ligandi sa pet i šest ugljenikovih atoma u mostu. Supstituisani benzimidazoli (5-hloro i 5-metoksi) su pokazali afinitet prema D2

receptoru i sa 4 ugljenikova atoma u mostu, za razliku od nesupstituisanih liganada. Produženje mosta na 7 C atoma dovodi do gubitka afiniteta prema D2 receptorima. Preliminarna doking analiza liganda sa šest ugljenikovih atoma u mostu ukazuje na prisustvo aromatičnih interakcija sa amino kiselinskim ostacima u hidrofobnom džepu [Phe 386 (6.44), Trp 390 (6.48), Tyr 420 (7.43)], vodoničnih veza sa Ser 167 (4.57) i Ser 194 (5.43) i hidrofobnih interakcijasa Ile 166, Leu 170, Ile 184, Phe 189, Val 111, Ile 397, His 397 smeštenim u drugoj ekstracelularnoj petlji (ecl2) tj. alternativnom mestu vezivanja.

8. Ligandi u ovoj seriji pokazuju umereni afinitet prema 5HT_{2a} receptorima kao i dobar afinitet prema adrenergičkim α ₁ receptorima
9. Važan korak u proveru svakog homolog modela je sinteza novih liganada, na osnovu postojećih saznanja o receptor-ligand interakcijama, a u cilju postizanja novih, željenih osobina (veći afinitet, bolja selektivnost ili agnostička/antagonistička priroda liganda). Polazeći od postojećih pretpostavki o vezivanju liganda za D2 receptor, predložena je sinteza navedenih supstanci, a sintetisani ligandi su variranjem fleksibilnosti, veličine kao i tipom i položajem funkcionalnih grupa, pružili dragocene podatke o optimalnim vrednostima ovih parametara, neophodnim za formiranje jačeg kompleksa receptor-ligand. Dobijeni rezultati su pokazali da se fleksibilni ligandi za D2 receptor vezuju jače od rigidnih. Pored fleksibilnosti, oblik i veličina liganda takođe utiču na afinitet liganda-svako odstupanje od optimalne veličine, bilo produžavanjem ili skraćivanjem liganda, dovodi do gubitka afiniteta. Funkcionalne grupe, utiču na afinitet, preko broja i jačine dodatnih interakcija koje mogu da uspostave sa receptorom. Dodatne vodonične veze, koje se na ovaj način ostvaruju, mogu povećati afinitet prema receptoru. Sve navedene informacije, poslužiće kao osnova za sintezu novih liganada, sa poboljšanim afinitetom i/ili selektivnosti prema određenom receptoru.

6. LITERATURA

-
- ¹ Gomtsyan A., Heretocycles in drugs and drug discovery, *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, **2012**, *48*, 7-10.
- ² Dua R., Shrivastava S., Sonwane S.K., Srivastava S.K., Pharmacological Significance of Synthetic Heterocycles Scaffold: A Review, *Advances in Biological Research*, **2011**, *5*, 120-144.
- ³ Welsch M.E., Snyder S.A., Stockwell B.R., Privileged scaffolds for library: Design and drug discovery, *Current Opinion in Chemical Biology*, **2010**, *14*, 347–361.
- ⁴ Zagorska A., Kołaczkowski M., Bucki A., Siwek A., Kazek G., Kazek G., Grzegorz Satała G., Bojarski A.J., Anna Partyka A., Wesołowska A., Pawłowski M., Structure-activity relationships and molecular studies of novel arylpiperazinylalkyl purine-2,4-diones and purine-2,4,8-triones with antidepressant and anxiolytic-like activity, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2015**, *97*, 142-154.
- ⁵ Kumar S., Wahi A.K., Singh R., Synthesis, computational studies, and preliminary pharmacological evaluation of new arylpiperazines as potential antipsychotics, *Med Chem Res*, **2012**, *21*, 1218–1225.
- ⁶ Chen H., Xu F., Liang X., Xu B.B., Yang Z.L., He X.L., Huang B.Y., Yuan M., Design, synthesis and biological evaluation of novel arylpiperazine derivatives on human prostate cancer cell lines, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2015**, *25*, 285-287.
- ⁷ Young B.L., Young D.G., Kim D.J., Ahn C.H., Kong J.X., Kang N.S., Synthesis, anticancer activity and pharmacokinetic analysis of 1-[(substituted 2-alkoxyquinoxalin-3-yl)aminocarbonyl]-4-(hetero)arylpiperazine derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2012**, *20*, 1303-1309.
- ⁸ Mendoza A., Pérez-Silanes S., Quiliano M., Pabón A., Galiano S., González G., Garavito G., Zimic M., Vaisberg A., Aldana I., Monge A., Deharo E., Aryl piperazine and pyrrolidine as antimalarial agents. Synthesis and investigation of structure–activity relationships, *Experimental Parasitology*, **2011**, *128*, 97–103.

-
- ⁹ Walsh A.D., Chen Y.H., Green J.B., Nolan J.C., Yannit J.M., The synthesis and antiallergy activity of 1-(aryloxy)-4-(4-arylpiperazinyl)-2-butanol derivatives, *Journal of Medicinal Chemistry*, **1990**, *33*, 1823-1827.
- ¹⁰ Patel R.V., Park S.W., An Evolving Role of Piperazine Moieties in Drug Design and Discovery, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **2013**, *13*, 1579-1601.
- ¹¹ Padmavathi, V., Radhalakshmi, T., Mahesh, K., Mohan, A.V.N., Synthesis of novel bis-heterocycles: Bis pyrroles, pyrrolyl pyrazolines and pyrrolyl isoxazolines, *Indian J. Chem.* **2008**, *47B*, 1707-1712.
- ¹² Andrić D., Roglić G., Šukalović V., Šoškić V., Kostić-Rajačić S., Synthesis, binding properties and receptor docking of 4-halo-6-[2-(4-arylpiperazin-1-yl)ethyl]-1H-benzimidazoles, mixed ligands of D₂ and 5-HT_{1A} receptors, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2008**, *43*, 1696-1705.
- ¹³ Penjišević J., Šukalović V., Andrić D., Kostić-Rajačić S., Šoškić V., Roglić G., 1-Cinnamyl-4-(2-methoxyphenyl)piperazines: Synthesis, Binding Properties and Docking to Dopamine (D₂) and Serotonin (5-HT_{1A}) Receptors, *Archiv Der Pharmazie*, **2007**, *340*, 456-465.
- ¹⁴ Šukalović V., Bogdan A.E., Tovilović G., Ignjatović Đ., Andrić D., Kostić-Rajačić S., Šoškić V., Kostić-Rajačić S., *N*-{[2-(4-Phenyl-piperazin-1-yl)-ethyl]-phenyl}-arylamides with Dopamine D₂ and 5-Hydroxytryptamine 5HT_{1A} Activity: Synthesis, Testing and Molecular Modeling, *Archiv Der Pharmazie*, **2013**, *346*, 708-717.
- ¹⁵ Howes O.D., Murray R.M., Schizophrenia: an integrated sociodevelopmental-cognitive model, *Lancet* **2014**, *383*, 1677-1687.
- ¹⁶ Calabresi P., Castrioto A., Di Filippo M., Picconi B., New experimental and clinical links between the hippocampus and the dopaminergic system in Parkinson's disease, *The Lancet Neurology*, **2013**, *12*, 811-821.
- ¹⁷ Denysa D., Vriesc de F., Cathe D., Figea M., Vulinka N., Dick J. Veltmana J.D., Thalia F., Van der Doefd F.T., Boellaard R., Westenberg H., Van Balkomc A., Lammertsmad A.A., Van Berckeld B.N.M., Dopaminergic activity in Tourette syndrome and obsessive-compulsive disorder, *European Neuropsychopharmacology*, **2013**, *23*, 1423-1431.

-
- ¹⁸ Miyamoto S., Duncan G.E., Marx C.E., Lieberman J.A., Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs, *Molecular Psychiatry*, **2005**, *10*, 79-104.
- ¹⁹ Park S.M., Chen M., Schmerberg C.M., Dulman R.S., Rodriguiz R.M., Caron M.G., Jian Jin J., Wetsel W.C., Effects of β -Arrestin-Biased Dopamine D2 Receptor Ligands on Schizophrenia-like Behavior in Hypoglutamatergic Mice, *Neuropsychopharmacology*, **2016**, *41*, 704-715.
- ²⁰ Sadock, B J., Sadock V.A, Ruiz P. *Kaplan and Sadock's Comprehensive Textbook of Psychiatry. 9th ed.*, Lippincott Williams & Wilkins, **2009**, Philadelphia <http://psychopharmacologyinstitute.com/antipsychotics/first-generation-antipsychotics/> 23.08.2016.
- ²¹ <http://learn.genetics.utah.edu> 13.09.2016.
- ²² Horacek J., Bubenikova-Valesova V., Kopecek M., Palenicek T., Dockery C., Pavel Mohr P., Hoschl C., Mechanism of Action of Atypical Antipsychotic Drugs and the Neurobiology of Schizophrenia, *CNS Drugs* **2006**, *20*, 389-409.
- ²³ Kapur S., Remington G., Atypical Antipsychotic: New Directions and New Challenges in the Treatment of Schizophrenia, *Annual Review of Medicine*, **2001**, *52*, 503–517.
- ²⁴ Kinon B.J., Lieberman J.A., Mechanisms of action of atypical antipsychotic drugs: a critical analysis, *Psychopharmacology*, **1996**, *124*, 2-34.
- ²⁵ Jordan S., Koprivica V., Ruoyan Chen R., Tottori K., Kikuchi T., Altar A.C., The antipsychotic aripiprazole is a potent, partial agonist at the human 5-HT1A receptor, *European Journal of Pharmacology*, **2002**, *441*, 137 – 140.
- ²⁶ Neves G., Antonioa C.B., Betti A.H., Prankea M.A., Fragac C.A.M., Barreiroc E.J., Noël F., Rates S.M.K., New insights into pharmacological profile of LASSBio-579, a multi-target N-phenylpiperazine derivative active on animal models of schizophrenia, *Behavioural Brain Research*, **2013**, *237*, 86–95.
- ²⁷ Üçok A., Gabel W., Side effects of atypical antipsychotics: a brief overview, *World Psychiatry*, **2008**, *7*, 58-62.

-
- ²⁸ Jafari S., Fernandez-Enright F., Huang X.F., Structural contributions of antipsychotic drugs to their therapeutic profiles and metabolic side effects, *Journal of Neurochemistry*, **2012**, *120*, 371-384.
- ²⁹ Favor D.A., Powers J.J., White A.D., Fitzgerald L.W., Groppi V., Serpa K.A., 6-Alkoxyisoindolin-1-one based dopamine D2 partial agonists as potential antipsychotics, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2010**, *20*, 5666–5669.
- ³⁰ Hołuj M., Popik P., Nikiforuk A., Improvement of ketamine-induced social withdrawal in rats: The role of 5-HT7 receptors. *Behavioural Pharmacology*, **2015**, *8*, 766–775.
- ³¹ Nikiforuk A., Kos T., Fijał K., Hołuj M., Rafa D., Popik P., Effects of the selective 5-HT7 receptor antagonist SB-269970 and amisulpride on ketamine-induced schizophrenia-like deficits in rats, *PLoS One*, **2013**, *8*, 66695.
- ³² Ye N., Song Z., Zhang A., Dual Ligands Targeting Dopamine D2 and Serotonin 5-HT1A Receptors as New Antipsychotical or Anti-Parkinsonian Agents, *Current Medicinal Chemistry*, **2014**, *21*, 437-457.
- ³³ <http://www.drugdevelopment-technology.com/projects/bifeprunox/> 27.06.2016.
- ³⁴ Zajdel P., Marciniec K., Maslankiewicz A., Grychowska K., Satała G., Duszyńska B., Lenda T., Siwek A., Nowak G., Partyka A., Wróbel D., Jastrzębska-Więsek M., Bojarski A.J., Wesołowska A., Pawłowski M., Antidepressant and antipsychotic activity of new quinoline- and isoquinolinesulfonamide analogs of aripiprazole targeting serotonin 5-HT1A/5-HT2A/5-HT7 and dopamine D2/D3 receptors, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2013**, *60*, 42-50.
- ³⁵ <http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm454647.htm>.
- ³⁶ Thase M.E., Youakim J.M., Skuban A., Hobart M., Augustine C., Zhang P., McQuade R.D., William H., Carson W.H., Nyilas M., Raymond Sanchez R., Eriksson H., Efficacy and Safety of Adjunctive Brexpiprazole 2 mg in Major Depressive Disorder: A Phase 3, Randomized, Placebo-Controlled Study in Patients With Inadequate Response to Antidepressants, *The Journal of Clinical Psychiatry*, **2015**, *76*, 1224-1231.

-
- ³⁷ Greig S.L., Brexpiprazole: First Global Approval, *Drugs*, **2015**, *75*, 1687-1697.
- ³⁸ Citrome L., Brexpiprazole for schizophrenia and as adjunct for major depressive disorder: a systematic review of the efficacy and safety profile for this newly approved antipsychotic – what is the number needed to treat, number needed to harm and likelihood to be helped or harmed?, *International Journal of Clinical Practice*, **2015**, *69*, 978–997.
- ³⁹ Citrome L., Cariprazine: chemistry, pharmacodynamics, pharmacokinetics, and metabolism, clinical efficacy, safety, and tolerability, *Expert Opinion Drug Metabolism & Toxicology*, **2013**, *9*, 193-206.
- ⁴⁰ Agai-Csongor É., Domány G., Nógrádi K., Galambos J., Vágó I., Keserü G.M., Greiner I., Laszlovszky I., Gere A., Schmidt É., Kiss B., Vastag M., Tihanyi K., Sággy K., Laszy J., Gyertyán I., Zájér-Balázs M., Gémesi L., Kapás M., Szombathelyi Z., Discovery of cariprazine (RGH-188): A novel antipsychotic acting on dopamine D3/D2 receptors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2012**, *22*, 3437–3440.
- ⁴¹ <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm463103.htm>
24.06.2016.
- ⁴² Durgam S., Earley W., Lipschitz A., Guo H., Laszlovszky I., Németh G., Eduard Vieta E., Calabrese J.R., Yatham L.N., An 8-Week Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Evaluation of the Safety and Efficacy of Cariprazine in Patients With Bipolar I Depression, *The American Journal of Psychiatry*, **2016**, *173*, 271-281.
- ⁴³ Neves G., Menegatti R., Antonio C.A., Graziottin L.R., Vieira R.O., Stela M. K., Rates S.M.K., Noël F., Eliezer J., Barreiro E.J., Fraga C.A.M., Searching for multi-target antipsychotics: Discovery of orally active heterocyclic N-phenylpiperazine ligands of D2-like and 5-HT1A receptors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2010**, *18*, 1925–1935.
- ⁴⁴ Gonzalez-Gomez J.C., Santana L., Uriarte E., Brea J., Villazon M., Loza M.I., Deuca M., Rivas M.E., Montenegro G.Y., Fontenla J.A., New arylpiperazine derivatives with high affinity for 1A, D2 and 5-HT2A receptors., *Bioorganic Medicinal. Chemical Letters*, **2003**, *113*, 175–178.

-
- ⁴⁵ Kumar S., Wahi A.K., Singh R., Synthesis, computational studies and preliminary pharmacological evaluation of 2-[4-(aryl substituted) piperazin-1-yl]-N-benzylacetamides as potential antipsychotics, *Arabian Journal of Chemistry*, **2012**, doi: [10.1016/j.arabjc.2012.03.016](https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.03.016).
- ⁴⁶ Kumar S., Wahi A.K., Singh R., Synthesis, computational studies and preliminary pharmacological evaluation of 2-[4-(aryl substituted) piperazin-1-yl] N,N-diphenylacetamides as potential antipsychotics, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2011**, *46*, 4753-4759.
- ⁴⁷ Zajdel P., Marciniak K., Maślankiewicz A., Satała G., Duszyńska B., Bojarski A.J., Partyka A., Jastrzębska-Więsek M., Wróbel D., Wesołowska A., Pawłowski M., Quinoline- and isoquinoline-sulfonamide derivatives of LCAP as potent CNS multi-receptor 5-HT_{1A}/5-HT_{2A}/5-HT₇ and D₂/D₃/D₄ agents: the synthesis and pharmacological evaluation, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2012**, *20*, 1545-1556.
- ⁴⁸ Chłon-Rzepa G., Bucki A., Kołaczkowski M., Partyka A., Jastrzębska-Więsek M., Satała G., Bojarski A.J., Kalinowska-Tłuścik J., Kazek G., Mordyl B., Głuch-Lutwin M., Wesołowska A., Arylpiperazinyalkyl derivatives of 8-amino-1,3-dimethylpurine-2,6-dione as novel multitarget 5-HT/D receptor agents with potential antipsychotic activity, *Journal of Enzyme Inhibition Medicinal Chemistry*, **2015**, doi: [10.3109/14756366.2015.1088844](https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1088844)
- ⁴⁹ Möllera D., Ismail Salama I., Klinga R.C., Harald Hübner H., Peter Gmeiner P., 1,4-Disubstituted aromatic piperazines with high 5-HT_{2A}/D₂ selectivity: quantitative structure selectivity investigations, docking, synthesis and biological evaluation, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2015**, *23*, 6195–6209.
- ⁵⁰ Żmudzki P., Satała G., Chłon-Rzepa G., Bojarski A.J., Popik P., Zajdel P., N-(4-Arylpiperazinoalkyl)acetamide derivatives of 1,3- and 3,7-dimethyl-1H-purine-2,6(3H,7H)-diones and their 5-HT₆, 5-HT₇, and D₂ receptors affinity, *Heterocyclic Communications*, **2015**, *21*, 13–18.
- ⁵¹ Artigas F., Serotonin receptors involved in antidepressant effects, *Pharmacology & Therapeutics*, **2013**, *137*, 119–131.

-
- ⁵² Yamada M., Yasuhara H., Clinical Pharmacology of MAO Inhibitors: Safety and Future, *NeuroToxicology*, **2004**, 5, 215–221.
- ⁵³ <http://livertox.nlm.nih.gov/Nefazodone.htm>
- ⁵⁴ Akritopoulou-Zanze I., Arylpiperazine-Based 5-HT1A Receptor Partial Agonists and 5-HT2A Antagonists for the Treatment of Autism, Depression, Anxiety, Psychosis, and Schizophrenia, *Bioactive Heterocyclic Compound Classes: Pharmaceuticals*, **2013**, doi: 10.1002/9783527664450.ch6.
- ⁵⁵ Oliver B., van Wijngaarden I., Soudijn W., Serotonin receptors and their ligands, Elsevier Science B.V., **1997**, Amsterdam, 68.
- ⁵⁶ Celada P., Bortolozzi A., Artigas F., Serotonin 5-HT1A Receptors as Targets for Agents to Treat Psychiatric Disorders: Rationale and Current Status of Research, *CNS Drugs* **2013**, 27, 703–716.
- ⁵⁷ Mahesh R., Kumar B., Jindal A., Bhatt S., Devadoss T., Pandey D.K., Antidepressant-like activity of (4-phenylpiperazin-1-yl) (quinoxalin-2-yl) methanone (4a), a novel 5-HT3 receptor antagonist: An investigation in behaviour-based rodent models of depression, *Indian Journal of Pharmacology*, **2012**, 44, 560-565.
- ⁵⁸ Gautam B.K., Jindal A., Dhar A.K., Mahesh R., Antidepressant-like activity of 2-(4-phenylpiperazin-1-yl)-1, 8-naphthyridine-3-carboxylic acid (7a), a 5-HT3 receptor antagonist in behaviour based rodent models: Evidence for the involvement of serotonergic system, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **2013**, 109, 91–97.
- ⁵⁹ Partyka A., Chłoń-Rzepa G., Wasik A., Jastrzębska-Więsek M., Bucki A., Kołaczkowski M., Satała G., Bojarski A.J., Wesołowska A., Antidepressant- and anxiolytic-like activity of 7-phenylpiperazinylalkyl-1,3-dimethyl-purine-2,6-dione derivatives with diversified 5-HT1A receptor functional profile, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2015**, 23, 212–221.
- ⁶⁰ Pytka K., Partyka A., Jastrzębska-Więsek M., Siwek A., Głuch-Lutwin M., Mordyl B., Kazek G., Rapacz A., Olczyk A., Gałuszka A., Błachuta M., Waszkielewicz A., Marona H., Sapa J., Filipek B., Wesołowska A., Antidepressant- and Anxiolytic-Like Effects of New Dual 5-HT1A and 5-HT7 Antagonists in Animal Models, *PLoS One*, **2015**, 10, doi: 10.1371/journal.pone.0142499.

-
- ⁶¹ Kubacka M., Mogilski S., Bednarski M., Nowiński L., Dudek M., Żmudzka E., Siwek A., Waszkielewicz A.M., Marona H., Satała G., Bojarski A., Filipek B., Pytka K., Antidepressant-like activity of aroxyalkyl derivatives of 2-methoxyphenylpiperazine and evidence for the involvement of serotonin receptor subtypes in their mechanism of action, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **2016**, *141*, 28-41.
- ⁶² Segura-Aguilar J., Kostrzewa R.M., Neurotoxin Mechanisms and Processes Relevant to Parkinson's Disease: An Update, *Neurotoxicity Research*, **2015**, *27*, 328–354.
- ⁶³ Mittur A., Piribedil: Antiparkinsonian Properties and Potential Clinical Utility in Dopaminergic Disorders, *Current Drug Therapy*, **2011**, *6*, 17-34.
- ⁶⁴ Lacivita E., Di Pilato P., De Giorgio P., Colabufo N.A., Berardi F., Perrone R., Leopoldo M., The therapeutic potential of 5-HT_{1A} receptors: a patent review, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2012, *22*, 887-902.
- ⁶⁵ Das B., Vedachalam S., Luo D., Antonio T., Reith M.E.A., Dutta A.K., Development of a Highly Potent D₂/D₃ Agonist and a Partial Agonist from Structure–Activity Relationship Study of N₆-(2-(4-(1H-Indol-5-yl)piperazin-1-yl)ethyl)-N₆-propyl-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[d]thiazole-2,6-diamine Analogues: Implication in the Treatment of Parkinson's Disease, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2015**, *58*, 9179-9195.
- ⁶⁶ Zlatović M., Kostić-Rajačić S., Šukalović V., Homologo modelovanje strukture proteina, *Hemijski pregled*, **2009**, *50*, 30-38.
- ⁶⁷ Pearson W.R., Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA, *Methods in Enzymology*, **1990**, *183*, 63-98.
- ⁶⁸ Altschul S.F., Gish W., Webb Miller W., Myers E.W., Lipman D.J., Basic Local Alignment Search Tool, *Journal of Molecular Biology*, **1990**, *215*, 403-410.
- ⁶⁹ Matthews B.W., Rossmann M.G., Comparison of protein structures, *Methods in Enzymology*, **1985**, *115*, 397-420.
- ⁷⁰ Sheppard H., Burghardt C.R., The Dopamine-Sensitive Adenylate Cyclase of Rat Caudate Nucleus: I. Comparison with the Isoproterenol-Sensitive Adenylate Cyclase (Beta Receptor System) of Rat Erythrocytes in Responses to Dopamine Derivatives, *Molecular Pharmacology*, **1974**, *10*, 721-726.

-
- ⁷¹ Grol C.J., Jansen L.J., Rollema H., Resolution of 5,6-Dihydroxy-2-(N,N-di-n-propylamino)tetralin in Relation to the Structural and Stereochemical Requirements for Centrally Acting Dopamine Agonists, *Journal of Medicinal Chemistry*, **1985**, 28, 679-683.
- ⁷² Seeman P., Brain dopamine receptors, *Pharmacological Reviews*, **1980**, 32, 229-313.
- ⁷³ Neumeyer J.L., Reischig D., Arana G.W., Campbell A., Baldessarini R. J., Kula N.S., Watling K.J., Aporphines. 48. Enantioselectivity of (R)-(-)- and (S)-(+)-N-n-propylnorapomorphine on dopamine receptors. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1983**, 26, 516-521.
- ⁷⁴ Henderson R., Unwin P.N., Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature*, **1975**, 257, 28-32.
- ⁷⁵ Dahl S.G.; Edvardsen O., Sylte I., Molecular dynamics of dopamine at the D2 receptor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **1991**, 88, 8111-8115.
- ⁷⁶ Hausdorff W.P., Hnatowich M., O'Dowd B.F., Caron M.G., Lefkowitz R.J., A mutation of the beta 2-adrenergic receptor impairs agonist activation of adenylyl cyclase without affecting high affinity agonist binding. Distinct molecular determinants of the receptor are involved in physical coupling to and functional activation of Gs, *Journal of the Biological Chemistry*, **1990**, 265, 1381-1393.
- ⁷⁷ Teeter M.M., Froimowitz M., Stec B., DuRand C.J., Homology modeling of the dopamine D2 receptor and its testing by docking of agonists and tricyclic antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1994**, 37, 2874-2888.
- ⁷⁸ Šukalović V., Zlatović M., Andrić D., Roglić G., Kostić-Rajačić S., Šoškić V., Interaction of Arylpiperazines with the Dopamine Receptor D2 Binding Site, *Arzneimittel Forschung*, **2005**, 55, 145-152.
- ⁷⁹ Javitch J.A., Li, X., Kaback J., Karlin A., A cysteine residue in the third membrane-spanning segment of the human D2 dopamine receptor is exposed in the binding-site crevice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **1994**, 91, 10355-10359.

-
- ⁸⁰ Javitch J.A., Fu D., Chen J., Residues in the fifth membrane-spanning segment of the dopamine D2 receptor exposed in the binding-site crevice. *Biochemistry*, **1995**, *34*, 16433-16439.
- ⁸¹ Shi L., Javitch J.A., The Binding Site Of Aminergic G protein–Coupled Receptors: The Transmembrane Segments and Second Extracellular Loop, *Annual Reviews for Pharmacology and Toxicology*, **2002**, *42*, 437-467.
- ⁸² Palczewski K., Kumasaka T., Hori T., Behnke C.A., Motoshima H., Fox B.A., Le Trong I., Teller D.C., Okada T., Stenkamp R.E., Yamamoto M., Miyano M., Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor, *Science*, **2000**, *289*, 739-745.
- ⁸³ Ballesteros J.A., Shi L., Javitch J.A., Structural mimicry in G protein-coupled receptors: implications of the high-resolution structure of rhodopsin for structure-function analysis of rhodopsin-like receptors, *Molecular Pharmacology*, **2001**, *60*, 1-19.
- ⁸⁴ Hanson M.A., Cherezov V., Griffith M.T., Roth C.B., Jaakola V.P., Chien E.Y., Velasquez J., Kuhn P., Stevens R.C., A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 Å structure of the human beta2-adrenergic receptor, *Structure*, **2008**, *16*, 897-905.
- ⁸⁵ Jaakola V.P., Griffith M.T., Hanson M.A., Cherezov V., Chien E.Y., Lane J.R., Ijzerman A.P., Stevens R.C., The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist, *Science*, **2008**, *322*, 1211-1217.
- ⁸⁶ Wang Y.T., Su Z.Y., Hsieh C.H., Chen C.L., Predictions of binding for dopamine D2 receptor antagonists by the SIE method, *Journal of Chemical Information and Modeling*, **2009**, *49*, 2369-2375.
- ⁸⁷ Aranda R., Villalba K., Ravina E., Masaguer C.F., Brea J., Areias F., Dominguez E., Selent J., Lopez L., Sanz F., Pastor M., Loza M.I., Synthesis, binding affinity, and molecular docking analysis of new benzofuranone derivatives as potential antipsychotics, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2008**, *51*, 6085-6094.
- ⁸⁸ Chien E.Y., Liu W., Zhao Q., Katritch V., Han G.W., Hanson M.A., Shi L., Newman A.H., Javitch J.A., Cherezov V., Stevens R.C., Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist, *Science*, **2010**, *330*, 1091-1095.

-
- ⁸⁹ Dash R.C., Bhosale S.H., Shelke S.M., Suryawanshi M.R., Kanhed A.M., Mahadik K.R., Scaffold hopping for identification of novel D(2) antagonist based on 3D pharmacophore modelling of iloperidone analogs, *Molecular Diversity*, **2012**, *16*, 367-375.
- ⁹⁰ Soriano-Ursua M.A., Ocampo-Lopez J.O., Ocampo-Mendoza K., Trujillo-Ferrara J.G., Correa-Basurto J., Theoretical study of 3-D molecular similarity and ligand binding modes of orthologous human and rat D2 dopamine receptors, *Computers in Biology and Medicine*, **2011**, *41*, 537-545.
- ⁹¹ Javitch J.A., Shi L., Simpson M.M., Chen J., Chiappa V., Visiers I., Weinstein H., Ballesteros J.A., The fourth transmembrane segment of the dopamine D2 receptor: accessibility in the binding-site crevice and position in the transmembrane bundle, *Biochemistry*, **2000**, *39*, 12190-12199.
- ⁹² Shi L., Javitch J.A., The second extracellular loop of the dopamine D2 receptor lines the binding-site crevice, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **2004**, *101*, 440-455.
- ⁹³ Sukalovic V., Soskic V., Sencanski M., Andric D., Kostic-Rajacic S, Determination of key receptor-ligand interactions of dopaminergic arylpiperazines and the dopamine D2 receptor homology model, *Journal of Molecular Modeling*, **2013**, *19*, 1751-1762.
- ⁹⁴ Vass M., Ágai-Csongor É., Horti F., Keseru G.M., Multiple Fragment Docking and Linking in Primary and Secondary Pockets of Dopamine Receptors, *Medicinal Chemistry Letters*, **2014**, *5*, 1010–1014.
- ⁹⁵ Möller D., Kling R.C., Skultety M., Leuner K., Hübner H., Gmeiner P., Functionally Selective Dopamine D2, D3 Receptor Partial Agonists, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2014**, *57*, 4861–4875.
- ⁹⁶ Rasmussen S.G., DeVree B.T., Zou Y., Kruse A.C., Chung K.Y., Kobilka T.S., Thian F.S., Chae P.S., Pardon E., Calinski D., Mathiesen J.M., Shah S.T., Lyons J.A., Caffrey M., Gellman S.H., Steyaert J., Skiniotis G., Weis W.I., Sunahara R.K., Kobilka B.K., Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex, *Nature*, **2011**, *477*, 549-555.

-
- ⁹⁷ Kling R.C., Tschammer N., Lanig H., Clark T., Gmeiner P., Active-state model of a dopamine D2 receptor-G α i complex stabilized by aripiprazole-type partial agonists. *PLoS One*, **2014**, *9*, e100069.
- ⁹⁸ Mistry S.N., Shonberg J., Christopher J., Draper-Joyce C.J., Herenbrink C.K., Michino M., Shi L., Christopoulos A., Capuano B., Scammells P.J., Lane J.R., Discovery of a Novel Class of Negative Allosteric Modulator of the Dopamine D2 Receptor Through Fragmentation of a Bitopic Ligand, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2015**, *58*, 6819–6843.
- ⁹⁹ Wootten D., Christopoulos A., Sexton P.M., Emerging paradigms in GPCR allostery: implications for drug discovery, *Nature Reviews/Drug Discovery*, **2013**, *12*, 630-647.
- ¹⁰⁰ Valant C., Lane J.R., Sexton P.M., Christopoulos A., The Best of Both Worlds? Bitopic Orthosteric/Allosteric Ligands of G Protein–Coupled Receptors, *Annual Review Pharmacology and Toxicology*, **2012**, *52*, 153–178.
- ¹⁰¹ Jörg M., May L.T., Mak F.S., Lee K.C.K., Miller N.D., Scammells P.J., Capuano B., Synthesis and Pharmacological Evaluation of Dual Acting Ligands Targeting the Adenosine A2A and Dopamine D2 Receptors for the Potential Treatment of Parkinson's Disease, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2015**, *58*, 718–738.
- ¹⁰² Hiller C., Kühhorn J., Gmeiner P., Class A: G-Protein-Coupled Receptor (GPCR) Dimers and Bivalent Ligands, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2013**, *56*, 6542-6559.
- ¹⁰³ Lane R.J., Sexton P.M., Christopoulos A., Bridging the gap: bitopic ligands of G-protein-coupled receptors, *Trends in Pharmacological Sciences*, **2013**, *1*, 59-66.
- ¹⁰⁴ Šukalovic V., Bogdan A.E., Tovilović G., Ignjatović Đ., Andrić D., Kostić-Rajačić S., Šoškić V., N- $\{[2-(4\text{-Phenyl-piperazin-1yl})\text{-ethyl}]\text{-phenyl}\}$ arylamides with Dopamine D2 and 5-Hydroxytryptamine 5HT_{1A} Activity: Synthesis, Testing and Molecular Modeling, *Archive Der Pharmazie Chemistry in Life Sciences*, **2013**, *346*, 708-717.
- ¹⁰⁵ Francisko M.O., Rovira B.A., Barjoan D.P., Ges C., Jose M., Process for preparation of 3-[2-{4-(6-fluoro-1,2-benzio, soxazol-3yl)piperidino}ethyl]-2-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-4H-pyridol[1,2a]pyrimidin-4-one [risperidone], *ES 2050069*, *CAN* 121:255824.

-
- ¹⁰⁶ Brown H.C., Heim P., Diborane as a Mild Reducing Agent for the Conversion of Primary, Secondary, and Tertiary Amides into the Corresponding Amines, *Journal of American Chemical Society*, **1964**, *86*, 3566-3567.
- ¹⁰⁷ Brown H., Subba Rao B.C., A New Powerful Reducing Agent-Sodium Borohydride in the Presence of Aluminum Chloride and Other Polyvalent Metal Halides, *Journal of American Chemical Society*, **1956**, *78*, 2582-2588.
- ¹⁰⁸ Zhou S., Junge K., Addis D., Das S., Beller M., A Convenient and General Iron-Catalyzed Reduction of Amides to Amines, *Angewandte Chemie*, **2009**, *121*, 9671-9674.
- ¹⁰⁹ Zhou S., Junge K., Addis D., Das S., Beller M., Zinc-Catalyzed Reduction of Amides: Unprecedented Selectivity and Functional Group Tolerance, *Journal of American Chemical Society*, **2010**, *132*, 1770-1771.
- ¹¹⁰ Kano S., Tanaka Y., Sugino E., Hibino S., Reduction of Some Functional Groups with Titanium (IV) Chloride/Sodium Borohydride, *Synthesis*, **1980**, *9*, 695-697.
- ¹¹¹ Mićović V., Roglić G.M., Ivanović M.D., Došen-Mićović Lj., Kiricojević V., Popović J.B., The synthesis of lactam analogues of fentanyl, *Journal of the Chemical Society, perkin Transaction 1*, **1996**, *16*, 2041-2050.
- ¹¹² Klausner Y., Bodansky M., Coupling Reagents in Peptide Synthesis, *Synthesis*, **1972**, *9*, 453-463.
- ¹¹³ Wilson J.D., Weingharte H., Titanium tetrachloride promoted conversion of carboxylic acids to carboxamides, *Canadian Journal Of Chemistry*, **1970**, *48*, 983-986.
- ¹¹⁴ Yang J., Hua W.Y., Wang F.B., Wanga Z.Y., Wanga X., Design, synthesis, and inhibition of platelet aggregation for some 1-o-chlorophenyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2004**, *12*, 6547-6557.
- ¹¹⁵ Alamgir M., Black D. St.C., Kumar N., Synthesis, Reactivity and Biological Activity of Benzimidazoles, *Top Heterocyclic Chemistry*, **2007**, *9*, 87-118.

-
- ¹¹⁶ Phillips M.A., The methylation of benzimidazoles, 1931, *Journal of the Chemical Society*, 1143-1153, doi: 10.1039/JR9310001143
- ¹¹⁷ Ross A.G., Li X., Danishefsky S.J., Preparation of Czclobutenone, *Organic Synthesis*, **2012**, 89, 491-500.
- ¹¹⁸ Baskaran S., Baig M.H.A., Banerjee S., Baskaran C., Bhanu K., Deshpande S.P., Trivedi G.K., An Efficient and Stereoselective Synthesis of (2R,2'S)-1-O-(2'-hydroxyhexadecyl)glycerol and Its Oxo Analogs: Potential Antitumour Compounds from Shark Liver Oil, *Tetrahedron*, **1996**, 52, 6437-6452.
- ¹¹⁹ McKillop A., Bromley D., Taylor E.C., Thallium in organic synthesis. VI. Synthesis of primary aliphatic bromides, *The Journal of Organic Chemistry*, **1969**, 34, 1172-1173.
- ¹²⁰ Cristol S., Firth W. Jr., Communications. A Convenient Synthesis of Alkyl Halides from Carboxylic Acids, *The Journal of Organic Chemistry*, **1961**, 26, 280-280.
- ¹²¹ Subba Rao N.V., Ratnam C.V., 2- Disubstituted Benzimidazole from 4-methyl-o-phenyldiamine and Benzaldehyde, *Proceedings of the Indian Academy of Sciences, Section A*, **1956**, 331-337.
- ¹²² Raju B., Ragul R., Sivasankar B.N., A new reagent for selective reduction of nitro group, *Indian Journal of Chemistry*, **2009**, 48 B, 1315-1318.
- ¹²³ Kumar P.S., Rai K.M.L., Reduction of aromatic nitro compounds to amines using zinc and aqueous chelating ethers: Mild and efficient method for zinc activation, *Chemical Papers*, **2012**, 66, 772-778.
- ¹²⁴ Hazlet S.E., Dornfeld C.A., The Reduction of Aromatic Nitro Compounds with Activated Iron, *Journal of American Chemical Society*, **1944**, 66, 1781-1782.
- ¹²⁵ Ramesh C., Iron-Acetic Acid: A Versatile Reductive Cyclizing Agent, *Synlett*, **2011**, 4, 587-588.
- ¹²⁶ Natelson S., Gottfried S.P., Synthesis of Derivatives of Symmetrical Diphenylethane Related to Materials Occurring Naturally. 11. 3,4-Dihydro-5-methyl-3'-methoxydibenzyl, a Compound Related to Oestrone in Structure, *Journal of American Chemical Society*, **1939**, 61, 1001-1002.

-
- ¹²⁷ Doxsee K.M., Feigel M., Stewart K.D., Canary J.W., Knobler C.B., Cram D.J., Host-Guest Complexation. 42. Preorganization Strongly Enhances the Tendency of Hemispherands To Form Hemispheraplexes, *Journal of American Chemical Society*, **1987**, *109*, 3098-3107.
- ¹²⁸ Knifton J.F., Homogeneous Catalyzed Reduction of Nitro Compounds. 111. Synthesis of Aliphatic Amines, *Journal of Organic Chemistry*, **1975**, *40*, 519-520.
- ¹²⁹ Winans C.F., Nickel as a Catalyst for the Hydrogenation of Aromatic Halogen Compounds, *Journal of American Chemical Society*, **1939**, *61*, 3564–3565.
- ¹³⁰ Brown R.K., Kelson N.A., 6-Aminoindole, *Journal of American Chemical Society*, **1954**, *76*, 5149–5150.
- ¹³¹ Orlando C.M.Jr., Wirth J.G., Heat D.R., Methyl Aryl Ether Cleavage in Benzazole Syntheses in Polyphosphoric Acid, *Journal of Organic Chemistry*, **1970**, *35*, 3147-3149.
- ¹³² Javitch J.A., Mapping the Binding-Site Crevice of the D2 Receptor, *Advances in Pharmacology*, **1997**, *42*, 412-415
- ¹³³ Schrödinger L.L.C., New York, NY (2011) Glide, version 5.7
- ¹³⁴ Markwell M.A.K., Haas S.M., Bieber L.L., Tolbert N., Modification of Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples, *Analytical Biochemistry*, **1978**, *87*, 206-210.
- ¹³⁵ GraphPad Prism, GraphPad Software (<http://www.graph-pad.com>)

BIOGRAFIJA

Jelena Penjišević je rođena u Somboru 1978. Osnovnu i srednju školu završila je u Apatinu. Diplomirala je na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu 2005.god. i na istom je završila master studije. Doktorske studije upisala je školske 2008/09. godine na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu.

Od aprila 2005. god. zaposlena je u IHTM-"Centar za hemiju".

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Jelena Penjišević

broj indeksa DH 15/2008

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Proučavanje mesta vezivanja dopaminskog D2 receptora novosintetisanim

ligandima 2-metoksifenilpiperazinskog tipa

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 7.10.2016.

Jelena Penjišević

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Jelena Penjišević

Broj indeksa DH 15/2008

Studijski program Hemija

Naslov rada **Proučavanje mesta vezivanja dopaminskog D2 receptora
novosintetisanim ligandima 2- metoksifenilpiperazinskog tipa**

Mentori: dr Goran Roglić, dr Vladimir Šukalović

Potpisani/a Jelena Penjišević

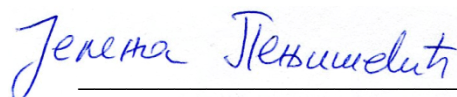
Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjena u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 7.10.2016.


Jelena Penjišević

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Proučavanje mesta vezivanja dopaminskog D2 receptora novosintetisanim

ligandima 2-metoksifenilpiperazinskog tipa

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo

2. Autorstvo-nekomercijalno

3. Autorstvo-nekomercijalno - bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licence dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 7.10.2016.

