

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEVŽ ŠENICA

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEVŽ ŠENICA

**SINTEZA POTENCIALNIH ZAVIRALCEV ENCIMA InhA Z N-
CIKLOALKILAMIDNIM SKELETON IN OPTIMIZACIJA
POGOJEV LOČBE ENANTIOMEROV ZAVIRALCEV InhA**

**SYNTHESIS OF POTENTIAL InhA INHIBITORS WITH N-
CYCLOALKYLAMIDE SCAFFOLD AND OPTIMISATION OF
ENANTIOMERIC SEPARATION OF InhA INHIBITORS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko naložko sem opravljal na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Staneta Pajka, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Urbana Košaka, mag. farm. Spektroskopske meritve in elementne analize so opravili na Fakulteti za farmacijo in na Institutu »Jožef Stefan« v Ljubljani.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Stanetu Pajku, mag. farm. za strokovno pomoč in vse nasvete pri izdelavi magistrske naloge. Prav tako se zahvaljujem somentorju asist. dr. Urbanu Košaku, mag. farm. za pomoč in nasvete pri izvedbi HPLC analiz. Hvala tudi Damijanu in Martini za njuno pomoč v laboratoriju.

Na koncu bi se zahvalil še mojim najbližnjim za vso podporo tekom študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelal pod mentorstvom doc. dr. Staneta Pajka, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Urbana Košaka, mag. farm.

Matevž Šenica

VSEBINA

1. UVOD	1
1.1 TUBERKULOZA.....	1
1.2 MIKOBakterije	2
1.2.1 ZGRADBA MIKOBakterijske celične ovojnice	2
1.2.2 struktura in biosinteza mikolnih kislin.....	3
1.3 ZAVIRALCI InhA.....	5
1.3.1 Izoniazid.....	5
1.3.2 Etionamid in protonamid.....	6
1.3.3 Direktni zaviralci InhA.....	6
1.4 KIRALNA LOČBA	6
1.4.1 Kiralnost	6
1.4.2 Pristopi za pridobivanje optično čistih spojin	7
1.4.3 Kromatografija	8
1.4.4 Kiralne stacionarne faze	9
2. NAČRT DELA	11
3. MATERIALI IN METODE	13
3.1 Materiali.....	13
3.2 Metode	13
• Kromatografske metode	13
• Spektroskopske metode.....	13
• Določanje tališča	14
4. EKSPERIMENTALNI DEL	15

4.1 Sinteza 4-((3,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)metil)- <i>N</i> -(2-(4-feniltiazol-2-il)ciklopentil)benzamida (9a) in 4-((3,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)metil)- <i>N</i> -(2-(4-feniltiazol-2-il)cikloheksil)benzamida (9b)	15
4.2 LOČEVANJE IN ZBIRANJE ENANTIOMEROV 1-(5-metiltiazol-2-il)-1-(2-(1-((2-metiltiazol-4-il)metil)-1 <i>H</i> -pirazol-3-ilamino)tiazol-5-il)etanola (tiazol 1) in 1-(2-(1-benzil-1 <i>H</i> -pirazol-3-ilamino)tiazol-5-il)-1-(5-metiltiazol-2-il)etanola (tiazol 2)	32
4.2.1 Ločevanje enantiomerov 1-(5-metiltiazol-2-il)-1-(2-(1-((2-metiltiazol-4-il)metil)-1 <i>H</i> -pirazol-3-ilamino)tiazol-5-il)etanola (tiazol 1) in zbiranje posameznega enantiomera	32
4.2.2 Ločevanje enantiomerov 1-(2-(1-benzil-1 <i>H</i> -pirazol-3-ilamino)tiazol-5-il)-1-(5-metiltiazol-2-il)etanola (tiazol 2) in zbiranje posameznega enantiomera	40
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	49
5.1 Komentar sinteznih postopkov	49
5.2 Komentar ločevanja in zbiranja enantiomerov	52
5.3 Rezultati	55
• Testiranje sintetiziranih spojin	55
• Rezultati ločevanja in zbiranja enantiomerov	55
6. SKLEP	57
7. VIRI.....	58

POVZETEK

Tuberkuloza, ki jo povzroča okužba z bakterijo *M. tuberculosis*, sodi med 10 najpogostejših vzrokov smrti v svetu. Zdravljenje okužbe je zelo zahtevno in vključuje kombinirano terapijo z več antibiotiki oz. kemoterapevtiki. Isoniazid je kemoterapevtik prvega izbora pri okužbi z *M. tuberculosis* in je glede na mehanizem delovanja predzdravilo. Aktivira ga encim KatG, aktivna oblika pa nato zavre InhA, ki je esencialen encim pri sintezi mikolnih kislin. Primarni vzrok za rezistenco na isoniazid so mutacije KatG. InhA zato ostaja zanimiva tarča, saj bi direktni zaviralec InhA moral zavreti encim tudi pri sevih, ki so razvili rezistenco z mutacijo na genu *katG*.

V magistrski nalogi smo načrtovali potencialna direktna zaviralca InhA na podlagi znanih »spiro« inhibitorjev, pri čemer smo tetrahidropiran zamenjali z *N*-cikloalkilamidnim skeletom. Uspelo nam je sintetizirati spojini **9a** in **9b** s ciklopentilamidnim oziroma cikloheksilamidnim skeletom. Spojinama so na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani na izoliranem encimu InhA določili vrednosti IC₅₀, ki je za **9a** znašala 0,579 μM, za **9b** pa 2 μM. V primerjavi s spojino **I**, iz katere smo izhajali in katere vrednost IC₅₀ znaša 0,02 μM, sicer nismo dosegli izboljšanja, vendar predvsem močnejši zaviralec (spojava **9a**) z možnostjo uvedbe dodatnih skupin na ciklopentanski obroč, predstavlja dobro izhodišče za nadaljnjo optimizacijo.

V drugem delu smo se osredotočili na optimizacijo ločbe enantiomerov dveh zaviralcev InhA, ki so jih pripravili na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani v sodelovanju z GSK. Ti imajo prisoten kiralni center na delu molekule, ki tvori ključne interakcije z encimom. Znane so inhibitorne konstante le za racemat, zelo verjetno pa enantiomera različno zavreta encim. Na podlagi znanih pogojev ločbe za podobne spojine smo za spojini **tiazol 1** in **tiazol 2** optimizirali ločbo enantiomerov s preparativno tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti in izolirali posamezne enantiomere, ki jih bodo dodatno raziskali.

Ključne besede: tuberkuloza, *M. tuberculosis*, zaviralci InhA, *N*-cikloalkilamidni, kiralna ločba

ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease caused by bacteria *M. tuberculosis* and is globally one of the top 10 causes of death. Treatment of the disease is very demanding and includes therapy with multiple antibiotics. The most important first line antibiotic for treating infections with *M. tuberculosis* is isoniazid which is a prodrug. It is transformed into active form by enzyme KatG and when activated it can inhibit InhA, an enzyme essential in synthesis of mycolic acids. The main reason for bacterial resistance to isoniazid are mutations of KatG enzyme. Subsequently InhA remains an interesting target for direct inhibitors of InhA, which don't require prior activation and are not affected by mutations on *katG* gene.

In our work we designed and synthesized potential direct InhA inhibitors based on structures of already known »spiro« inhibitors. Our aim was to replace tetrahydropyran with *N*-cycloalkylamide scaffold. We successfully synthesized compounds **9a** and **9b** with cyclopentylamide and cyclohexylamide scaffold, respectively. IC₅₀ was determined on isolated InhA enzyme on Faculty of pharmacy, University of Ljubljana. IC₅₀ values were 0,579 μM and 2 μM for compounds **9a** and **9b**, respectively. We didn't achieve improvement when compared with IC₅₀ of 0,02 μM for compound **I** with tetrahydropyran scaffold which our design was based on. But nevertheless especially the compound **9a**, which is compared to **9b** a more potent inhibitor, offers a fresh starting point for optimization with possibilities of additional modifications on cyclopentane ring.

In second part of our work we optimized separation of enantiomers of two InhA inhibitors with thiazole scaffold synthesized on Faculty of Pharmacy University of Ljubljana in cooperation with GSK. The part of each molecule which forms key interactions with InhA enzyme has a center of chirality. So far inhibitory concentrations were determined only for the racemic mixtures but it is very likely enantiomers inhibit the enzyme differently. Based on known conditions for separation of similar compounds we optimized separation of compounds' **tiazol 1** and **tiazol 2** enantiomers on HPLC. We successfully collected individual enantiomers for further testing.

Key words: tuberculosis, *M. tuberculosis*, InhA inhibitors, *N*-cycloalkylamide, chiral separation

SEZNAM OKRAJŠAV

AcOH	ocetna kislina
aq	vodna raztopina
Boc₂O	di-terc-butil dikarbonat
CDCl₃	devterirani kloroform
CDI	karbonildiimidazol
DEA	dietilamin
DKM	diklorometan
DMAP	4-dimetilaminopiridin
DMF	dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
eq	molarni ekvivalent
ESI	angl. electrospray ionization – elektrorazpršilna ionizacija
Et₃N	trietilamin
Et₂O	dietil eter
EtOH	etanol
EtOAc	etyl acetat
FAS	angl. fatty acid synthase – sintaza maščobnih kislin
HIV	virus človeške imunske pomanjkljivosti
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HR-MS	masna spektroskopija visoke ločljivosti
Hz	Hertz
IC₅₀	srednja inhibitorna koncentracija
InhA	enoil acil prenašalni protein
iPrOH	propan-2-ol
IR	infrardeča spektroskopija
J	sklopitvena konstanta (v Hertzih)
m	multiplet
MeCN	acetonitril
MeOH	metanol
MF	mobilna faza
MDR-TB	angl. multidrug resistant tuberculosis – sevi M. tuberculosis odporni

	vsaj na izoniazid in rifampicin
MS	masna spektroskopija
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NMR	jedrska magnetna resonanca
Pd/C	paladij na ogljiku
q	kvartet
Rf	retencijski faktor
s	singlet
t	triplet
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoplastna kromatografija
t_r	retencijski čas
TBTU	O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronijev tetrafluoroborat
XDR-TB	angl. extensively drug-resistant TB

1. UVOD

1.1 TUBERKULOZA

Tuberkuloza je nalezljiva, kronična bolezen, ki jo povzroča bakterija *M. tuberculosis* in najpogosteje prizadene pljuča. Prenaša se po zraku s kužnim aerosolom, ki nastaja na primer pri kašljanju, kihanju in glasnem govorjenju. Približno ena tretjina svetovnega prebivalstva je okužena z latentno obliko tuberkuloze (ne kažejo znakov bolezni, niti je ne prenašajo). Pri tej populaciji obstaja 10 % verjetnost, da se bo tuberkuloza razvila do aktivne bolezni, to verjetnost pa znatno povišujejo morebitne pridružene okvare imunskega sistema, kot je okužba z virusom HIV, podhranjenost ali diabetes ter uporaba tobačnih izdelkov (1), (2). V svetovnem merilu spada med 10 najpogostejših vzrokov smrti, o čemer priča število novih obolenj in smrtnih izidov bolezni; po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije za leto 2015 je za tuberkulozo na novo zbolelo 10,4 milijona ljudi, kar 1,8 milijona ljudi (0,4 milijona je bilo sočasno okuženih z virusom HIV) pa je za to boleznijo umrlo (1).

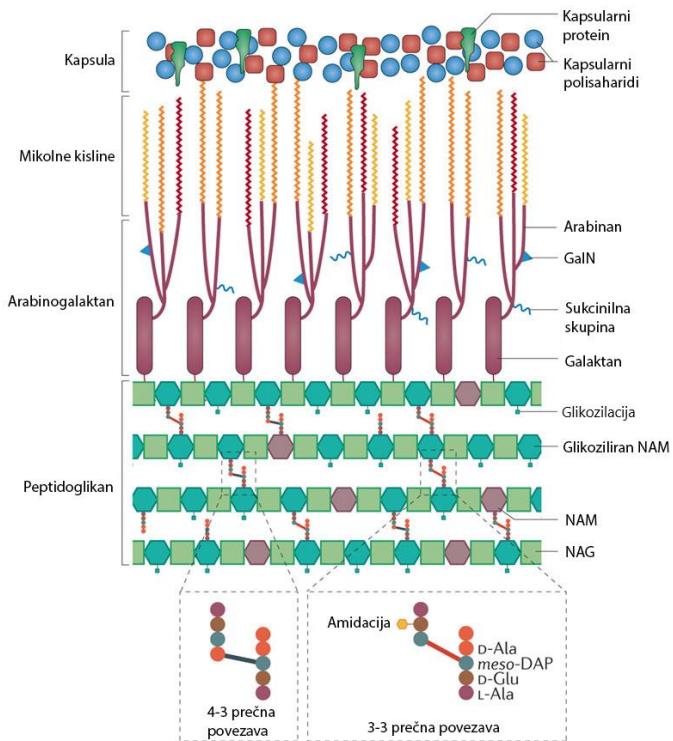
Ob pravočasnem odkritju in ustremnem zdravljenju je tuberkuloza popolnoma ozdravljiva. Aktivno obliko se običajno zdravi 6–9 mesecev z uporabo kombinacije več različnih antibiotikov oz. kemoterapevtikov. Po smernicah Svetovne zdravstvene organizacije spadajo med zdravila prve izbire in med esencialne zdravilne učinkovine za zdravljenje tuberkuloze izoniazid, rifampicin, pirazinamid, etambutol in streptomycin. V večini primerov so ta zdravila učinkovita, problem pa nastane, če se pojavijo okužbe z večkrat odpornimi bacili tuberkuloze (MDR-TB). Gre za tip okužbe, ki se ne odziva na zdravljenje z izoniazidom in rifampicinom, dvema najučinkovitejšima zdraviloma prve izbire. Če pride do tovrstne okužbe, pridejo v poštev zdravila druge izbire, kot so na primer kanamicin, amikacin, moksifloksacin, ofloksacin, etionamin, protionamid, terizidon itd., ki pa so toksična in draga, potrebna je dolgotrajna terapija, ki lahko traja tudi 2 leti. V nekaterih primerih se lahko razvije hujša oblika rezistence, ki jo označuje kratica XDR-TB (»extensively drug-resistant TB«) – v tem primeru je zdravljenje neuspešno tudi z najučinkovitejšimi zdravili druge izbire, kar za bolnike pogosto pomeni, da alternativ za njihovo zdravljenje ni (1), (3).

1.2 MIKOBAKTERIJE

M. tuberculosis spada med mikobakterije, ki so po Gramu pozitivne, aerobne, znotrajcelične bakterije, ki se od drugih bakterij ločijo po edinstveni celični steni, ki vsebuje veliko maščobnih kislin in voskov. Vsebnost lipidov lahko predstavlja do 40 % suhe celične mase, v primerjavi z manj kot 5 % pri drugih Gram-pozitivnih bakterijah in 10 % pri Gram-negativnih bakterijah. Taka zgradba onemogoča uporabo običajnih barvil s katerimi ponavadi barvamo bakterije pred mikroskopiranjem in tudi kasnejše razbarvanje z alkoholom in klorovodikovo kislino – zato se za mikobakterije uporablja termin, da so acidorezistentne, za njihovo barvanje pa se uporablja posebno tehniko po Ziehl-Neelsonu (4), (5).

1.2.1 ZGRADBA MIKOBAKTERIJSKE CELIČNE OVOJNICE

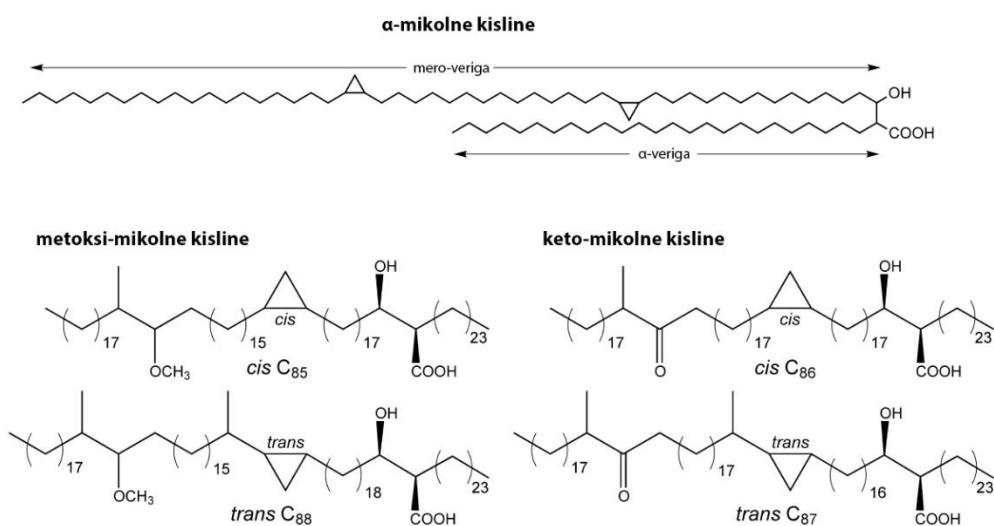
Glavna značilnost mikobakterij je zapletena zgradba njihove celične ovojnice. Najbolj notranjo plast predstavlja plazemska membrana, ki se ne razlikuje od tiste pri ostalih bakterijah, na zunanji strani plazemske membrane pa se nahaja masivna celična stena, ki je edinstvena in prisotna zgolj pri mikobakterijah. Gradi jo tri-plastno jedro imenovano tudi mikolilarabinogalaktan-peptidoglikanski (mAGP) kompleks (6), (7). Ta je sestavljen iz plasti peptidoglikana, ki je kovalentno povezan s heteropolisaharidom arabinogalaktanom, ki je na svojih nereducirajočih koncih preko estrskih vezi povezan z dolgoverižnimi (C_{60} – C_{90}) mikolnimi kislinami. V tej lipidni plasti se nahajajo tudi interkalirani, nekovalentno vezani lipidi in lipoglikani; fosfatidilinozitol manozidi (PIM), ftiocerol dimikocerozati (PDIM), fenolni glikolipidi (PGL), več vrst aciltrehaloz in drugi. Kovalentno vezane mikolne kisline in prosti lipidi tvorijo slabo permeabilni asimetrični dvosloj (imenovan tudi »mikomembrana« oz. zunanja membrana), ki predstavlja glavni virulentni dejavnik in mikobakterijam zagotavlja odpornost na veliko število zdravilnih učinkovin. Na zunanji strani mikomembrane se nahaja še ohlapno pritrjena celični kapsuli podobna struktura, ki je sestavljena večinoma iz polisaharidov in proteinov (7).



Slika 1: Zgradba mikobakterijske celične ovojnice (prirejeno po (8))

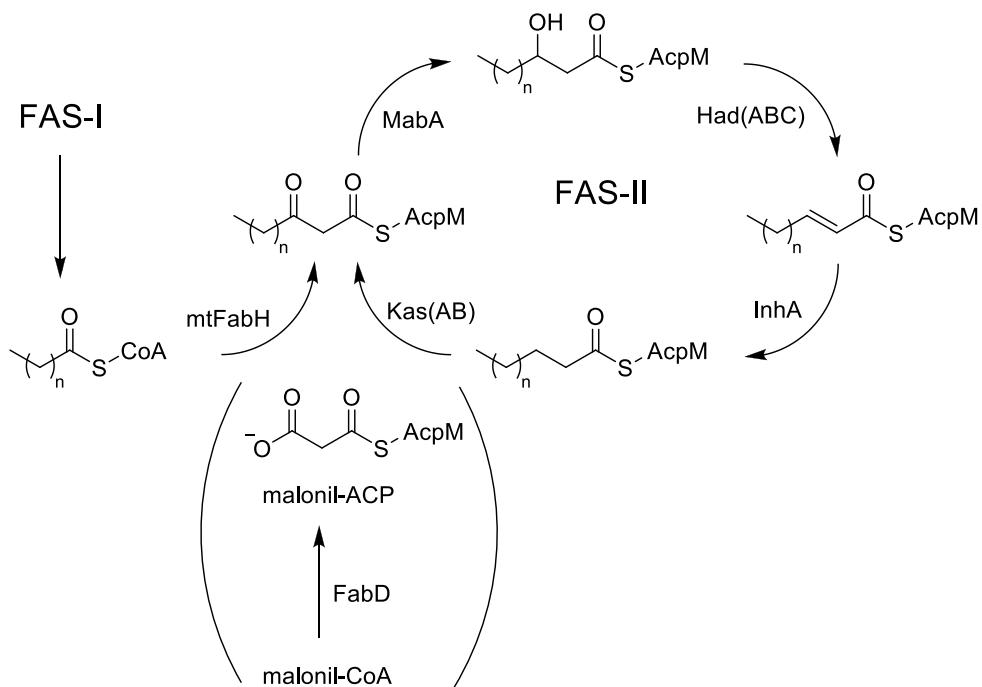
1.2.2 STRUKTURA IN BIOSINTEZA MIKOLNIH KISLIN

Strukturno obstajajo trije tipi mikolnih kislin; največ jih je v obliki α -mikolnih kislin, ki obstajajo samo v *cis*-ciklopropanski konfiguraciji, medtem ko vsebujejo metoksi- in keto-mikolne kisline ciklopropanski obroč bodisi v *cis*- ali *trans*-konfiguraciji glede na sosednjo metilno verigo (Slika 2) (9).



Slika 2: Tipi mikolnih kislin (prirejeno po (9))

Biosintezo mikolnih kislin lahko prikažemo skozi pet različnih stopenj. V njih sodelujeta multifunkcionalni encim FAS-I in sistem FAS-II, ki vsebuje serijo mono-funkcionalnih encimov, izmed katerih vsak katalizira eno reakcijo (10). V prvi stopnji se sintetizirajo kratko-verižne maščobne kisline (C_{16-24}) v FAS-I kompleksu. Te nasičene maščobne kisline lahko tvorijo α -alkilne verige (C_{24}) ali pa se z vstopom v sistem FAS-II podaljšajo do mero-verig (C_{56}). Cikel reakcij FAS-II se začne s kondenzacijo katalizirano s mtFabH (β -ketoacil-ACP sintaza III), ki v strukturo mikolnih kislin vključi malonil-AcpM in palmitoil-CoA, da nastane β -ketoacil-AcpM intermediat. Tega nato reducira MabA (β -ketoacil-ACP reduktaza) do nastanka β -hidroksiacil-AcpM-ja, ki se nadalje dehidratira s pomočjo Had(ABC) (β -hidroksiacil-ACP dehidrataze) do *trans*-2-enoil-AcpM intermediata. V naslednji stopnji pride ob redukciji z encimom InhA (enoil-ACP reduktaza) do nastanka acil-AcpM-ja podaljšanega za dva ogljika. FAS-II cikel se nadaljuje z dodatno kondenzacijo, ki jo katalizira Kas(AB) (β -ketoacil-ACP sintaza) in se vrača v cikel s prej omenjenimi MabA, Had(ABC) in InhA (slika 3). Ta cikel podaljševanja se nadaljuje dokler acilna veriga ne doseže 42–62 ogljikov in se formira nasičen dolgo-verižni meromikolat. Sintezi s FAS-II kompleksom sledijo še različne modifikacije pri katerih se v reakciji Claisenove kondenzacije povežeta α -alkilna in mero veriga in se formirajo končne oblike mikolnih kislin (11).



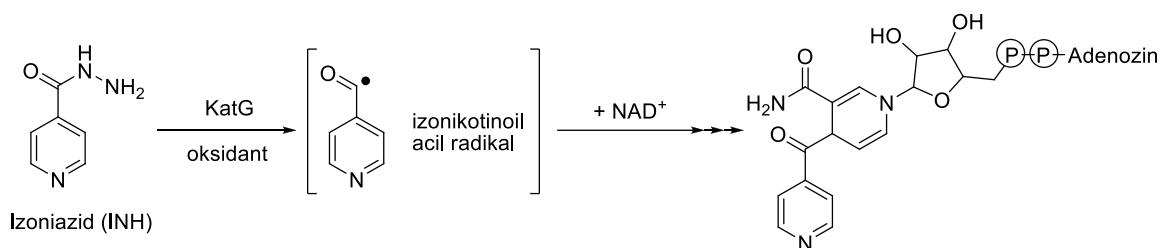
Slika 3: FAS-II cikel (povzeto po (12))

1.3 ZAVIRALCI InhA

InhA je od NADH odvisna 2-trans-enoil-acil prenašalna proteinska reduktaza, ki je odgovorna za zadnjo stopnjo pri procesu podaljševanja maščobnih kislin v FAS-II sistemu tvorbe mikolnih kislin in je klinično validirana tarča pri iskanju učinkov za zdravljenje tuberkuloze, saj inhibicija encima InhA privede do smrti bakterije (13).

1.3.1 Izoniazid

Da je inhibicija InhA ena izmed najbolj učinkovitih načinov za ubijanje *M. tuberculosis*, klinično dokazuje izoniazid (INH), ki je eden izmed najučinkovitejših protituberkulotikov (14). INH vstopi v mikobakterijsko celico s pasivno difuzijo. Sam ni toksičen za bakterijsko celico, temveč je predzdravilo, ki ga aktivira mikobakterijski encim KatG, multifunkcionalna katalaza-peroksidaza, ki ima poleg tega tudi peroksinitritazno in NADH-oksidazno aktivnost (15). Kljub temu, da so podrobnosti kemijske transformacije še del raziskav, se predvideva, da aktivacija INH s KatG in ob prisotnosti različnih oksidantov vodi do nastanka izonikotinoil acilnega radikala. KatG preko uporabe vodikovega peroksidu (ali alkil hidroperoksidov) katalizira oksidacijo izoniazida. Nekaj ostalih mehanizmov predvideva, da KatG deluje bodisi preko uporabe NADH-oksidaze, peroksinitritaze ali od Mn^{2+} odvisne peroksidaze. Izonikotinoil acilni radikal se nato poveže z $NAH^+/NADH$ pri čemer nastane aktivna oblika izoniazid-NADH, za katerega so ugotovili, da je močan zaviralec encima InhA (16).



Slika 4: shematična predstavitev nastanka adukta INH-NADH, ki nastane pri reakciji s KatG, domnevno preko izonikotinoilnega radikala (povzeto po (16))

Kljub temu, da je izoniazid v večini primerov zdravljenja tuberkuloze učinkovit, pa obstajajo sevi *M. tuberculosis* (MDR-TB in XDR-TB), ki so nanj odporni. Odpornost je posledica mutacij predvsem na encimu KatG, v manjši meri pa tudi mutacij v aktivnem mestu encima InhA. Iz tega razloga se pospešeno išče nove, direktnе zaviralce InhA, ki za svoje delovanje ne potrebujejo bioaktivacije in posledično niso podvrženi rezistenci (14).

1.3.2 Etionamid in protonamid

Etionamid (ETH) in protonamid (PTH) sta strukturna analoga izoniazida (INH) in pomembna protituberkulotika druge izbire, ki se uporablja v primeru okužb z MDR-TB. Oba sta tako kot INH predzdravili, ki postaneta aktivna šele v obliki adukta z NAD⁺, z razliko, da za njuno bioaktivacijo ni odgovoren encim KatG temveč encim EtaA (od flavina odvisna monooksigenaza). To pomeni, da sta učinkovita tudi pri sevih *M. tuberculosis* pri katerih so prisotne mutacije na encimu KatG in so posledično odporni na izoniazid. Kljub temu pa ETH in PTH nista idealni učinkovini, saj se lahko pojavijo mutacije tudi na encimu EtaA (17), (18).

1.3.3 Direktni zaviralci InhA

Pojav rezistence na izoniazid in sorodne učinkovine, ki so po svoji strukturi predzdravila in za aktivacijo potrebujejo različne encime, je privedel do intenzivnejšega razvoja zdravilnih učinkovin, ki za svoje delovanje ne potrebujejo predhodne aktivacije in posledično niso podvrženi rezistenci zaradi mutacij na encimih kot je KatG. V zadnjih letih so tako odkrili in še odkrivajo številne obetavne, strukturno različne skupine direktnih zaviralcev InhA, med katere spadajo difenil etri (najbolj znan predstavnik je triklosan), 4-hidroksi-2-piridoni, tiadiazoli, aril amidi, pirolidin karboksamidi, tetrahidropiranski derivati in drugi. (19), (20).

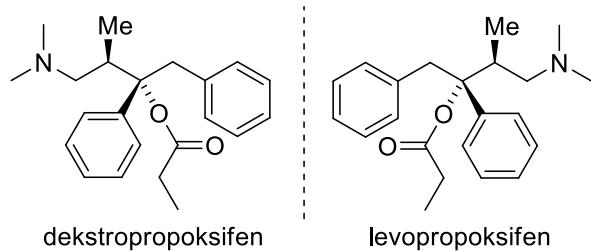
1.4 KIRALNA LOČBA

1.4.1 Kiralnost

Kiralne so molekule katerih zrcalne slike se med seboj ne prekrivajo. To pomeni, da so si identične po atomski sestavi, vendar imajo različno razporeditev atomov v prostoru. Ali je molekula kiralna najlažje sklepamo iz prisotnosti stereogenih centrov; gre za atome, ponavadi ogljika, na katere so vezani 4 različni atomi/funkcionalne skupine. Dvema kiralnima molekulama, ki sta zrcalni sliki druga drugi pravimo enantiomera. Za enantiomere je značilno, da se med seboj ne razlikujejo po fizikalno-kemijskih lastnostih razen v smeri zasuka linearo polarizirane svetlobe, zato ločitev v nekiralnem okolju ni možna. Zmesi dveh enantiomerov, ki sta prisotna v enakem deležu pravimo racemat oziroma racemna zmes. Dvema kiralnima molekulama, ki sta identični po sestavi in povezanosti atomov vendar nista zrcalni sliki druga drugi pa imenujemo diastereomera. Ti

imajo več stereogenih centrov, poleg tega so razdalje med atomi pri posameznih diastereomerih različne, kar se odraža v različnih fizikalno-kemijskih lastnostih. Posledično jih je med seboj možno ločiti, saj se razlikujejo v topnosti (ločujemo s selektivno kristalizacijo), imajo različna vrelišča (uporaba destilacije) ali tvorijo različne interakcije (izkoriščamo pri kromatografiji). Enantiomeri in diastereomeri so stereoizomeri – med seboj se ne razlikujejo v povezanosti atomov (v takem primeru gre za konstitucijske izomere), temveč zgolj v celokupni obliki molekule (21).

Receptor za določeno zdravilno učinkovino, ki je kiralna in ima več enantiomernih oblik, ponavadi posamezen enantiomer »prepozna« različno in ima do njega različno afiniteto. Vezava je torej odvisna od komplementarnosti posameznega enantiomera z vezavnim mestom. Posledica tega je, da imajo enantiomeri določene zdravilne učinkovine različne farmakokinetične in farmakodinamične lastnosti. Formulacije, ki vsebujejo samo en enantiomer, ki se je skozi raziskave izkazal za boljšega, imajo tako iz farmakokinetičnega, farmakodinamičnega in toksikološkega vidika prednosti kot so nižji terapevtski odmerki, večja stopnja varnosti, nižja interindividualna variabilnost, manj interakcij z drugimi zdravili ter manj stranskih učinkov. V določenih primerih pa imajo celo popolnoma drugačne terapevtske lastnosti, kot na primer enantiomera dekstropropoksifena in levopropoksifena, kjer je prvi analgetik, drugi pa antitusik (21). Vse to so razlogi, da gre trend pri razvoju novih zdravilnih učinkovin v smeri uporabe enantiomerno čistih molekul (22).



Slika 5: Enantiomerni obliki propoksifena (povzeto po (21))

1.4.2 Pristopi za pridobivanje optično čistih spojin

Za pridobivanje optično čistih spojin obstajajo trije glavni pristopi:

- Uporaba molekul kiralnega bazena (»chiral pool«)

- Stereoselektivna sinteza
- Kiralna ločba enantiomerov iz racemne zmesi

Uporaba molekul kiralnega bazena je pristop, pri katerem se za sintezo optično čistih spojin kot izhodne spojine za reakcije uporablja enantiomerno čiste spojine iz naravnih (živalskih ali rastlinskih) virov. Primeri takih spojin so na primer aminokisline, ogljikovi hidrati, terpeni, alkaloidi in druge. Prednosti takega pristopa so relativno nizka cena, izhodne spojine izkazujejo visoko stopnjo optične čistosti, poleg tega so stereogeni centri že prisotni in jih ni potrebno uvajati na novo. **Stereoselektivna sinteza** je serija sinteznih postopkov, ki jih vodimo tako, da prednostno nastajajo optično čiste spojine. To lahko dosežemo preko uporabe in nadzora ustreznih substratov, reagentov ali katalizatorjev. Če je nastanek novega kiralnega centra pogojen s kiralnostjo, ki je že prisotna na substratu, gre za pristop asimetrične sinteze nadzorovane s substratom. Ena izmed pomembnejših strategij za doseganje nadzora nad substratom je uporaba kiralnih pomožnikov. To so enantiomerno čiste molekule, ki jih pripnemo na molekule substrata in omogočajo, da nadaljnje stopnje reakcije tečejo v smeri nastanka samo enega izmed enantiomerov, po končani reakciji pa jih odstranimo, tako da niso del končne strukture. Pri asimetrični sintezi nadzorovani z reagentom je nastanek novega stereogenega centra pogojen s kiralnostjo prisotno na reagentu. Zadnji izmed pristopov je stereoselektivna sinteza nadzorovana s kiralnim katalizatorjem, pri katerem na nastanek novega stereogenega centra vpliva dodatek majhne količine katalizatorja, ki uravnava stereokemijo reakcije. **Kiralna ločba enantiomerov iz racemne zmesi** je vrsta pristopov s katerimi, kot že samo ime pove, pridobimo posamezni enantiomer iz zmesi dveh enantiomerov. Obstaja več različnih metod, ki temeljijo na fizikalnih, kemijskih ali bioloških tehnikah: kristalizaciji, tekočinski in plinski kromatografiji, kapilarni elektroforezi in drugih. Pri našem delu bomo uporabili pristop iz te skupine – za ločbo enantiomerov iz racemne zmesi bomo uporabili metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti s kiralnimi stacionarnimi fazami (21).

1.4.3 Kromatografija

Kromatografija je skupina separacijskih in preparativnih tehnik, ki se večinoma uporablja v kemijski analizi. Njena glavna odlika je, da v enem koraku ločimo zmes spojin na posamezne komponente in istočasno izvemo informacijo o kvantiteti posamezne komponente. Prvi je kromatografijo kot učinkovito metodo za ločevanje uporabil ruski botanik Cvet, ki je v začetku 20. stoletja z uporabo preproste kolonske kromatografije

ločeval rastlinske pigmente. Od takrat se je kromatografija močno razvila in postala zelo vsestranska tehnika za ločevanje plinov in hlapnih snovi (plinska kromatografija) ter tekočih snovi in snovi zelo velikih molekulskih mas (tekočinska kromatografija). Mehanistično lahko kromatografijo predstavimo kot proces ločevanja, ki je dosežen s porazdeljevanjem komponent zmesi med dvema fazama, stacionarno in mobilno fazo. Komponente, ki se prednostno zadržujejo na stacionarni fazi se v sistemu zadržijo dlje od tistih, ki so selektivno porazdeljene v mobilni fazi. Posledično se posamezne komponente eluirajo iz sistema ob različnih časih in na ta način je dosežena ločba (23).

Ena izmed oblik tekočinske kromatografije, ki jo bomo uporabljali tudi pri našem delu je **Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti** (HPLC oz. »High performance liquid chromatography«), ki je v osnovi zelo izpopolnjena oblika kolonske tekočinske kromatografije (24). Glede na mehanizem zadrževanja spojin na stacionarni fazi, ločimo več vrst tekočinske kromatografije: ionsko izmenjevalno, adsorpcijsko, gelsko izključitveno, kiralno, afinitetno in porazdelitveno, glede na polarnost stacionarne faze pa slednjo delimo naprej še na normalno fazno in reverzno fazno (25). Pri normalno fazni gre za proces elucije, pri katerem je stacionarna faza bolj polarna od mobilne faze, pri reverzno fazni pa je ravno obratno mobilna faza bolj polarna od stacionarne faze (26).

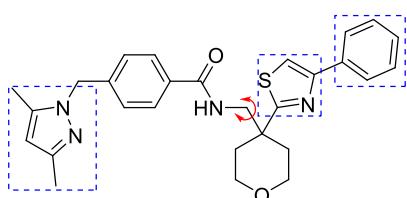
1.4.4 Kiralne stacionarne faze

Ta vrsta stacionarnih faz predstavlja kiralno okolje, v katerem je mogoče ločevati enantiomere. Za najuspešnejši tip kiralne stacionarne faze tako za analitske kot preparativne ločbe veljajo **kiralne stacionarne faze na osnovi polisaharidov**. Fazo predstavlja silikagel obložen z derivati polisaharidov, od katerih sta najpomembnejši in najpogosteje uporabljeni tris-3,5-dimetilfenilkarbamoil celuloza in amiloza. Pomemben napredok predstavlja tudi kiralne stacionarne faze z imobiliziranimi polisaharidi, ki jih v primerjavi z obloženimi polisaharidi odlikuje večja stabilnost, možnost uporabe z raznolikimi organskimi topili (kar razširi obseg njihove uporabe) in enostavna regeneracija kolone. Razvoj tovrstnih stacionarnih faz je z vpeljavo imobiliziranih oblik omogočil uporabo kiralnih selektorjev kot so 3-klorofenilkarbamoil amiloza ter tris-3,5-diklorofenilkarbamoil celuloza in amiloza, ki jih s pristopom oblaganja kiralne stacionarne faze ni bilo moč uporabiti. Naslednji tip so **kiralne stacionarne faze na osnovi makrocikličnih antibiotikov**. Zanje je značilna velika strukturna raznolikost, vsebujejo različne funkcionalne skupine in številne stereogene centre zaradi česar so primerne za

ločevanje raznovrstnih enantiomerov. Najpomembnejše so stacionarne faze osnovane na vankomicinu, teikoplaninu in ristocetinu A. **Kiralne stacionarne faze na osnovi proteinov** se je predvsem v preteklosti veliko uporabljalo za analizo kiralnih zdravilnih učinkovin v bioloških tekočinah. Najpomembnejše faze temeljijo na primer na človeškem serumskem albuminu in α 1-kislem glikoproteinu. Glavna slabost tovrstnih faz je velika občutljivost na spremembe eksperimentalnih pogojev, ki močno vplivajo na njihovo enantioselektivno kapaciteto. Ene izmed pomembnejših so tudi **kiralne stacionarne faze na osnovi ciklodekstrinov**. Ciklodekstrini so ciklični oligosaharidi, ki vsebujejo 6, 7 ali 8 molekul glukoze (α -, β - oz. γ -ciklodekstrini) povezanih v obroč, ki ima v notranjem delu hidrofobno votlino, navzven pa je zaradi hidroksilnih skupin hidrofilen. Ponujajo možnost različnih modifikacij na osnovnih obročih in se jih lahko uporablja tako za normalno fazno kot za reverzno fazno kromatografijo. Poleg omenjenih poznamo še **Pirkle-jev tip kiralnih stacionarnih faz** imenovan tudi ščetkasti tip, za katerega so značilne manjše kiralne molekule, ki so preko podaljškov vezane na nosilec. Ta tip odlikujejo kemijska in temperaturna inertnost, kompatibilnost s katero koli mobilno fazo in možnost zasuka vrstnega reda elucije (22).

2. NAČRT DELA

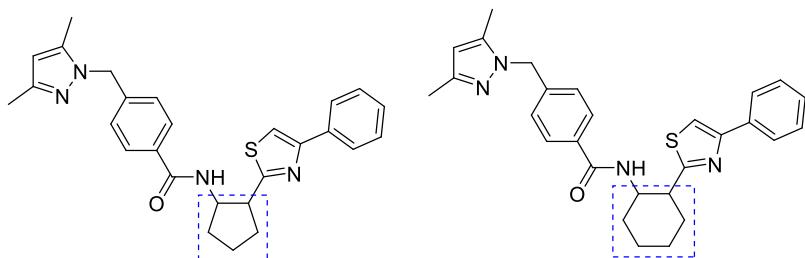
V prvem delu našega eksperimentalnega dela bomo poskusili optimizirati spojino **I**, tetrahidropiranski derivat, ki je bil eden od zadetkov pri rešetanju visoke zmogljivosti, izvedenem v družbi GlaxoSmithKline (GSK).



Slika 6: Spojina **I**

V sklopu projekta z omenjeno družbo, so na katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo že pripravili več analogov spojine **I**. Pri tem so se osredotočili na poskus izboljšave delovanja spojine preko menjave treh obročev, označenih z modrimi okvirji na sliki 6. Razen dveh analogov, katerih učinkovitost in stopnja citotoksičnosti sta bili primerljivi s spojino **I**, so se tovrstne modifikacije izkazale za neuspešne. Dodatno je raziskovalcem uspelo določiti tudi kristalno strukturo encima InhA v kompleksu s spojino **I**, ki nam bo v pomoč pri načrtovanju (ugotovili so, da v vezavnem mestu zavzame obliko črke U) (27).

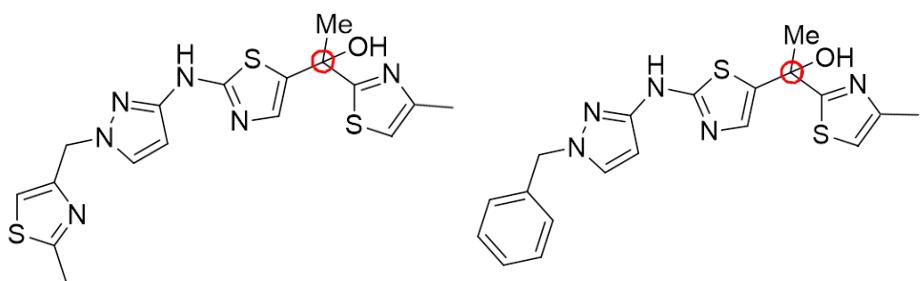
Na podlagi konformacije s katero se spojina **I** veže v vezavno mesto na encimu InhA in glede na dejstvo, da spremembe na označenih mestih ne prinesejo izboljšave, smo se odločili, da bomo molekulo v centralnem delu, kjer se nahaja prosto vrtljiva C-C vez (na sliki označena z vrtljivo puščico), rigidizirali, s čimer želimo doseči boljšo vezavno energijo v vezavnem mestu InhA. Tako bomo tetrahidropiran nadomestili s 5- oz. 6-členskim alkilnim obročem, ki bo direktno povezal sosednja C atoma, na mestu, kjer se pri spojini **I** nahaja prosto vrtljiva vez (Slika 7).



Slika 7: Spojini z rigidiziranim osrednjim delom

Končnima spojinama bodo na encimu InhA določili vrednost IC₅₀.

V drugem delu bomo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti, z uporabo kiralnih kolon, poskusili razviti in optimizirati metodo za ločevanje in zbiranje enantiomerov dveh že sintetiziranih zaviralcev encima InhA (slika 8), ki so jih pripravili na katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani, z namenom, da se z nadaljnimi analizami ugotovi, če in kateri izmed enantiomerov se bolje prilega v vezavno mesto in je močnejši zaviralec.



Slika 8: Direktna zaviralca InhA, sintetizirana na katedri za farmacevtsko kemijo.

Rdeče sta obkrožena kiralna centra.

Z ločbo bomo začeli na analitskih kolonah, na katerih bomo preizkusili ali je enantiomera posameznih spojin sploh možno ločiti, v primeru, da nam ločba uspe pa bomo prešli na semi-preparativno kolono, na kateri bomo po optimizaciji ločbe izvedli še zbiranje posameznih enantiomerov, ki jih bomo poslali v nadaljnja testiranja.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

Uporabljali smo topila in reagente proizvajalcev Sigma, Fluka, Merck in Acros.

Obdelava NMR spektrov, risanje spojin in določanje nomenklature: za risanje spojin in njihovo poimenovanje smo uporabljali programsko opremo ChemBioDraw Ultra 11.0 (CambridgeSoft).

3.2 Metode

- **Kromatografske metode**

Tankoplastna kromatografija: za tankoplastno kromatografijo (TLC) smo uporabljali plošče TLC Silica gel 60 F₂₅₄ z 0,20 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu dimenzijs 20 × 20 cm (proizvajalec: Merck) in različne mobilne faze katerih sestava je navedena pri posameznih stopnjah sinteze. Spojine smo na TLC ploščah detektirali z UV svetlobo ($\lambda = 254$ nm in $\lambda = 366$ nm) in orositvenima reagentoma ninhidrinom in FeCl₃.

Kolonska kromatografija: produkte smo čistili s »flash« kolonsko kromatografijo. Za stacionarno fazo smo uporabili silikagel 60 z velikostjo delcev 0,04–0,063 mm (proizvajalec: Merck) in različne mobilne faze katerih sestave so navedene pri posameznih stopnjah sinteze in čiščenja.

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC): ločevanje in zbiranje enantiomerov v drugem delu našega eksperimentalnega dela smo izvedli na sistemu Agilent Technologies HP 1100 z UV-VIS detektorjem G1365B (220 in 254 nm) ter zbiralnim modulom G1364A proizvajalca Agilent. Uporabljene analitske in semi-preparativne kolone, mobilne faze in pogoji ločbe ter zbiranja so navedeni pri opisu posameznih stopenj v 4. poglavju.

- **Spektroskopske metode**

Jedrska magnetna resonanca (NMR): NMR spektre so posneti na spektrometu Bruker Avance III na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani, ¹H spektri so bili posneti pri 400 MHz, ¹³C spektri pa pri 100 MHz. Vzorce so raztopili v devteriranih topilih CDCl₃ in DMSO-d₆ z internim standardom TMS. Za obdelavo NMR spektrov smo uporabljali računalniški program MestReNova verzija 6.0.2 (Proizvajalec: Mestrelab Research).

Masna spektrometrija (MS): Masne spektri so posneli na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani na masnem spektrometru expression L CMS proizvajalca Advion z ESI tehniko. HR-MS spektra in masna spektra končnih spojin so posneli na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani na masnem spektrometru Q-TOF Premier proizvajalca Waters-Micromass z ESI tehniko.

- **Določanje tališča**

Določanje temperature tališč spojin smo izvedli na mikroskopu Cambridge instruments z grelno mizico Reichert in niso korigirana*.

*Korigirano temperaturo tališča dobimo, če pred določanjem tališč vzorcev izvedemo kalibracijo naprave z referenčno spojino, ki ima znano temperaturo tališča. V primeru, da se izmerjena temperatura tališča referenčne spojine razlikuje od njene teoretične (znane) vrednosti, moramo ta odstop upoštevati pri rezultatih za vzorce in sicer tako, da ga prištejemo ali odštejemo njihovim izmerjenim vrednostim.

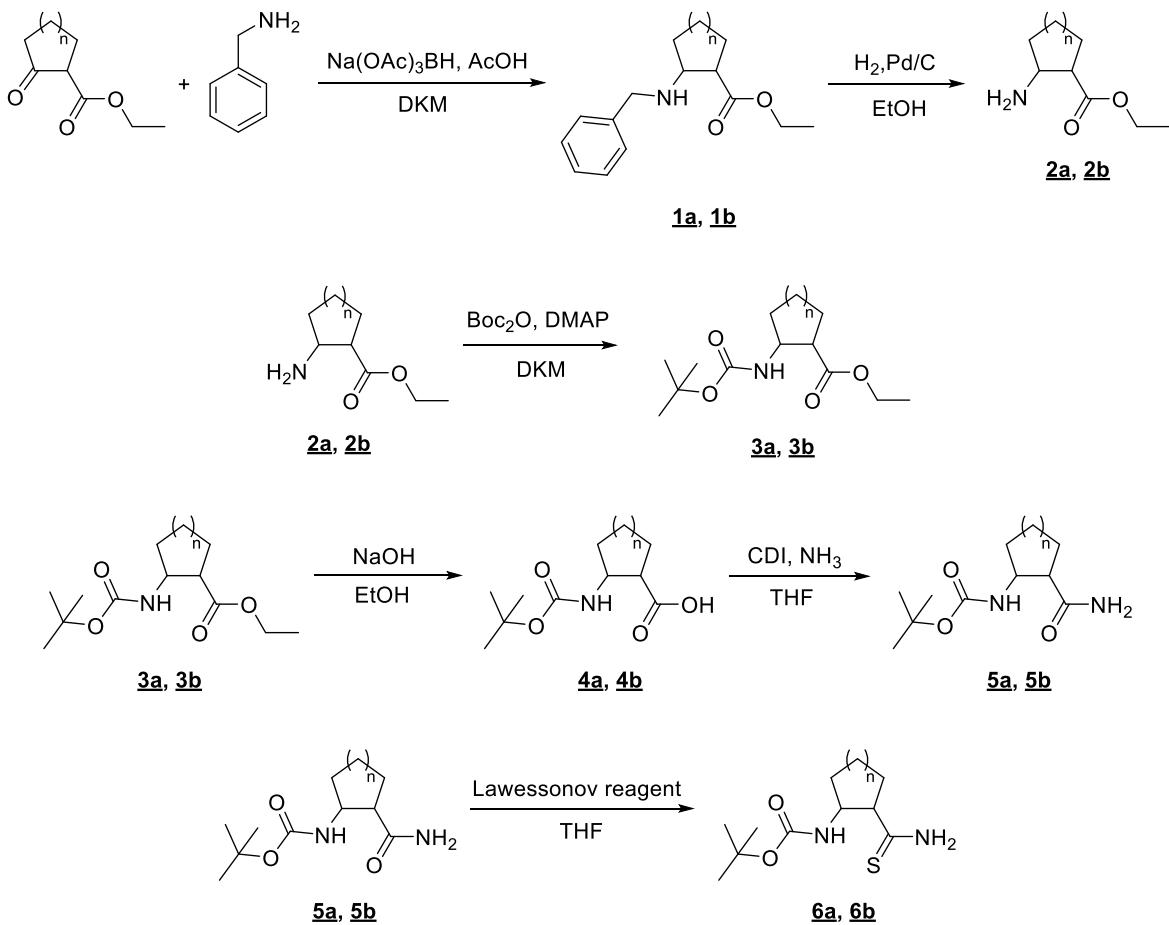
4. EKSPERIMENTALNI DEL

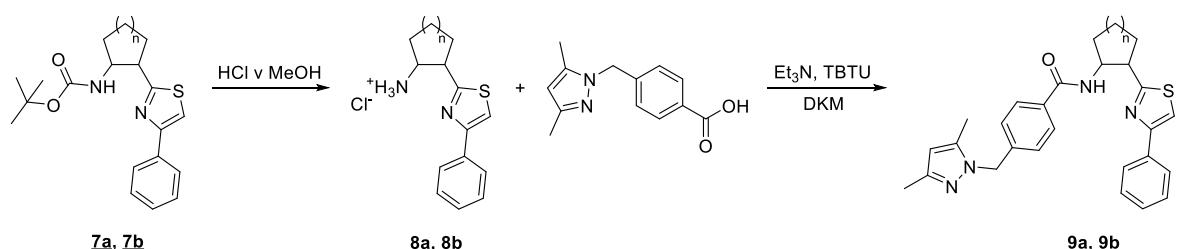
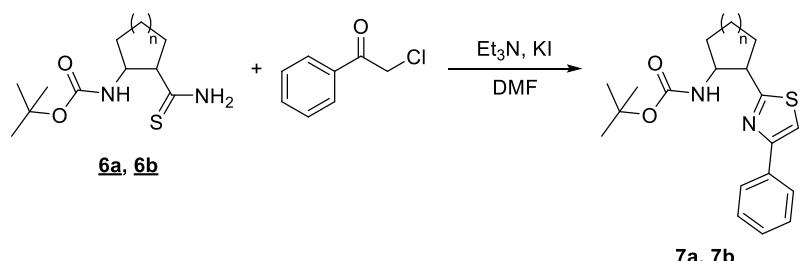
4.1 Sinteza 4-((3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)metil)-*N*-(2-(4-feniltiazol-2-il)ciklopentil)benzamida (9a) in 4-((3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)metil)-*N*-(2-(4-feniltiazol-2-il)cikloheksil)benzamida (9b)

Reakcijske sheme:

n = 1: ciklopentanski skelet (vsebujejo ga spojine označene z Xa)

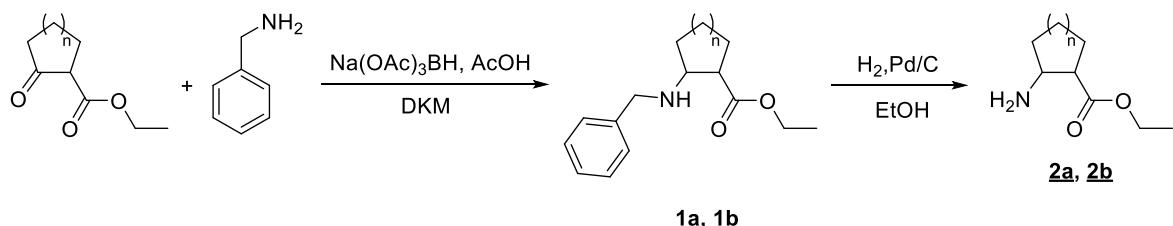
n = 2: cikloheksanski skelet (vsebujejo za spojine označene z Xb)





Sinteza etil 2-aminociklopantan-1-karboksilata (2a) in etil 2-aminocikloheksan-1-karboksilata (2b)

Reakcija:



Sinteza etil 2-(benzilamino)ciklopantan-1-karboksilata (1a):

1. Poskus: V bučko natehtamo etil 2-oksociklopantan-1-karboksilat (3,00 g, 19,21 mmol) in ekvimolarno količino benzilamina (2,06 g) ter raztopimo v 20 mL DKM. Ob mešanju na sobni temperaturi raztopini dodamo ekvimolarno količino AcOH (1,10 mL) in na koncu 2,5 ekvivalenta $\text{Na(OAc)}_3\text{BH}$ (10,18 g, 48,03 mmol). Bučko prepipamo z argonom in v argonovi atmosferi in ob mešanju pustimo na sobni temperaturi reagirati čez noč. Naslednji dan k reakcijski zmesi dodamo 30 mL prečiščene vode in počakamo do prenehanja izhajanja plina – zreagira prebitni $\text{Na(OAc)}_3\text{BH}$. Vodno fazo z 1 M NaOH naalkalimo do $\text{pH} = 10$, fazi ločimo in organsko fazo spiramo s prečiščeno vodo (1×20 mL) in nasičeno raztopimo NaHCO_3 (1×20 mL) ter sušimo nad Na_2SO_4 . Uparimo topilo pod znižanim tlakom in dobimo rumen, smolnat produkt ($m = 4,78$ g). Izvedemo tankoplastno kromatografijo, ki pokaže, da reakcija ni potekla do konca, nastanejo tudi stranski produkti, zato reakcijo izvedemo ponovno.

2. Poskus: Zgornjo reakcijo ponovimo z 2,00 g etil 2-oksociklopantan-1-karboksilata (12,81 mmol), z razliko, da uporabimo 2 ekvivalenta benzilamina (2,74 g, 25,62 mmol), ostale količine in pogoji ostanejo enaki kot pri 1. poskusu. Izvedemo tankoplastno kromatografijo, ki pokaže, da je nastalo manj stranskih produktov, zato izvedemo čiščenje s kolonsko kromatografijo ($\text{MF} = \text{EtOAc} : \text{heksan} = 1 : 4$). Izoliramo 2 potencialna produkta, ki jima določimo strukturo z $^1\text{H-NMR}$ in $^{13}\text{C-NMR}$ spektroskopijo; izkaže se, da je en izmed njiju naš produkt **1a** (etil 2-(benzilamino)ciklopantan-1-karboksilat, $m=1,77$ g), drugi pa stranski produkt z nenasicišeno vezjo v ciklopentanskem obroču (enamin); etil 2-(benzilamino)ciklopent-1-en-1-karboksilat ($m=0,122$ g).

Poskus odščite in redukcije nenasičene vezi:

1. Poskus: Produkta zgornje reakcije (2. poskus) združimo v bučko; 1,77 g spojine **1a** ter 0,122 g etil 2-(benzilamino)ciklopent-1-en-1-karboksilata, celokupna masa = 1,892 g. Produkta raztopimo v 25 mL EtOH in bučko prepihamo z argonom. V reakcijsko zmes dodamo Pd/C (10 % celokupne mase produktov = 0,189 g), jo prepihamo z vodikom in v vodikovi atmosferi pustimo reagirati čez noč. Naslednji dan bučko prepihamo z argonom, da ustavimo reakcijo in izvedemo tankoplastno kromatografijo s katero ugotovimo, da reakcija ne poteče v zadostni meri. Zato Pd/C filtriramo z odsesavanjem in uparimo topilo. Reakcijsko zmes uporabimo v naslednjem poskusu.

2. Poskus: Reakcijsko zmes (**1a** + etil 2-(benzilamino)ciklopent-1-en-1-karboksilat, celokupna množina = 7,66 mmol) iz prejšnjega poskusa raztopimo v 10 mL AcOH. Vzporedno *in situ* pripravimo Na(OAc)₃BH; Ob mešanju na vodni kopeli (T = 15 °C) v bučko odmerimo 12 mL AcOH in počasi dodamo 2,8 ekvivalenta NaBH₄ (0,816 g, 21,60 mmol) ter pustimo reagirati do prenehanja izhajanja plina. Po 1 uri nastane gosta bela zmes, ki ji dodamo raztopino reakcijske zmesi v AcOH. Pustimo reagirati čez noč in ker do naslednjega dne reakcija ne poteče do konca (preverimo s tankoplastno kromatografijo), jo pustimo še 2 dni. Po 3 dneh glede na TLC analizo reakcija poteče do konca, nato pod znižanim tlakom deloma uparimo AcOH.

Ker je reakcija po pripravi Na(OAc)₃BH *in situ* uspešna, ponovimo reakcijo z izhodno spojino: Ob mešanju na vodni kopeli (T = 15 °C, magnetno mešalo) v bučko odmerimo 50 ml AcOH v katero počasi dodamo 2,8 ekvivalenta NaBH₄ in počakamo do prenehanja izhajanja plina. V reakcijsko zmes nato dodamo 2 ekvivalenta benzilamina (7 mL, 64,03 mmol) in izhodno spojino – etil 2-oksociklopentan-1-karboksilat (5,00 g, 32,01 mmol). Ob mešanju na sobni temperaturi pustimo reagirati 3 dni. Reakcija poteče do konca, pod znižanim tlakom deloma uparimo AcOH.

Obe reakcijski zmesi združimo, ju prenesemo v 600 mL čašo in izvedemo modificirano ekstrakcijo; v čašo dodamo 150 mL EtOAc in 150 mL prečiščene vode. Ob mešanju na magnetnem mešalu počasi dodajamo Na₂CO₃ do pH vodne faze = 10. Vsebino čaše prenesemo v ljiljan, fazi ločimo in organsko fazo spiramo z nasičeno vodno raztopino NaCl in sušimo nad Na₂SO₄ ter uparimo EtOAc. Dobimo 11,09 g rjavega, smolnatega produkta, ki ga ne čistimo, temveč surov produkt uporabimo direktno v naslednji stopnji.

Izkoristek: 100 %, **Rf:** 0,34 (EtOAc : heksan = 1 : 2)

Sinteza etil 2-(benzilamino)cikloheksan-1-karboksilata (**1b**):

Etil 2-oksocikloheksan-1-karboksilat (3,00 g, 17,63 mmol) in ekvimolarno količino benzilamina (1,89 g) raztopimo v 20 mL DKM. Ob mešanju na sobni temperaturi raztopini dodamo ekvimolarno količino AcOH (1,00 mL) in na koncu 2,5 ekvivalenta Na(OAc)₃BH (8,06 g, 44,08 mmol). Prepihamo z argonom in v argonovi atmosferi in ob mešanju pustimo na sobni temperaturi reagirati čez noč. Naslednji dan k reakcijski zmesi dodamo 30 mL prečiščene vode in počakamo do prenehanja izhajanja plina – zreagira prebitni Na(OAc)₃BH. Vodno fazo z 1 M NaOH naalkalimo do pH = 10, fazi ločimo in organsko fazo spiramo s prečiščeno vodo (1 × 20 mL) in nasičeno raztopimo NaHCO₃ (1 × 20 mL) ter sušimo nad Na₂SO₄. Uparimo topilo pod znižanim tlakom in dobimo rumen, smolnat produkt (m = 3,93 g), ki ga ne čistimo, temveč surov produkt uporabimo direktno v naslednji stopnji.

Izkoristek: 86 %, **Rf:** 0,51 (EtOAc : heksan = 1 : 2)

Sinteza etil 2-aminociklopantan-1-karboksilata (**2a**):

V bučki raztopimo spojino **1a** (11,09 g, 44,90 mmol) v 50 mL EtOH. Bučko zapremo s septo in prepihamo z argonom. Nato dodamo Pd/C (10 % mase spojine **1a** = 1,10 g) in bučko prepihamo z vodikom. V vodikovi atmosferi in ob mešanju na sobni temperaturi pustimo reagirati čez noč. Reakcija poteče, zato uparimo EtOH in dobimo 7,05 g rumenega, smolnatega produkta, ki ga brez čiščenja uporabimo v naslednji stopnji.

Izkoristek: 100 %, **Rf:** 0,00 (EtOAc : heksan = 1 : 2), **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆):**
δ (ppm) = 1,28 (m, 3H, CH₂-CH₃), 1,50–2,05 (m, 6H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 2,63 (m, 1H, CH₂-CH(CH)-CO), 3,25–3,65 (m, 1H, CH₂-CH(CH)-NH₂), 4,14 (m, 2H, CH₂-CH₃), 7,32 (m, 2H, -NH₂) **MS (ESI):** *m/z* = 158,15 (M + H)⁺, **Mr (izračunana):** 157,11, **Elementna sestava:** C₈H₁₅NO₂

Sinteza etil 2-aminocikloheksan-1-karboksilata (**2b**):

V bučki raztopimo 3,74 g spojine **1b** v brezvodnem EtOH (30 mL) in jo prepihamo z argonom. Dodamo Pd/C (10 % mase spojine **1b**; m = 0,374 g). Reakcijsko zmes prepihamo z vodikom in v vodikovi atmosferi pustimo ob mešanju pri sobni temperaturi reagirati čez noč. Naslednji dan ustavimo reakcijo – bučko prepihamo z argonom, s frito filtriramo Pd/C in pod znižanim tlakom uparimo EtOH. Reakcijsko zmes raztopimo v 30 mL Et₂O in spiramo z 2 M HCl (2 × 25 mL). Fazi ločimo in vodno fazo naalkalimo do pH = 11 (z 2 M NaOH) ter spiramo z EtOAc (2 × 30 mL). EtOAc uparimo pod znižanim tlakom in dobimo 1,53 g svetlo rumenega smolnatega produkta.

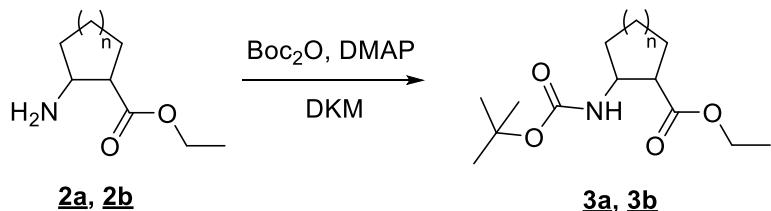
Izkoristek: 62,4 %, **Rf:** 0,09 (EtOAc : heksan = 1 : 2), **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆):**

δ (ppm) = 1,27 (t, 3H, CH₂-CH₃), 1,40–1,90 (m, 8H, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-), 2,03 (s, 2H, CH-NH₂), 2,54–2,60 (m, 1H, CH₂-CH(CH)-CO), 3,31 (m, 1H, CH₂-CH(CH)-NH₂), 4,15 (q, 2H, CH₂-CH₃), **MS (ESI):** *m/z* = 172,06 (M + H)⁺, **Mr (izračunana):** 171,13,

Elementna sestava: C₉H₁₇NO₂

Sinteza etil 2-((terc-butoksikarbonil)amino)ciklopantan-1-karboksilata (3a) in etil 2-((terc-butoksikarbonil)amino)cikloheksan-1-karboksilata (3b)

Reakcija:



Sinteza etil 2-((terc-butoksikarbonil)amino)ciklopantan-1-karboksilata (3a)

Spojino **2a** (7,05 g, 44,90 mmol) raztopimo v 80 mL DKM, dodamo 1,2 ekvivalenta Boc₂O (11,76 g, 53,88 mmol) in 30 pelet DMAP. Ob mešanju pri sobni temperaturi pustimo reagirati čez noč. Naslednji dan izvedemo ekstrakcijo; organsko fazo (DKM) spiramo z 10 % vodno raztopimo citronske kisline (2×75 mL), z nasičeno vodno raztopino NaCl (1×50 mL) ter sušimo nad Na₂SO₄. Uparimo topilo in dobimo 9,10 g smolnatega produkta svetlo rjave barve.

Izkoristek: 87 %, **Rf:** 0,59 (EtOAc : heksan = 1 : 2), **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm)** = 1,25–1,28 (m, 3H, CH₂-CH₃), 1,47 (s, 9H, O-(CH₃)₃), 1,52–2,05 (m, 6H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 2,95–3,03 (m, 1H, CH₂-CH(CH)-CO), 4,05–4,25 (m, 3H, CH₂-CH₃ in CH₂-CH(CH)-NH₂), 7,26 (m, 1H, -NH-), **MS (ESI) = m/z = 280,27 (M + Na)⁺, Mr (izračunana):** 257,16, **Elementna sestava:** C₁₃H₂₃NO₄

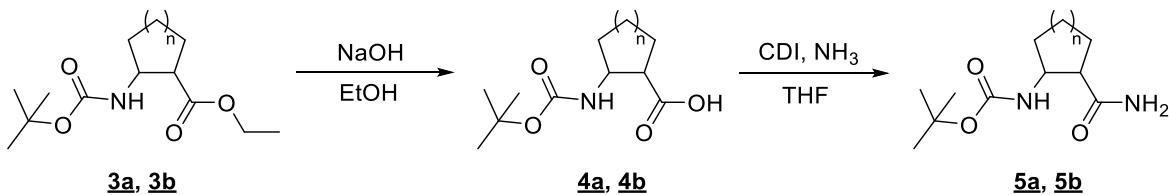
Sinteza etil 2-((terc-butoksikarbonil)amino)cikloheksan-1-karboksilata (3b)

Spojino **2b** (1,53 g, 8,9 mmol) raztopimo v 20 mL DKM, dodamo 1,2 ekvivalenta Boc₂O (2,33 g) in 10 pelet DMAP. Ob mešanju pri sobni temperaturi pustimo reagirati čez noč. Naslednji dan pri znižanem tlaku uparimo topilo in dobimo 2,40 g smolnatega produkta svetlo rjave barve.

Izkoristek: 100 %, **Rf:** 0,64 (EtOAc : heksan = 1 : 2), **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆):** δ (ppm) = 1,20–1,30 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂), 1,27 (t, 3H, J₁ = 6,8 Hz, J₂ = 7,2 Hz, CH₂-CH₃), 1,43 (s, 9H, O-(CH₃)₃), 1,55–2,05 (m, 6H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂), 2,76 (q, 1H, J₁ = 4,4 Hz, J₂ = 4,8 Hz, J₃ = 4,8 Hz, CH₂-CH(CH)-CO), 3,85 (m, 1H, CH₂-CH(CH)-NH₂), 4,12–4,18 (m, 2H, CH₂-CH₃) in 7,30 (s, 1H, -NH-), **MS (ESI) = m/z = 293,82 (M + Na)⁺**, **Mr (izračunana):** 271,18, **Elementna sestava:** C₁₄H₂₅NO₄

Sinteza *terc*-butil (2-karbamoilciklopentil)karbamata (5a) in *terc*-butil (2-karbamoilcikloheksil)karbamata (5b)

Reakcija:



Sinteza 2-((*terc*-butoksikarbonil)amino)ciklopantan-1-karboksilne kisline (4a):

Spojino **3a** (9,10 g, 39,04 mmol) raztopimo v 40 mL EtOH. Ob mešanju k reakcijski zmesi s kapalko počasi dodamo 5 ekvivalentov NaOH v obliki vodne raztopine (slednjo predhodno pripravimo tako, da ustrezno količino NaOH (7,81 g, 0,195 mol) raztopimo v 50 mL prečiščene vode) in ob mešanju na sobni temperaturi pustimo reagirati čez noč. Do naslednjega dne reakcija poteče, pod znižanim tlakom uparimo EtOH. Preostalo vodno fazo ob mešanju na ledeni kopeli z 10 % vodno raztopino citronske kisline nakisamo do pH = 5. Produkt se deloma obori v obliki oranžne lepljive smole, ki jo filtriramo z odsesavanjem. Od nastavka za filtriranje jo ločimo s spiranjem z EtOAc (predhodno poskusimo s spatulo, vendar je produkt preveč lepljiv). Preostali del produkta iz vodne faze dobimo z ekstrakcijo z EtOAc (4×40 mL), nato organski fazi združimo ter spiramo z nasičeno vodno raztopino NaCl (1×50 mL) in sušimo nad Na₂SO₄. EtOAc uparimo pod znižanim tlakom in dobimo produkt v obliki oranžne viskozne smole (m = 5,50 g), ki ga uporabimo direktno v naslednji reakciji.

Izkoristek: 62 %, **Rf:** 0,00 (EtOAc : heksan = 1 : 2); 0,36 (EtOAc : heksan = 1 : 2 + AcOH)

Sinteza 2-((*terc*-butoksikarbonil)amino)cikloheksan-1-karboksilne kisline (4b):

Spojino **3b** (2,40 g, 8,86 mmol) raztopimo v 10 mL EtOH. Ob mešanju k reakcijski zmesi s kapalko počasi dodamo 5 ekvivalentov NaOH v obliki vodne raztopine (predhodno pripravimo tako, da ustrezno količino NaOH (1,77 g, 44,3 mmol) raztopimo v 12 mL prečiščene vode) in ob mešanju na sobni temperaturi pustimo reagirati 2 uri. S

tankoplastno kromatografijo preverimo potek reakcije; ker reakcija ne poteče do konca, jo pustimo reagirati čez noč. Do naslednjega dne reakcija poteče, zato pod znižanim tlakom uparimo EtOH in k preostali vodni fazi dodamo 10 mL prečiščene vode ter jo ob mešanju na ledeni kopeli z 10 % vodno raztopino citronske kisline nakisamo do pH = 5. Izobori se rjavkast smolnat produkt. Ko ga posušimo, dobimo 1,87 g trdnega, steklastega produkta rumenkaste barve, ki ga uporabimo direktno v naslednji stopnji.

Izkoristek: 87 %, **Rf:** 0,44 (EtOAc : heksan = 1 : 2), **T_{tališče}:** 105–111 °C

Sinteza *terc*-butil (2-karbamoilciklopentil)karbamata (**5a**):

Spojino **4a** (5,50 g, 24,02 mmol) raztopimo v 30 mL brezvodnega THF po predhodnem preprihovanju bučke z argonom. Nato dodamo 1,5 ekvivalenta CDI (5,84 g, 36,03 mmol) in ob mešanju na sobni temperaturi pustimo, da poteka aktivacija 1 uro. Po 1 uri dodamo 25 % vodno raztopino NH₃ (11,72 mL) in pri enakih pogojih pustimo reagirati čez noč. Naslednji dan uparimo topilo pri znižanem tlaku in izvedemo ekstrakcijo; dodamo 150 mL EtOAc in spiramo z 0,5 M vodno raztopino NaOH (2 × 80 mL). Uparimo EtOAc in dobimo 4,17 g trdnega produkta svetlo oranžne barve.

Izkoristek: 76 %, **Rf:** 0,00 (EtOAc : heksan = 1 : 2), **¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm)** = 1,40 (s, 9H, O-(CH₃)₃), 1,46 – 1,56 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 1,63–1,85 (m, 4H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 2,91 (q, 1H, J₁ = 7,6 Hz, J₂ = 8,0 Hz, J₃ = 7,6 Hz, CH₂-CH(CH)-CO), 4,06 (m, 1H, CH₂-CH(CH)-NH₂), 7,06 (s, 2H, -CO-NH₂), 7,66 (s, 1H, -NH-), **MS (ESI):** m/z = 251,25 (M + Na)⁺, **Mr (izračunana):** 228,15, **Elementna sestava:** C₁₂H₂₂N₂O₃, **T_{tališče}:** 99–131 °C

Sinteza *terc*-butil (2-karbamoilcikloheksil)karbamata (**5b**):

Spojino **4b** (1,00 g, 4,12 mmol) raztopimo v 10 mL brezvodnega THF po predhodnem preprihavanju bučke z argonom. Nato dodamo 1,5 ekvivalenta CDI (1,00 g, 6,17 mmol) in ob mešanju na sobni temperaturi pustimo, da poteka aktivacija 1 uro. Po 1 uri dodamo 25 % vodno raztopino NH₃ (2,01 mL) in pri enakih pogojih pustimo reagirati čez noč. Naslednji dan uparimo topilo pri znižanem tlaku in izvedemo ekstrakcijo; dodamo 80 mL

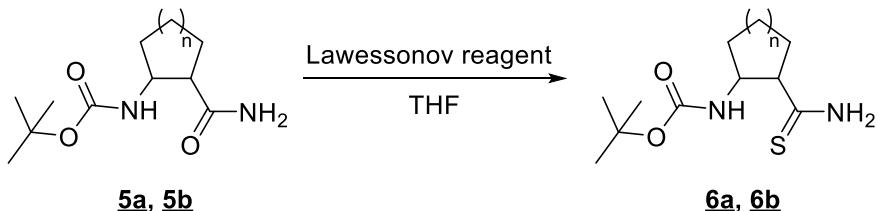
EtOAc in spiramo z 0,5 M NaOH (aq) (2×50 mL). Uparimo EtOAc pod znižanim tlakom in dobimo 0,81 g produkta v obliki belega praška.

Izkoristek: 81 %, **Rf:** 0,10 (EtOAc : heksan = 1 : 2), **$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):** δ (ppm) = 1,22–1,97 (m, 8H, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-), 1,43 (s, 9H, O-(CH₃)₃), 2,65 (m, 1H, CH₂-CH(CH)-CO), 3,88 (m, 1H, CH₂-CH(CH)-NH₂), 5,34–5,87 (m, 2H, -CO-NH₂), 7,27 (s, 1H, -NH-), **MS (ESI):** m/z = 264,84 ($\text{M} + \text{Na}$)⁺, **Mr (izračunana):** 242,16, **Elementna sestava:** C₁₂H₂₂N₂O₃, T_{tališče}: 87–140 °C

* Sintezo spojine **5b** ponovimo s preostankom spojine **4b** (0,87 g, 3,57 mmol) po enakem postopku in dobimo dodatnih 0,76 g produkta. Celokupna količina sintetizirane spojine **5b**; 1,57 g

Sinteză *terc*-butil (2-karbamotioilciklopentil)karbamata (6a) și *terc*-butil (2-karbamotioilcikloheksil)karbamata (6b)

Reakcija:



Sinteza *terc*-butil (2-karbamotioilciklopentil)karbamata (6a)

V bučko natehtamo spojino **5a** (1,00 g, 4,39 mmol), jo zapremo s septo in prepihamo z argonom. Pod brezvodnimi pogoji dodamo 30 mL brezvodnega THF in počakamo, da se izhodna spojina (**5a**) ob mešanju na magnetnem mešalu raztopi. Nato dodamo 0,7 ekvivalenta Lawessonovega reagenta (1,24 g, 3,07 mmol), kar je 1,4-kratni prebitek glede na izhodno spojino (Lawessonov reagent reagira z izhodno spojino v razmerju 1 : 2). Ob mešanju na sobni temperaturi v argonovi atmosferi, pustimo reagirati čez noč. Naslednji dan uparimo THF in izvedemo ekstrakcijo; reakcijsko zmes raztopimo v 70 mL EtOAc in spiramo z nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (2 × 50 mL) ter nasičeno vodno raztopino NaCl (40 mL) in sušimo nad Na₂SO₄. Uparimo EtOAc in dobimo 1,25 g trdnega produkta oranžne barve – pred čiščenjem. Produkt čistimo s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc : heksan = 2 : 1) in dobimo 0,69 g spojine **6a**, ki je v trdni obliki, svetlo rumene barve.

Izkoristek: 64 %, **Rf:** 0,55 (EtOAc : heksan = 2 : 1), **¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 1,41 (m, 9H, O-(CH₃)₃), 1,53–2,04 (m, 6H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 3,05–3,35 (m, 1H, CH₂-CH(CH)-CO), 4,10 (m, 1H, CH₂-CH(CH)-NH₂), 7,35 (m, 1H, -NH-), 8,50–8,77 (m, 2H, -CS-NH₂), **MS (ESI):** *m/z* = 266,87 (M + Na)⁺, **Mr (izračunana):** 244,12, **Elementna sestava:** C₁₁H₂₀N₂O₂S, T_{tališće}: 121–162 °C

Sinteza *terc*-butil (2-karbamotioilcikloheksil)karbamata (6b)

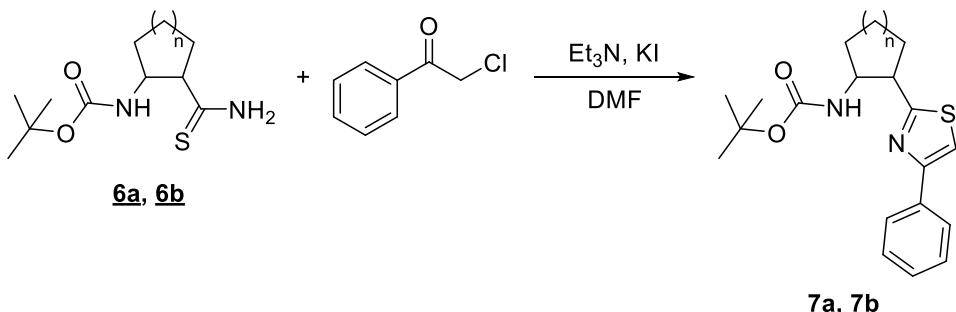
V bučko natehtamo spojino **5b** (1,00 g, 4,13 mmol), jo zapremo s septo in prepihamo z argonom. Pod brezvodnimi pogoji dodamo 30 mL brezvodnega THF in počakamo, da se izhodna spojina (**5b**) ob mešanju na magnetnem mešalu raztopi. Nato dodamo 0,7

ekvivalenta Lawessonovega reagenta (1,17 g, 2,89 mmol), kar je 1,4-kratni prebitek glede na izhodno spojino (Lawessonov reagent reagira z izhodno spojino v razmerju 1 : 2). Ob mešanju na sobni temperaturi pod argonom, pustimo reagirati čez noč. Naslednji dan uparimo THF in izvedemo ekstrakcijo; reakcijsko zmes raztopimo v 70 mL EtOAc in spiramo z nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (2 × 50 mL) ter nasičeno vodno raztopino NaCl (40 mL) in sušimo nad Na₂SO₄. Uparimo EtOAc in dobimo 1,08 g trdnega produkta svetlo rumene barve – pred čiščenjem. Produkt čistimo s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc : heksan = 2 : 1) in dobimo 0,38 g spojine **6b**, ki je v obliki belega praška.

Izkoristek: 36 %, **Rf:** 0,56 (EtOAc : heksan = 2 : 1), **¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 1,21–1,36 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-), 1,40 (s, 9H, O-(CH₃)₃), 1,48 – 1,98 (m, 6H, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-), 2,91 (m, 1H, CH₂-CH(CH)-CO), 4,05 (m, 1H, CH₂-CH(CH)-NH₂), 8,54 (s, 1H, -CO-NH-), 8,71 (s, 2H, -CS-NH₂), **MS (ESI):** *m/z* = 280,89 (M + Na)⁺, **Mr (izračunana):** 258,14, **Elementna sestava:** C₁₂H₂₂N₂O₂S, T_{tališče}: 179–183 °C

Sinteza *terc*-butil (2-(4-feniltiazol-2-il)ciklopentil)karbamata (7a) in *terc*-butil (2-(4-feniltiazol-2-il)cikloheksil)karbamata (7b)

Reakcija:



Sinteza *terc*-butil (2-(4-feniltiazol-2-il)ciklopentil)karbamata (7a)

Spojino **6a** (0,69 g, 2,83 mmol) raztopimo v polovičnem volumnu DMF (10 mL, celokupni volumen 20 mL). Ob mešanju na magnetnem mešalu pri sobni temperaturi dodamo 1,5 ekvivalenta Et₃N (591 µL, 4,24 mmol). Vzporedno pripravimo raztopino 2-kloroacetofenona (460 mg, 2,97 mmol, 1,05 ekv.) v drugi polovici volumna DMF (10 mL), ki jo počasi dodamo k reakcijski zmesi. Ob mešanju na sobni temperaturi pustimo reagirati čez noč. Naslednji dan preverimo potek reakcije s tankoplastno kromatografijo in ker reakcija ne poteče do konca v reakcijsko zmes dodamo katalitično količino KI (\approx 50 mg) in pustimo reagirati dodaten dan. 1 dan po dodatku KI reakcija poteče, zato pri znižanem tlaku uparimo topilo in izvedemo ekstrakcijo; reakcijsko zmes raztopimo v EtOAc (60 mL) in spiramo s prečiščeno vodo (1 \times 40 mL), s 5 % raztopino citronske kisline (1 \times 30 mL) ter z nasičeno vodno raztopino NaCl (1 \times 40 mL) in sušimo nad Na₂SO₄. Nato uparimo EtOAc in izvedemo čiščenje s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc : heksan = 1 : 9), pri kateri zaradi slabe topnosti reakcijske zmesi v mobilni fazi uporabimo suhi nanos (reak. zmes raztopimo v DKM, dodamo 2 žlici silikagela in pod znižanim tlakom uparimo topilo). Izoliramo 296 mg produkta, ki je v obliki rumenega praška.

Izkoristek: 30 %, **Rf:** 0,57 (EtOAc : heksan = 1 : 2), **$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):** δ (ppm) = 1,38 (m, 9H, O-(CH₃)₃), 1,80–2,58 (m, 6H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 3,33 (m, 1H, CH₂-CH(CH)-CO), 4,09 (m, 1H, CH₂-CH(CH)-NH₂), 7,36 (s, 1H, -S-CH-C (tiazol)), 7,38–7,43 (m, 3H, Ar-H), 7,88–7,95 (m, 3H, Ar-H in -NH-) **MS (ESI):** m/z = 367,09 (M + Na)⁺, **Mr (izračunana):** 344,16, **Elementna sestava:** C₁₉H₂₄N₂O₂S, **T_{ališće:}** 83–86 °C

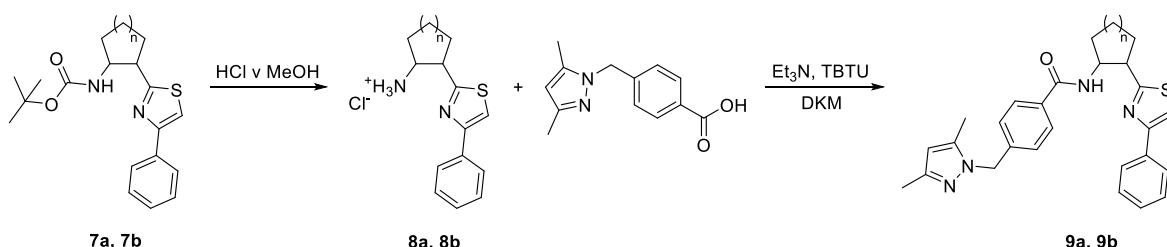
Sinteza *terc*-butil (2-(4-feniltiazol-2-il)cikloheksil)karbamata (**7b**)

Spojino **6b** (0,38 g, 1,47 mmol) raztopimo v polovičnem volumnu DMF (10 mL, celokupni volumen 20 mL). Ob mešanju na magnetnem mešalu pri sobni temperaturi dodamo 1,5 ekvivalenta Et₃N (308 µL, 2,21 mmol). Vzporedno pripravimo raztopino 2-kloroacetofenona (239 mg, 1,55 mmol, 1,05 ekv.) v drugi polovici volumna DMF (10 mL), ki jo počasi dodamo k reakcijski zmesi. Na koncu dodamo katalitično količino KI (\approx 50 mg) in ob mešanju na magnetnem mešalu, pri sobni temperaturi, pustimo reagirati čez noč. Naslednji dan preverimo potek reakcije s tankoplastno kromatografijo in ker reakcija ne poteče do konca pustimo pri enakih pogojih reagirati dodaten dan. Reakcija po 2 dneh poteče, zato pod znižanim tlakom uparimo topilo in izvedemo ekstrakcijo; reakcijsko zmes raztopimo v EtOAc (60 mL), spiramo s prečiščeno vodo (1 \times 50 mL), nato s 5 % vodno raztopino citronske kisline (1 \times 50 mL) ter na koncu z nasičeno vodno raztopino NaCl (1 \times 50 mL) in sušimo nad Na₂SO₄. Uparimo EtOAc in dobimo 0,81 g produkta – pred čiščenjem. Izvedemo čiščenje s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc : heksan = 1 : 9) in dobimo 235 mg produkta, ki je v obliki svetlo rumenega praška.

Izkoristek: 45 %, **Rf:** 0,54 (EtOAc : heksan = 1 : 2), **¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm)** = 1,30–1,79 (m, 8H, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-), 1,45 (s, 9H, O-(CH₃)₃), 3,00–4,80 (m (razdrobljen signal), 2H, CH₂-CH(CH)-CO in CH₂-CH(CH)-NH₂), 7,32–7,99 (m, 7H, Ar-H in S-CH-C (tiazol) in -NH-), **MS (ESI):** *m/z* = 381,08 (M + Na)⁺, **Mr (izračunana):** 358,17, **Elementna sestava:** C₂₀H₂₆N₂O₂S, T_{tališče}: 73–82 °C

Sinteza 4-((3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)metil)-*N*-(2-(4-feniltiazol-2-il)ciklopentil)benzamida (9a**) in 4-((3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)metil)-*N*-(2-(4-feniltiazol-2-il)cikloheksil)benzamida (**9b**)**

Reakcija:



Sinteza 2-(4-feniltiazol-2-il)ciklopantan-1-aminijevega klorida (8a**)**

Z acetilkloridom pripravimo 2 M raztopino HCl v MeOH; v 50 mL bučko odmerimo 10 mL MeOH, nato ob mešanju na ledeni kopeli po kapljicah dodamo ustrezен volumen acetilklorida (1,422 mL, 20 mmol). Pripravljen volumen 2 M raztopine HCl v MeOH počasi dodamo v drugo bučko, v katero smo predhodno natehtali spojino **7a** (296 mg, 0,86 mmol). Ob mešanju pri sobni temperaturi pustimo reagirati 30 minut, nato pod znižanim tlakom uparimo MeOH in preostanek speremo z Et₂O. Topilo uparimo in dobimo 240 mg produkta **8a** s katerim gremo direktno v naslednjo stopnjo.

Izkoristek: 100 %, **Rf:** 0,00 (EtOAc : heksan = 1 : 2)

Sinteza 2-(4-feniltiazol-2-il)cikloheksan-1-aminijevega klorida (8b**)**

Z acetilkloridom pripravimo 2 M raztopino HCl v MeOH; v 50 mL bučko odmerimo 10 mL MeOH, nato ob mešanju na ledeni kopeli po kapljicah dodamo ustrezен volumen acetilklorida (1,422 mL, 20 mmol). Pripravljen volumen 2 M raztopine HCl v MeOH počasi dodamo v drugo bučko, v katero smo predhodno natehtali spojino **7b** (136 mg, 0,38 mmol). Ob mešanju pri sobni temperaturi pustimo reagirati 30 minut, nato pod znižanim tlakom uparimo MeOH in preostanek speremo z Et₂O ter topilo uparimo do konca. Dobimo 112 mg produkta **8b** s katerim gremo direktno v naslednjo stopnjo.

Izkoristek: 100 %, **Rf:** 0,00 (EtOAc : heksan = 1 : 2)

Sinteza 4-((3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)metil)-*N*-(2-(4-feniltiazol-2-il)ciklopentil)benzamida (9a**)**

Spojino **8a** (240 mg, 0,86 mmol) raztopimo v 15 mL DKM in v raztopino dodamo 3,8 ekvivalente Et₃N (450 µL, 3,25 mmol) ter pustimo mešati na magnetnem mešalu pri sobni temperaturi 30 minut. Nato dodamo 1,05 ekvivalenta 4-((3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)metil)benzojske kisline (210 mg, 0,91 mmol) in na koncu 2,1 ekvivalenta TBTU (600 mg, 1,87 mmol). Ob mešanju pri sobni temperaturi pustimo reagirati čez noč. Naslednji dan preverimo potek reakcije s tankoplastno kromatografijo in ker ne poteče v celoti, pustimo pri enakih pogojih reagirati čez vikend. Po poteku reakcije pri znižanem tlaku uparimo topilo in izvedemo ekstrakcijo; k reakcijski zmesi dodamo 50 mL EtOAc in spiramo z 1 M HCl (2 × 25 mL), nato z 1 M NaOH (2 × 25 mL) in na koncu z nasičeno vodno raztopino NaCl (1 × 30 mL) ter sušimo nad Na₂SO₄. Uparimo EtOAc in produkt čistimo s kolonsko kromatografijo (MF = DKM : metanol = 20 : 1). Po čiščenju dobimo 45 mg končne spojine **9a**, ki je bele barve in je v obliki zelo viskoznega olja.

Izkoristek: 11,5 %, **Rf:** 0,30 (DKM : metanol = 20 : 1), **¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm)** = 2,00–2,15 (m, 6H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 2,21–2,25 (m, 6H, -CH₃, -CH₃), 3,49–4,77 (m (razdrobljen signal), 2H, CH₂-CH(CH)-tiazol in CH₂-CH(CH)-NH-), 5,21 (m, 2H, diazol-CH₂-Ar), 5,86 (s, 1H, -CH- (tiazol)), 7,39–7,49 (m, 5H, Ar-H), 7,68–7,97 (m, 6H, -S-CH-C (tiazol), Ar-H in -NH-), **MS (ESI):** *m/z* = 478,78 (M + Na)⁺, **Mr (izračunana):** 456,20, **Elementna sestava:** C₂₇H₂₈N₄OS, **ESI-HRMS:** izračunano za C₂₇H₂₈N₄OS (M + H)⁺ *m/z* = 457,2062, izmerjena vrednost: 457,2067

Sinteza 4-((3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)metil)-*N*-(2-(4-feniltiazol-2-il)cikloheksil)benzamida (9b**)**

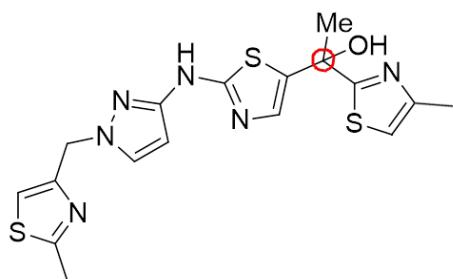
Spojino **8b** (112 mg, 0,38 mmol) raztopimo v 15 mL DKM in v raztopino dodamo 3,4 ekvivalente Et₃N (132 mg, 1,31 mmol) ter pustimo mešati na magnetnem mešalu pri sobni temperaturi 30 minut. Nato dodamo 0,94 ekvivalenta 4-((3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)metil)benzojske kisline (82 mg, 0,36 mmol) in na koncu 1,7 ekvivalenta TBTU (209 mg, 0,65 mmol). Ob mešanju pri sobni temperaturi pustimo reagirati čez noč. Naslednji dan preverimo potek reakcije s tankoplastno kromatografijo in ker ne poteče v celoti, pustimo pri enakih pogojih reagirati čez vikend. Po poteku reakcije pri znižanem tlaku uparimo

topilo in izvedemo ekstrakcijo; k reakcijski zmesi dodamo 50 mL EtOAc in spiramo z 1 M HCl (2×25 mL), nato z 1 M NaOH (2×25 mL) in sušimo z nasičeno vodno raztopino NaCl (1×30 mL) ter nad Na₂SO₄. Uparimo EtOAc in produkt čistimo s kolonsko kromatografijo (MF = DKM : metanol = 20 : 1). Po čiščenju dobimo 12 mg bele, trdne končne spojine **9b**.

Izkoristek: 6,7 %, **Rf:** 0,32 (DKM : metanol = 20 : 1), **¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm)** = 1,26–1,82 (m, 8H, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-), 2,04 (s, 3H, -CH₃), 2,13 (s, 3H, -CH₃), 3,20 (m, 1H, CH₂-CH(CH)-tiazol), 3,95 (m, 1H, CH₂-CH(CH)-NH-), 5,25 (m, 2H, diazol-CH₂-Ar), 5,85 in 5,87 (s (podvojen signal), 1H, -CH- (tiazol)), 6,90–7,88 (m, 11H, Ar-H, -S-CH-C (tiazol) in -NH-), **MS (ESI):** m/z = 492,78 (M + Na)⁺, **Mr (izračunana):** 470,21, **Elementna sestava:** C₂₈H₃₀N₄OS, **ESI-HRMS:** izračunano za C₂₈H₃₀N₄OS (M + H)⁺ m/z = 471,2219, izmerjena vrednost: 471,2209, T_{tališče}: 129–136 °C

4.2 LOČEVANJE IN ZBIRANJE ENANTIOMEROV 1-(5-metiltiazol-2-il)-1-(2-(1-((2-metiltiazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-3-ilamino)tiazol-5-il)etanola (**tiazol 1**) in 1-(2-(1-benzil-1*H*-pirazol-3-ilamino)tiazol-5-il)-1-(5-metiltiazol-2-il)etanola (**tiazol 2**)

4.2.1 Ločevanje enantiomerov 1-(5-metiltiazol-2-il)-1-(2-(1-((2-metiltiazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-3-ilamino)tiazol-5-il)etanola (**tiazol 1**) in zbiranje posameznega enantiomera



Slika 9: spojina **tiazol 1**

Iskanje idealnih pogojev ločbe:

Raztopina vzorca:

Pripravimo raztopino vzorca s koncentracijo 0,2 mg/mL; na analitski tehnici natehtamo 2,0 mg vzorca, ki ga raztopimo v 2,0 mL acetonitrila (MeCN). Tako dobimo osnovno raztopino vzorca s koncentracijo 1 mg/mL. 0,3 mL osnovne raztopine redčimo na 1,5 mL z MeCN in dobimo vzorec koncentracije 0,2 mg/mL.

Ločevanje na analitski koloni Kromasil CelluCoat RP 4,6 × 150 mm

Delamo pri spodaj navedenih pogojih:

Tip kromatografije	Reverzno fazna
Kolona	Kromasil 3-CelluCoat RP 4,6 × 150 mm
Volumen injiciranja	10 µL (konc. 0,2 mg/mL)
Temperatura kolone	Sobna
Valovna dolžina	254 nm
Pretok	0,5 mL/min

Pri uporabi reverzno fazne kolone preizkusimo mobilne faze v navedenih razmerjih:

- MeCN : H₂O = 50 : 50, 40 : 60, 30 : 70, 20 : 80
- MeCN : 0,1 % AcOH_(aq) = 30 : 70
- MeOH : H₂O = 30 : 70
- MeOH : 0,1 % AcOH_(aq) = 40 : 60, 50 : 50
- Na-fosfat 20 mM : MeOH = 30 : 70, 60 : 40, 70 : 30

Pri nobeni izmed navedenih mobilnih faz ne dosežemo ločbe enantiomerov.

Ker z reverzno fazno kolono nismo uspešni, preidemo na normalno fazni sistem. Uporabimo kolono Kromasil 3-CelluCoat 4,6 × 150 mm, kjer kot mobilno fazo uporabimo različna razmerja heksan : EtOH : MeOH, ostali pogoji ostanejo enaki kot pri reverzno faznem sistemu. Najuspešnejši smo z mobilno fazo heksan : EtOH : MeOH v razmerju 92 : 4 : 4 s katero nam uspe delna ločba.

Prehod na semi-preoperativno kolono Kromasil 5-CelluCoat 10 × 250 mm

Priprava vzorca: Natehtamo 1,50 mg vzorca **tiazol 1**, ki ga raztopimo v 1,50 mL EtOH, da dobimo vzorec koncentracije 1 mg/mL.

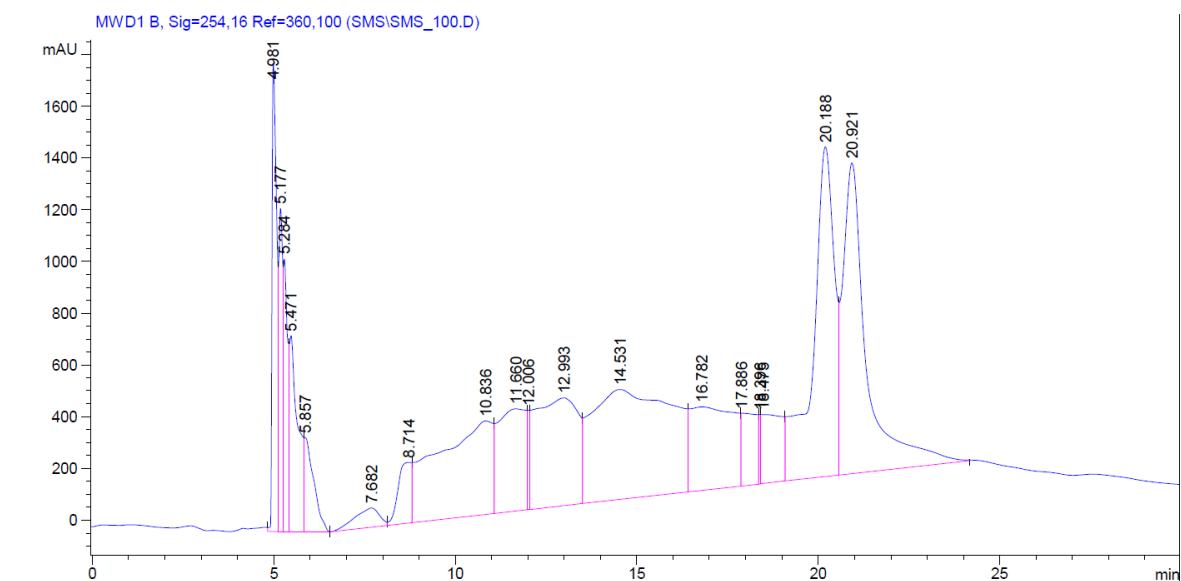
Pripravimo tudi vzorec koncentracije 5 mg/mL tako, da natehtamo 7,50 mg vzorca **tiazol 1** in ga raztopimo v 1,50 mL EtOH.

Pogoji:

Tip kromatografije	Normalno fazna
Kolona	Kromasil 5-CelluCoat 10 × 250 mm
Volumen injiciranja	100 µL (1 mg/mL)
Temperatura kolone	Sobna
Valovna dolžina	254 nm
Pretok	4 mL/min
Mobilna faza	heksan : EtOH : MeOH = 92 : 4 : 4

Najboljšo ločbo na analitski koloni dosežemo z mobilno fazo heksan : EtOH : MeOH = 92 : 4 : 4, zato jo uporabimo tudi na semi-preparativni koloni.

Pri navedenih pogojih nam uspe delna ločba; vrhova sta delno ločena pri $t_r = 20\text{--}22$ min. Razlika med retencijskima časoma kromatografskih vrhov znaša 0,73 minute.



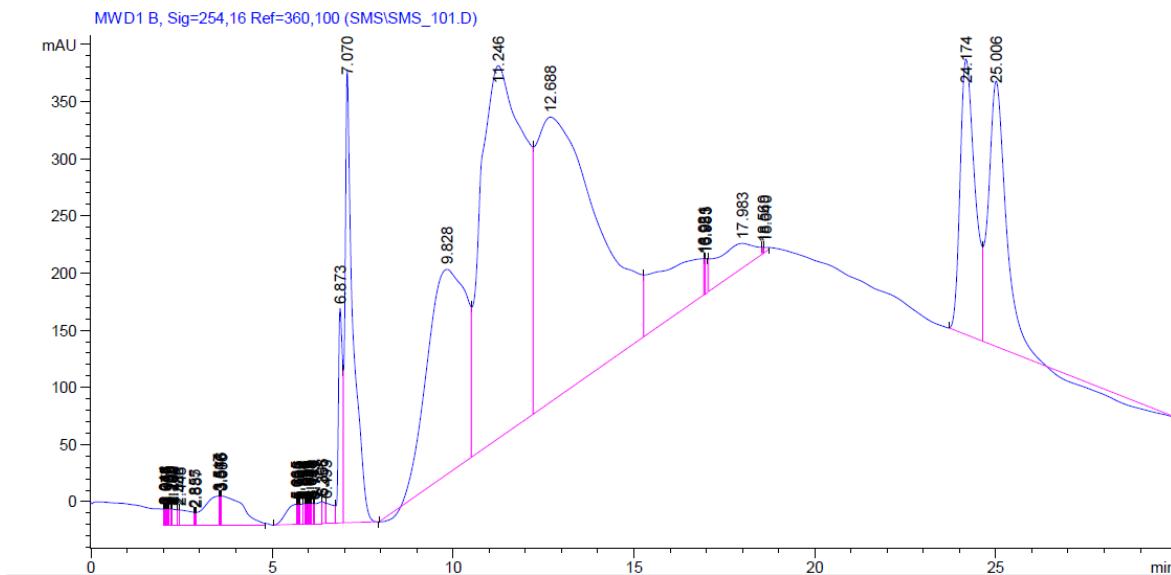
Slika 10: Ločba pri uporabi mobilne faze heksan : EtOH : MeOH = 92 : 4 : 4.

Optimizacija pogojev ločbe

1. Znižanje pretoka in zmanjšanje volumna injiciranja

Z namenom povečanja razlike med retencijskima časoma kromatografskih vrhov znižamo pretok na 3 mL/min. Volumen injiciranja znižamo na 20 μL .

Tip kromatografije	Normalno fazna
Kolona	Kromasil 5-CelluCoat 10 \times 250 mm
Volumen injiciranja	20 μL (1 mg/mL)
Temperatura kolone	Sobna
Valovna dolžina	254 nm
Pretok	3 mL/min
Mobilna faza	heksan : EtOH : MeOH = 92 : 4 : 4



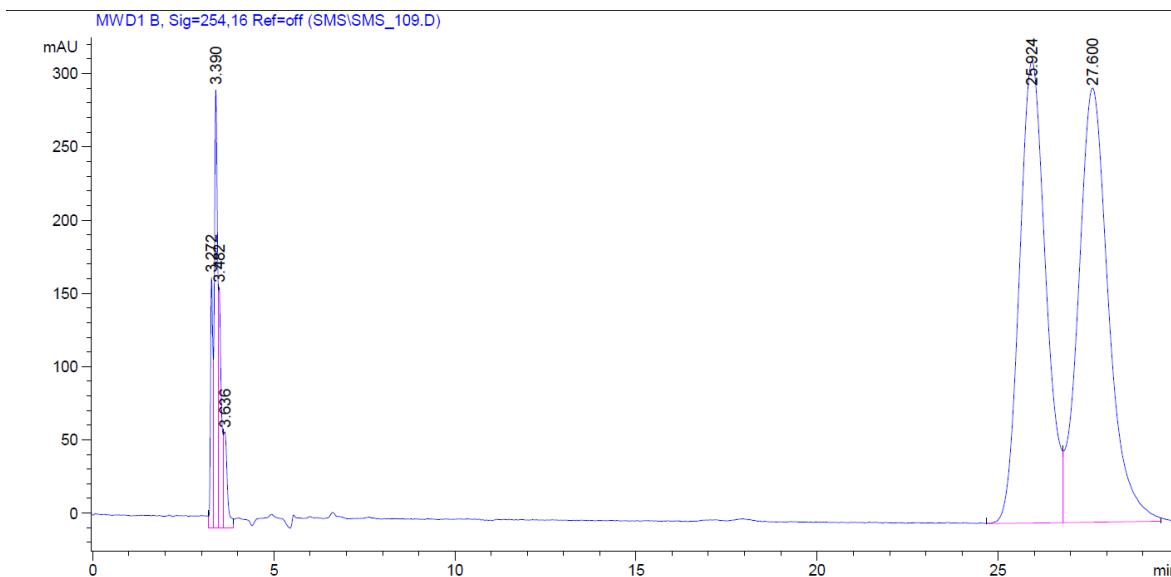
Slika 11: Znižanje pretoka iz 4 na 3 mL/min in zmanjšanje volumna injiciranja na 20 µL.

Poveča se čas retencije na 24–26 minute, razlika med retencijskima časoma med vrhovoma se poveča minimalno (znaša 0,83 minute), prav tako ne dosežemo ločbe na bazni liniji.

2. Sprememba razmerij komponent mobilne faze in dodatek 0,3 % DEA

Ker pretok bistveno ne vpliva na razlike v retencijskih časih ga vrnemo na 4 mL/min. Spremenimo razmerja komponent v mobilni fazi; heksan : EtOH : MeOH = 90 : 5 : 5. Na podlagi preizkusa (opisan v 5. poglavju) se odločimo, da k mobilni fazi dodamo 0,3 % DEA. Injiciramo vzorec z višjo koncentracijo 5 mg/mL.

Tip kromatografije	Normalno fazna
Kolona	Kromasil 5-CelluCoat 10 × 250 mm
Volumen injiciranja	20 µL (5 mg/mL)
Temperatura kolone	Sobna
Valovna dolžina	254 nm
Pretok	4 mL/min
Mobilna faza	heksan : EtOH : MeOH = 90 : 5 : 5 + 0,3 % DEA



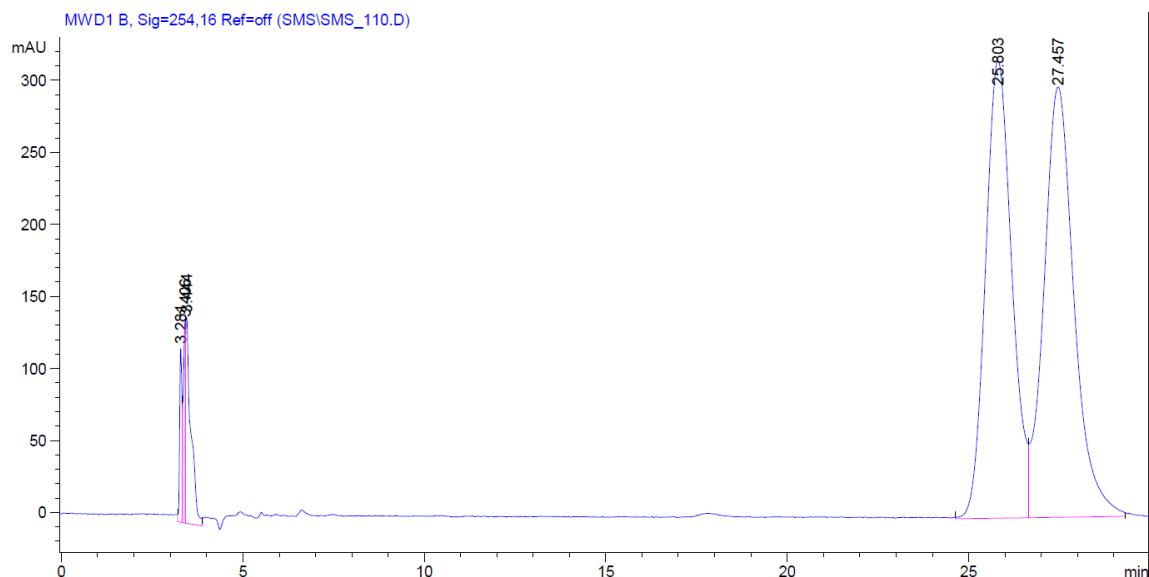
Slika 12: Spremembra razmerja komponent mobilne faze na heksan : EtOH : MeOH = 90 : 5 : 5 in dodatek 0,3 % DEA.

Ostrina in razlika med retencijskima časoma vrhov se izboljšata, še vedno pa vrhova nista ločena na bazni liniji.

3. Povečanje deleža DEA na 0,5 %

Delež DEA v mobilni fazi povečamo iz 0,3 % na 0,5 %.

Tip kromatografije	Normalno fazna
Kolona	Kromasil 5-CelluCoat 10 × 250 mm
Volumen injiciranja	20 µL (5 mg/mL)
Temperatura kolone	Sobna
Valovna dolžina	254 nm
Pretok	4 mL/min
Mobilna faza	heksan : EtOH : MeOH = 90 : 5 : 5 + 0,5 % DEA



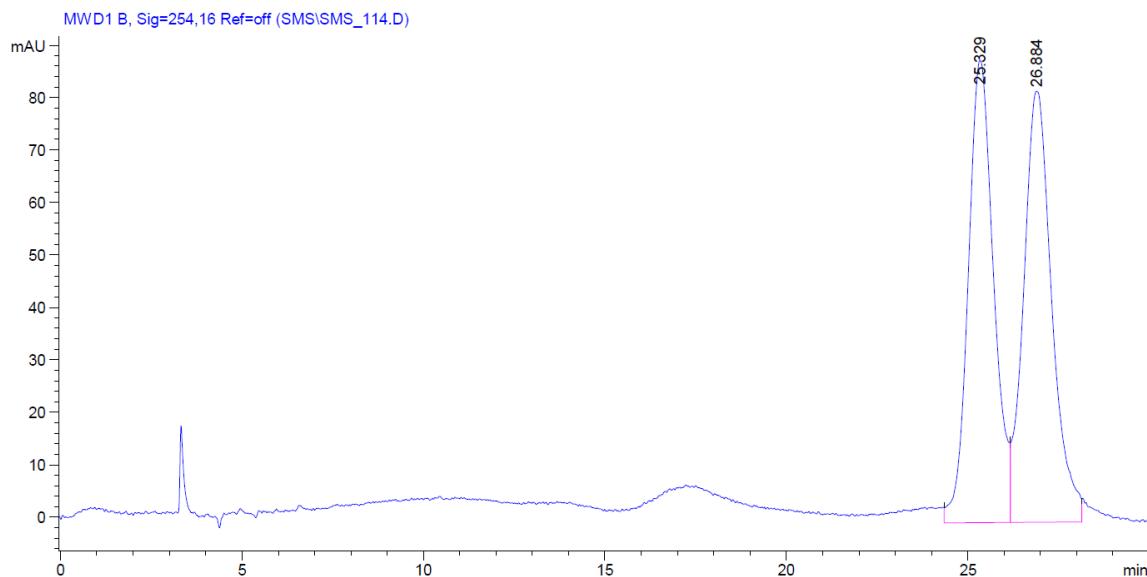
Slika 13: Povečanje deleža DEA iz 0,3 % na 0,5 % ne prinese izboljšanja.

Ni izboljšanja ločbe, zato delež DEA vrnemo na 0,3 %.

4. Zmanjšanje volumna injiciranja na 5 µL

Ker nam enantiomerov pri danih pogojih ne uspe ločiti pri bazni liniji, poskusimo z injiciranjem manjšega volumna vzorca; 5 µL (5 mg/mL).

Tip kromatografije	Normalno fazna
Kolona	Kromasil 5-CelluCoat 10 × 250 mm
Volumen injiciranja	5 µL (5 mg/mL)
Temperatura kolone	Sobna
Valovna dolžina	254 nm
Pretok	4 mL/min
Mobilna faza	heksan : EtOH : MeOH = 90 : 5 : 5 + 0,3 % DEA



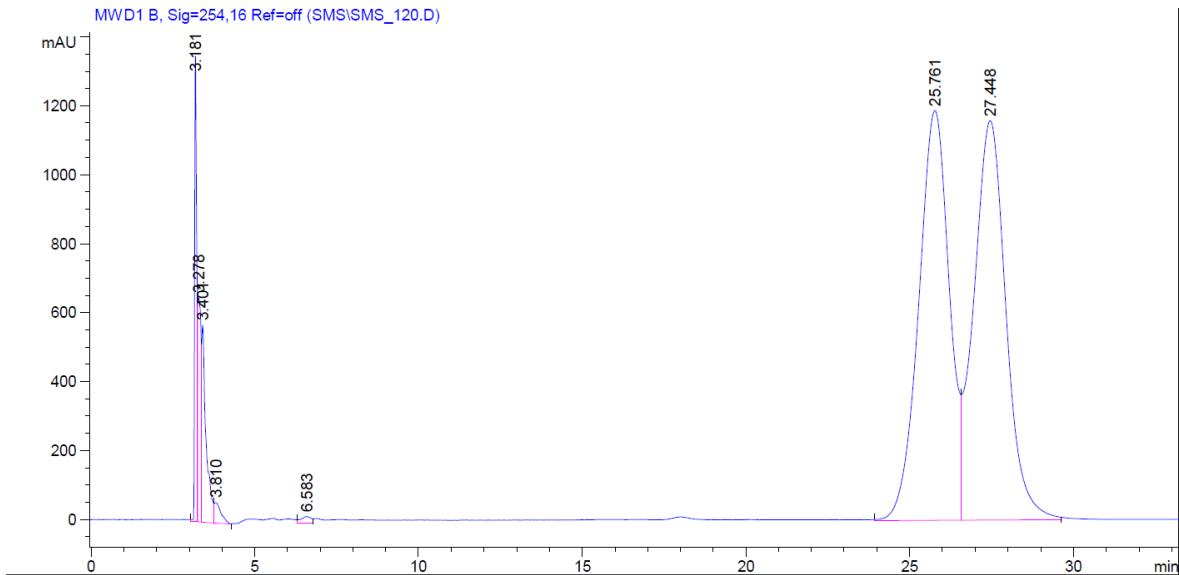
Slika 14: Zmanjšanje volumna injiciranja na 5 μL

Vrhov nam kljub zmanjšanju volumna injiciranja ne uspe ločiti pri bazni liniji.

5. Povečanje volumna injiciranja na 100 μL

Za zbiranje frakcij potrebujemo pogoje pri katerih bomo pri vsakem ločevanju zbrali maksimalno količino posameznega izomera. Poskusimo z injiciranjem 100 μL (5 mg/mL), kar pomeni, da pri posameznem ločevanju ločujemo 0,5 mg vzorca, pri pogojih, ki so se izkazali kot najboljši:

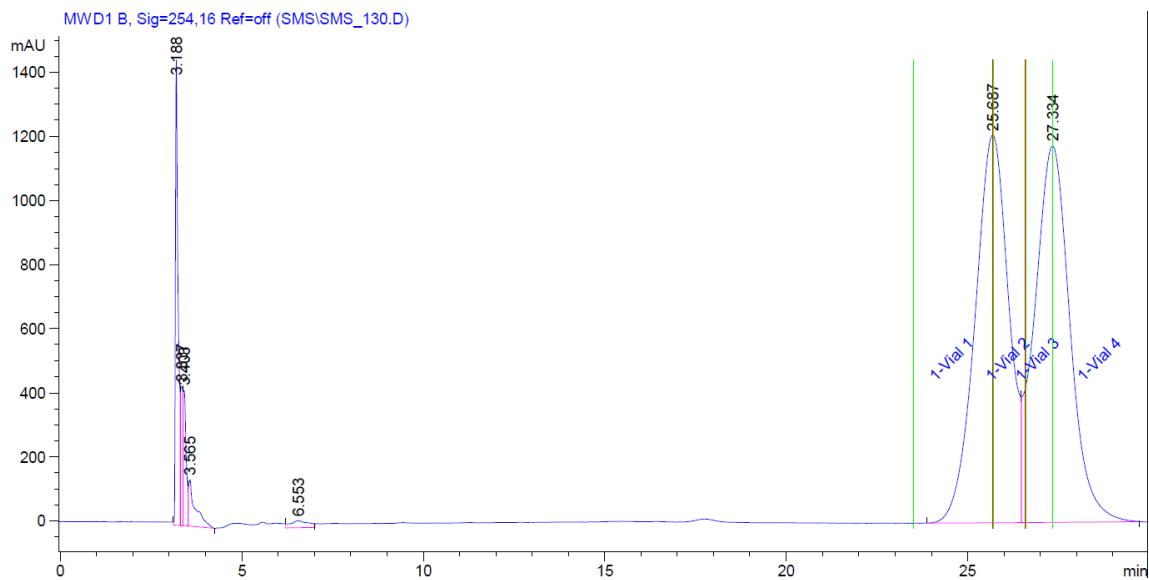
Tip kromatografije	Normalno fazna
Kolona	Kromasil 5-CelluCoat 10 \times 250 mm
Volumen injiciranja	100 μL (5 mg/mL)
Temperatura kolone	Sobna
Valovna dolžina	254 nm
Pretok	4 mL/min
Mobilna faza	heksan : EtOH : MeOH = 90 : 5 : 5 + 0,3 % DEA



Slika 15: Ločba, ki jo dosežemo pri optimalnih pogojih in volumnu injiciranja, ki je dovolj velik za zbiranje posameznih enantiomerov.

6. Zbiranje ločenih enantiomerov

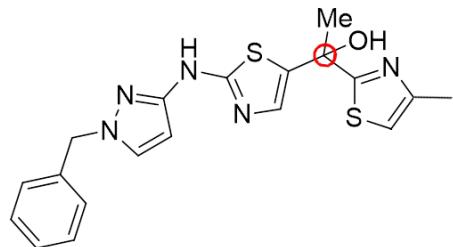
Na podlagi dosežene ločbe kromatografskih vrhov, se odločimo za nekonvencionalno metodo zbiranja vzorcev v 4 različne viale, kot je razvidno iz kromatograma:



Slika 16: zbiranje posameznih frakcij

Izvedemo 16 ločb z zbiranjem in uspe nam zbrati 2,46 mg izomera, ki se eluira prvi in 2,59 mg izomera, ki se eluira drugi.

4.2.2 Ločevanje enantiomerov 1-(2-(1-benzil-1*H*-pirazol-3-ilamino)tiazol-5-il)-1-(5-metiltiazol-2-il)etanola (tiazol 2**) in zbiranje posameznega enantiomera**



Slika 17: spojina **tiazol 2**

Iskanje idealnih pogojev ločbe

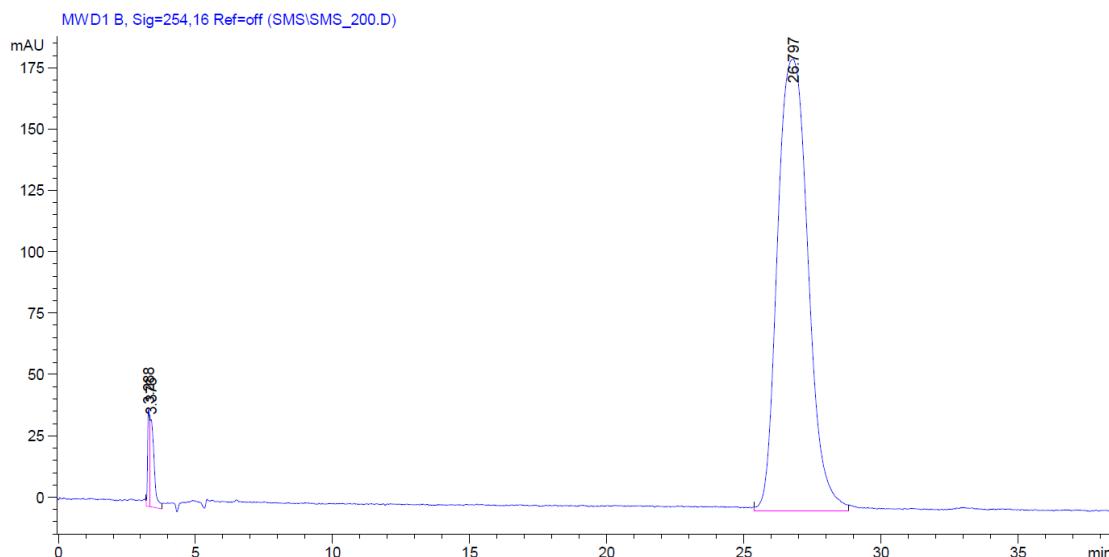
Raztopina vzorca:

Natehtamo 7,50 mg vzorca in ga raztopimo v 1,50 mL EtOH, da dobimo raztopino koncentracije 5 mg/mL.

1. Poskus ločbe pri enakih pogojih kot pri spojini »tiazol 1«

Tip kromatografije	Normalno fazna
Kolona	Kromasil 5-CelluCoat 10 × 250 mm
Volumen injiciranja	10 µL (5 mg/mL)
Temperatura kolone	Sobna
Valovna dolžina	254 nm
Pretok	4 mL/min
Mobilna faza	heksan : EtOH : MeOH = 90 : 5 : 5 + 0,3 % DEA

Ker je spojina **tiazol 2** po strukturi podobna spojini **tiazol 1**, izvedemo poskus ločbe pri enakih pogojih, znižamo samo volumen injiciranja na 10 µL.



Slika 18: Prvi poskus ločbe z mobilno fazo heksan : EtOH : MeOH = 90 : 5 : 5 + 0,3 % DEA, ki je neuspešen.

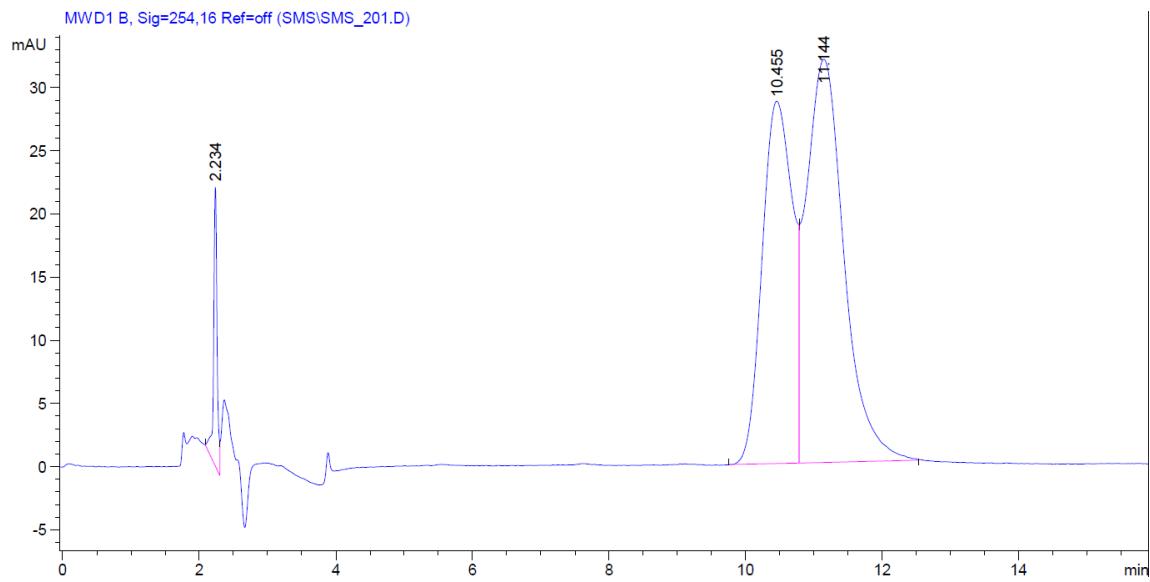
Retencijski čas je približno enak kot pri spojini **tiazol 1**, ki smo jo ločevali predhodno, vendar dobimo samo en vrh, ločba ni uspešna.

2. Prehod na analitsko kolono

Pripravimo raztopino vzorca z nižjo koncentracijo: natehtamo 1,0 mg vzorca, ki ga raztopimo v 1,0 mL etanola, da dobimo osnovno raztopino koncentracije 1 mg/mL. Z avtomatsko pipeto odpipetiramo 150 μ L osnovne raztopine, ki jo z etanolom redčimo na 1,50 mL, tako da dobimo raztopino vzorca s koncentracijo 0,1 mg/mL. Ker z obstoječo mobilno fazo na semi-preparativni koloni ne dosežemo ločbe, se odločimo za prehod na analitsko kolono. V prvem poskusu na analitski koloni se odločimo za mobilno fazo heksan : iPrOH = 85 : 15.

Pogoji:

Tip kromatografije	Normalno fazna
Kolona	Kromasil 3-CelluCoat RP 4,6 \times 150 mm
Volumen injiciranja	20 μ L (0,1 mg/mL)
Temperatura kolone	Sobna
Valovna dolžina	254 nm
Pretok	1 mL/min
Mobilna faza	heksan : iPrOH = 85 : 15



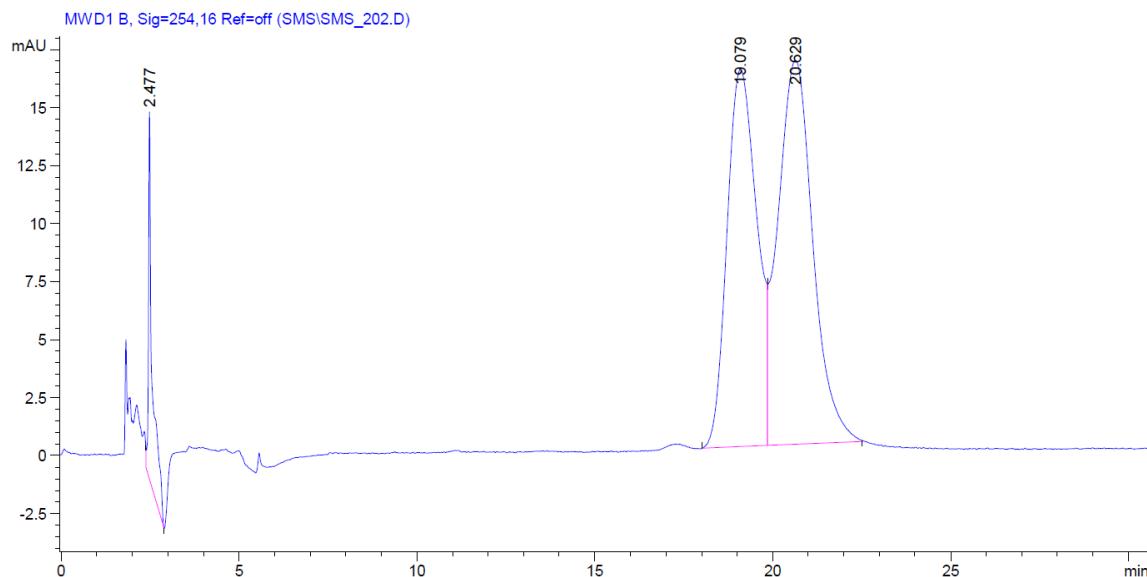
Slika 19: Poskus ločbe na analitski koloni z mobilno fazo heksan : iPrOH = 85 : 15

Dobimo delno ločena vrhova, ki se eluirata v času od 10. do 12. minute, razlika med retencijskima časoma vrhov znaša 0,69 minute.

3. Sprememba sestave mobilne faze na heksan : iPrOH = 90 : 10

Ker želimo doseči boljšo ločbo, znižamo koncentracijo iPrOH na 10 %. Ostali pogoji ostanejo enaki.

Tip kromatografije	Normalno fazna
Kolona	Kromasil 3-CelluCoat RP 4,6 × 150 mm
Volumen injiciranja	20 µL (0,1 mg/mL)
Temperatura kolone	Sobna
Valovna dolžina	254 nm
Pretok	1 mL/min
Mobilna faza	heksan : iPrOH = 90 : 10



Slika 20: Ločba na analitski koloni z mobilno fazo heksan : iPrOH = 90 : 10

Čas elucije se podaljša za približno 10 minut, razlika med retencijskima časoma vrhov se poveča na 1,55 minut, kar pomeni izboljšanje ločbe, ki pa še vedno ni ustrezna.

4. Sprememba sestave mobilne faze na heksan : iPrOH = 95 : 5

Z namenom dodatnega izboljšanja resolucije delež iPrOH v mobilni fazi znižamo na 5 %. Ostali pogoji ostanejo enaki.

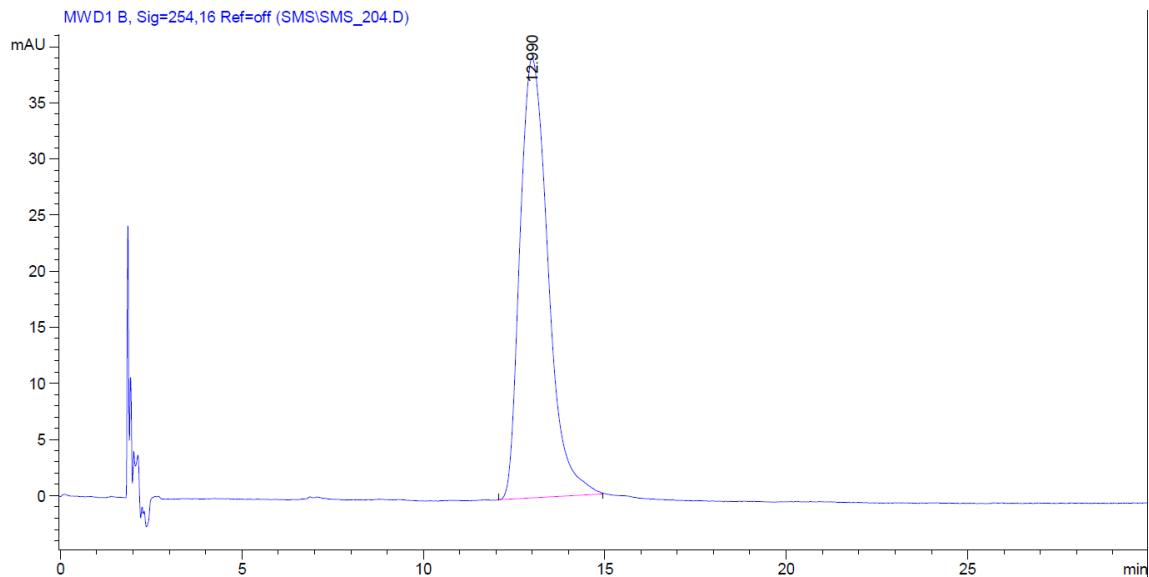
Tip kromatografije	Normalno fazna
Kolona	Kromasil 3-CelluCoat RP 4,6 × 150 mm
Volumen injiciranja	20 µL (0,1 mg/mL)
Temperatura kolone	Sobna
Valovna dolžina	254 nm
Pretok	1 mL/min
Mobilna faza	heksan : iPrOH = 95 : 5

Pri teh pogojih se močno podaljša čas elucije, saj se začne spojina eluirati šele pri 75. minut, to pa je za naše potrebe predolgo.

5. Sprememba sestave mobilne faze; zamenjava iPrOH z EtOH

Ker nam z mobilno fazo heksan : iPrOH v različnih razmerjih ne uspe doseči optimalne ločbe, se odločimo za zamenjavo iPrOH z EtOH. Izvedemo ločbo pri spodaj navedenih pogojih z mobilno fazo heksan : EtOH = 90 : 10.

Tip kromatografije	Normalno fazna
Kolona	Kromasil 3-CelluCoat 4,6 × 150 mm
Volumen injiciranja	20 µL (0,1 mg/mL)
Temperatura kolone	Sobna
Valovna dolžina	254 nm
Pretok	1 mL/min
Mobilna faza	heksan : EtOH = 90 : 10



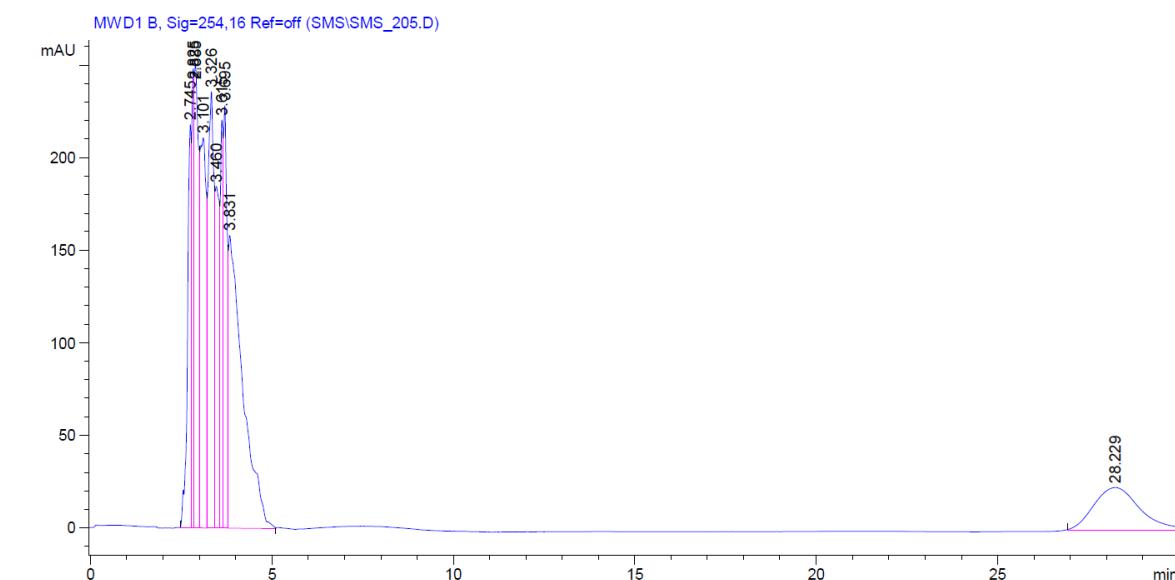
Slika 21: Sprememba sestave mobilne faze, iPrOH zamenjamo z EtOH.

Naša spojina se eluira med 12.–15. minuto, vendar ni ločena.

6. Sprememba komponente mobilne faze; zamenjava EtOH z MeOH

Ker z mobilno fazo heksan : EtOH ne dosežemo ločbe, spremenimo sestavo mobilne faze na heksan : MeOH. V poskusu ločbe uporabimo razmerje heksan : MeOH = 95 : 5.

Tip kromatografije	Normalno fazna
Kolona	Kromasil 3-CelluCoat 4,6 × 150 mm
Volumen injiciranja	20 µL (0,1 mg/mL)
Temperatura kolone	Sobna
Valovna dolžina	254 nm
Pretok	1 mL/min
Mobilna faza	heksan : MeOH = 95 : 5



Slika 22: Zamenjava EtOH z MeOH.

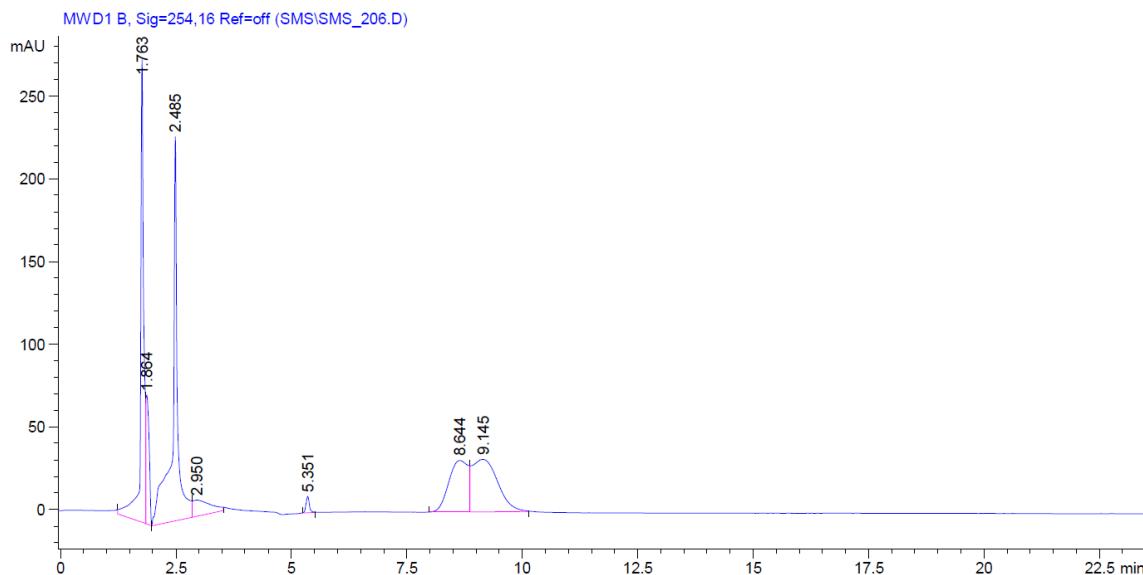
Spojina se eluira neločena med 27. in 30. minuto.

7. Sprememba obeh komponent mobilne faze na cikloheksan : iPrOH

Alkoholno komponento mobilne faze vrnemo na iPrOH, saj smo z njim dobili najboljše rezultate. Predhodno uporabljeni heksan zamenjamo s cikloheksanom. Uporabimo razmerje cikloheksan : iPrOH = 90 : 10 in izvedemo poskus ločbe pri spodaj navedenih pogojih:

Tip kromatografije	Normalno fazna
Kolona	Kromasil 3-CelluCoat 4,6 × 150 mm
Volumen injiciranja	20 µL (0,1 mg/mL)
Temperatura kolone	Sobna

Valovna dolžina	254 nm
Pretok	1 mL/min
Mobilna faza	cikloheksan : iPrOH = 90 : 10



Slika 23: Poskus ločbe z mobilno fazo cikloheksan : iPrOH = 90 : 10.

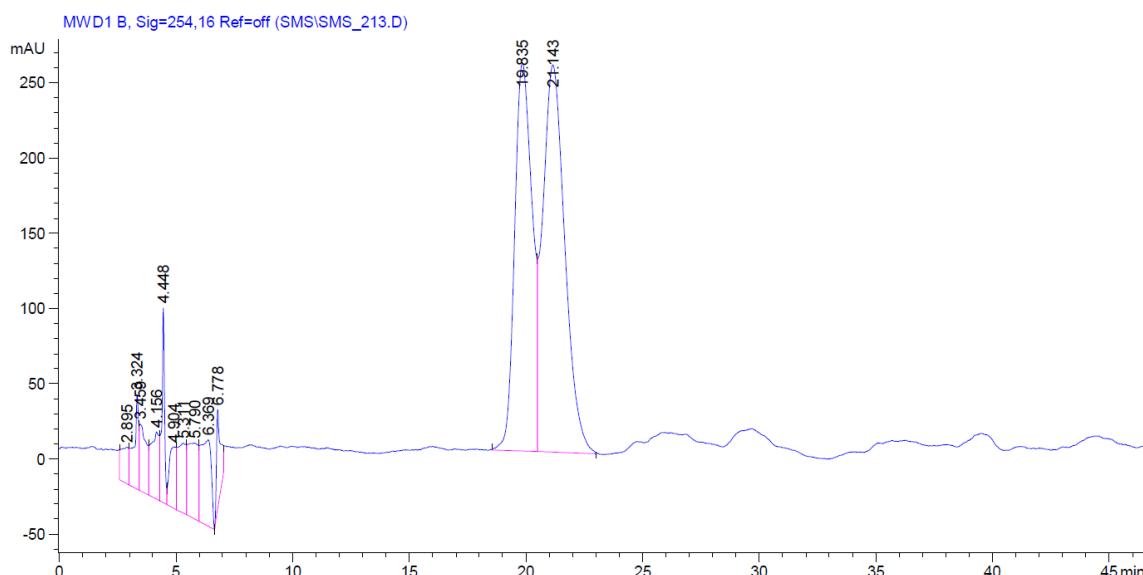
Primerjamo ločbo s tisto, ki smo jo dobili pri uporabi mobilne faze heksan : iPrOH = 90 : 10; čas elucije pri uporabi cikloheksan : iPrOH se skrajša za približno polovico, ločba vrhov pa se močno poslabša.

8. Prehod na semi-preparativno kolono Kromasil 5-CelluCoat 10 × 250 mm

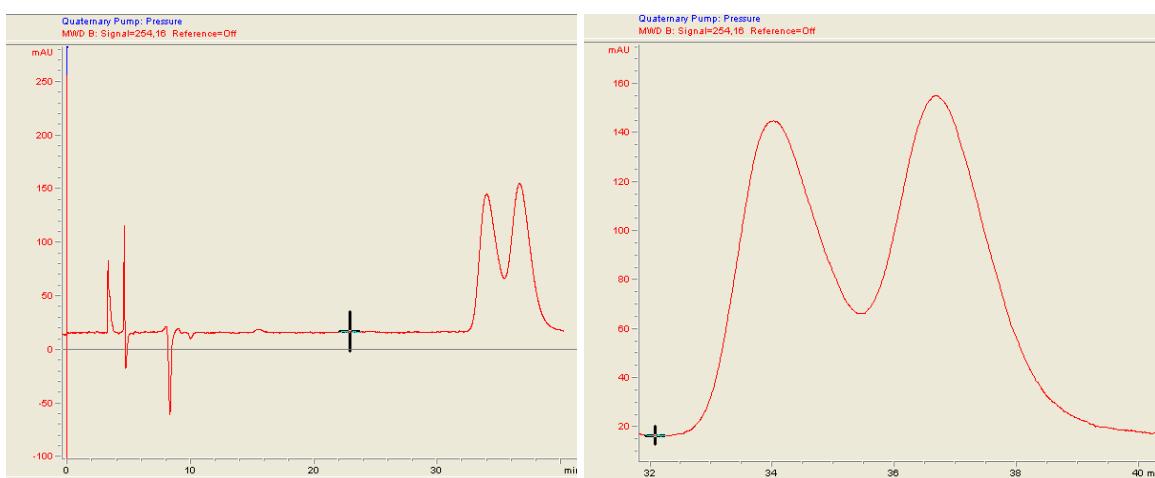
Izmed preskušanih mobilnih faz smo najboljše rezultate na analitski koloni dobili pri uporabi mobilne faze heksan : iPrOH v razmerju 90 : 10, zato jo uporabimo tudi na semi-preparativni koloni. Ker prenosljivost metode iz analitske na semi-preparativno kolono ni popolna, preskusimo različna razmerja heksan : iPrOH in sicer 82 : 18, 84 : 16, 85 : 15 in 87 : 13. Poleg tega k mobilni fazi dodamo 0,3 % DEA.

Tip kromatografije	Normalno fazna
Kolona	Kromasil 5-CelluCoat 10 × 250 mm
Volumen injiciranja	100 µL (5 mg/mL)
Temperatura kolone	Sobna
Valovna dolžina	254 nm

Pretok	4 mL/min
Mobilna faza	heksan : iPrOH = 82 : 18 + 0,3 % DEA 84 : 16 + 0,3 % DEA 85 : 15 + 0,3 % DEA 87 : 13 + 0,3 % DEA



Slika 24: Ločba z mobilno fazo heksan : iPrOH = 82 : 18 + 0,3 % DEA

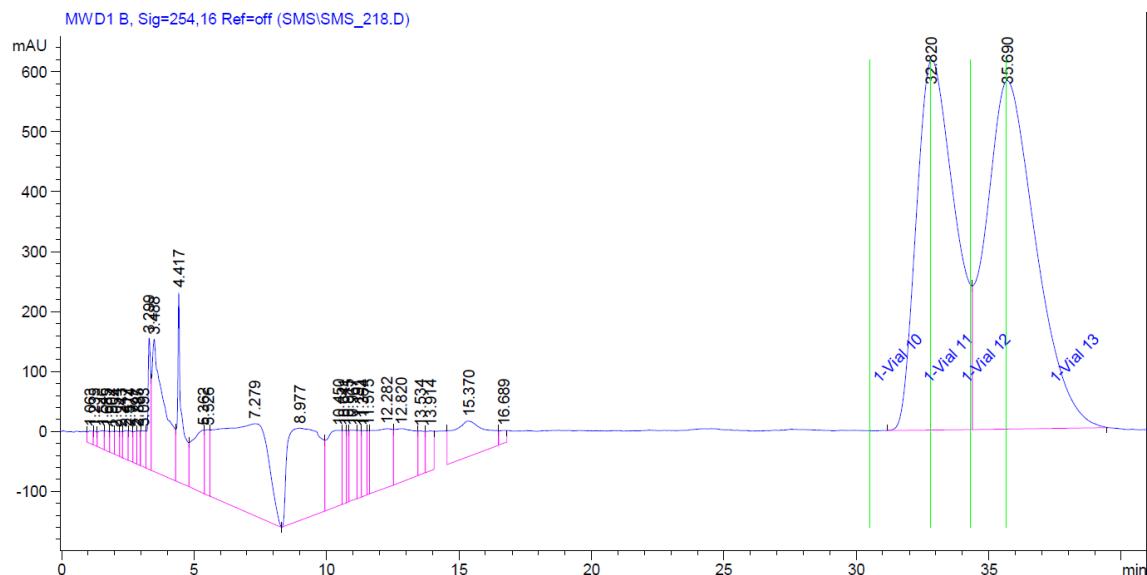


Slika 25: Ločba z mobilno fazo heksan : iPrOH = 87 : 13 + 0,3 % DEA. (Ker se je metoda ustavila po 30 minutah, program ni izdelal kromatograma, zato smo naredili kopijo zaslona.)

Pri najvišjem deležu iPrOH je čas elucije najkrajši, spojina se eluira med 19. in 23. minuto, kakovost ločbe pa se povišuje pri zniževanju deleža iPrOH, in je najboljša pri razmerju 87 : 13, medtem ko se pri tem razmerju čas elucije podaljša na 32–39 minut. Odločimo se, da bomo zbiranje frakcij izvedli z mobilno fazo, pri kateri smo dosegli najboljšo ločbo - heksan : iPrOH = 87 : 13 + 0,3 % DEA.

Zbiranje posameznih frakcij

Po pričakovanjih nam ne uspe doseči ločbe na bazni liniji, zato tako kot pri ločbi spojine **tiazol 1** nepopolno ločena vrhova razdelimo na 4 dele:



Slika 26: Zbiranje posameznih frakcij spojine **tiazol 2**.

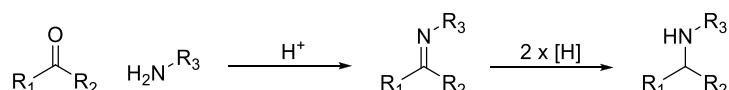
Izvedemo 11 zbiranj. Točne mase posamezne frakcije nimamo, ker nam ni uspelo popolnoma upariti mobilne faze. Vzroka nismo ugotovili.

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 Komentar sinteznih postopkov

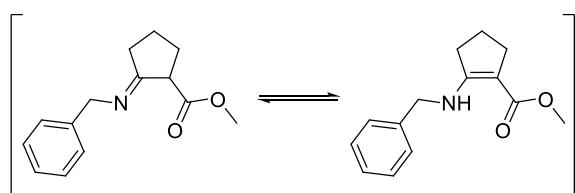
Izhodni spojini naše sinteze sta bili etil 2-oksociklopentankarboksilat ter etil 2-oksocikloheksan karboksilat. V prvi stopnji smo karbonilno skupino, ki je del alkilnega obroča želeli pretvoriti do amina. Najprej smo poskusili z nekaj reakcijami, s katerimi bi do želenega produkta prišli v eni stopnji, ki so imele za vir dušika $\text{NH}^{4+}\text{AcO}^-$ ob prisotnosti različnih reducentov (NaBH_4 in NaBH_3CN) in v različnih topilih (EtOH , AcOH), vendar so bile vse reakcije neuspešne. Zato smo se odločili, da bomo aminsko skupino uvajali preko reduktivnega aminiranja z benzil aminom, ki mu sledi odščita benzila s katalitskim hidrogeniranjem. Pri reakciji reduktivnega aminiranja smo kot substrat uporabili benzil amin, reakcijsko zmes nakisali z AcOH ter kot reducent uporabili $\text{Na(OAc)}_3\text{BH}$.

Pri prvi reakciji se ob prisotnosti kisline najprej tvori imin, ki ga reducent pretvori do sekundarnega amina (slika 27).



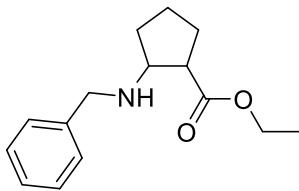
Slika 27: Mehanizem reduktivnega aminiranja (povzeto po (21))

Intermediat imin lahko prehaja tudi v svojo drugo tautomerno obliko, to je do enamina (Slika 28).



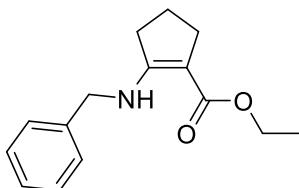
Slika 28: Tautomerni oblici intermediata spojine **1a**.

To se je po naših predvidevanjih dogajalo pri nas, ko smo pri sintezi spojine **1a** pred končno optimizacijo pogojev dobili velik delež stranskega produkta. Za potrditev naše domneve smo posneli tudi spektra $^1\text{H-NMR}$ in $^{13}\text{C-NMR}$ in ugotovili, da je eden izmed njiju naš produkt **1a** (etil 2-(benzilamino)ciklopentan-1-karboksilat);



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 1,26 (t, J_1 = 7,2 Hz, J_2 = 7,2 Hz, 3H, CH₂-CH₃), 1,56–1,86 (m, 6H, -(CH₂)₃-), 2,02 (m, 1H, -CH-NH-CH₂-), 2,93 (q, J_1 = 6,8 Hz, J_2 = 6,4 Hz, J_3 = 8 Hz, 1H, (CH₂)₂-CH-CO), 3,30 (q, J_1 = 6,8 Hz, J_2 = 6,4 Hz, J_3 = 7,6 Hz, 1H, CH₂-CH-NH), 3,79 (d, J = 2, 2H, NH-CH₂-Ar), 4,15 (s, 1H, NH), 4,15 (q, J_1 = 6,8 Hz, J_2 = 7,2 Hz, J_3 = 7,2 Hz, 2H, CH₃-CH₂-O-CO), 7,23–7,33 (m, 5H, Ar-H)
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 14,27; 22,25; 27,42; 31,71; 47,54; 52,22; 60,10; 61,32; 126,75; 127,94; 128,25; 140,55; 174,68

drugi pa enamin; etil 2-(benzilamino)ciklopent-1-en-1-karboksilat, torej tautomer iminskega intermediata:



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 1,27 (t, J_1 = 4,4 Hz, J_2 = 7,2 Hz, 3H, CH₂-CH₃), 1,81(quint, J_1 = 7,6 Hz, J_2 = 9,2 Hz, J_3 = 5,6 Hz, J_4 = 7,6 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 2,54 (t, J_1 = 7,6 Hz, J_2 = 7,6, 4H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 4,15 (q, J_1 = 6,4 Hz, J_2 = 6,8 Hz, J_3 = 6 Hz, 2H, O-CH₂-CH₃), 4,39 (d, J = 6,8, 2H, -NH-CH₂-Ar), 7,27–7,33 (m, 5H, Ar-H), 7,77 (s, 1H, NH)
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 14,57; 20,69; 28,97; 31,85; 48,16; 58,30; 93,23; 126,53; 127,04; 128,48; 139,07; 164,36; 168,30

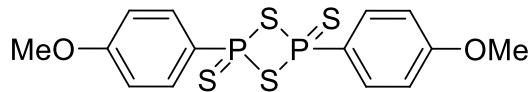
Enaminski intermediat smo žeeli naknadno reducirati, kar nam je uspelo z Na(AcO)₃BH, ki smo ga pripravili *in situ* iz NaBH₄ in AcOH, pri tem pa smo AcOH uporabili tudi kot topilo. Reakcijo smo uspešno ponovili z izhodno spojino iz česar smo ugotovili, da je sinteza uspešnejša z Na(AcO)₃BH pripravljenim *in situ*.

Pri sintezi spojin **2a** in **2b** smo odstranili benzil preko katalitskega hidrogeniranja z vodikom ob prisotnosti katalizatorja paladija na ogljiku. Reakcija je potekala brez posebnosti.

Aminsko skupino smo zaščitili z zaščitno skupino Boc, ki smo jo uvedli z Boc anhidridom ob prisotnosti katalizatorja DMAP (4-dimetilaminopiridina). Za ta tip zaščite smo se odločili zaradi odpornosti Boc zaščite na bazično hidrolizo, saj smo imeli v nekaterih nadaljnjih stopnjah bazične pogoje. Reakciji zaščite spojin **2a** in **2b** sta potekali brez posebnosti z visokima izkoristkoma.

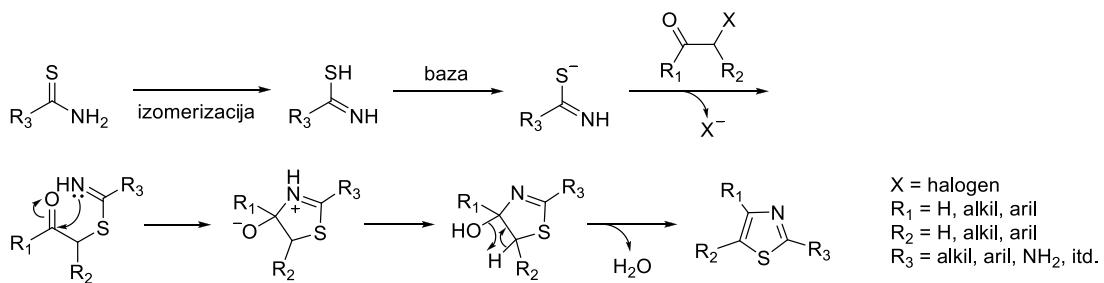
V naslednji stopnji smo etilni ester na spojinah **3a** in **3b** pretvorili do amida (spojni **5a** in **5b**). Da bi do amida prišli v eni stopnji, smo najprej poskusili s prepihovanjem reakcijske zmesi z amonijakom, vendar smo se zaradi slabih izkoristkov odločili za drugo pot. Etilna estra spojin **3a** in **3b** smo tako z vmesno stopnjo z bazično hidrolizo najprej pretvorili do karboksilnih kislin (**4a** in **4b**), ki smo ju nato z dodatkom vodne raztopine amonijaka in ob predhodni aktivaciji s CDI pretvorili do amidov (spojni **5a** in **5b**).

Sledila je reakcija pretvorbe amida do tioamida, ki smo jo izvedli z Lawessonovim reagentom (slika 29). Reakciji sinteze spojin **6a** in **6b** sta potekali brez posebnosti.



Slika 29: Lawessonov reagent

V naslednji stopnji smo izvedli Hantzchevo sintezo tiazolov (slika 30); pri omenjeni reakciji tioamid, ki smo ga pripravili, reagira s kloracetofenonom ob prisotnosti baze do tiazola. Reakciji smo uspešno izvedli z izkoristkom 30 % za spojino **7a** oz. 45 % za spojino **7b**.



Slika 30: Mehanizem Hantzcheve sinteze tiazolov (povzeto po (28))

V zadnjih dveh stopnjah smo najprej ob prisotnosti kisline, 2 M HCl v metanolu, odstranili Boc zaščitno skupino. Med nastalim aminom in 4-((3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)metil)benzojsko kislino pa smo v naslednji stopnji tvorili amid s pomočjo sklopitvenega reagenta, 4-((3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)metil)benzojsko kislino, ki smo jo uporabili v zadnji stopnji, so predhodno pripravili na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani. Po čiščenju smo dobili 45 mg končne spojine **9a** oz. 12 mg končne spojine **9b**.

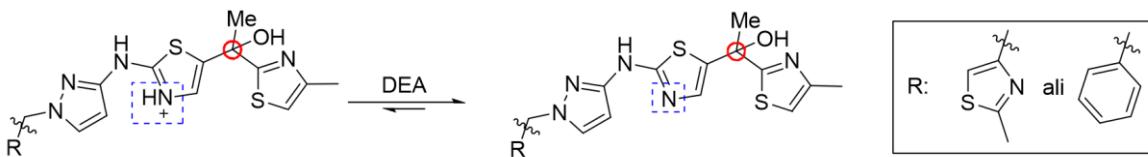
5.2 Komentar ločevanja in zbiranja enantiomerov

Uporaba analitske kolone

Z ločevanjem smo začeli na analitski koloni, z namenom, da ugotovimo ali je izomera sploh mogoče ločiti. Za ta korak smo se odločili predvsem zato, ker je volumen analitske kolone v primerjavi s semi-preparativno manjši, kar pomeni, da ekvilibracija poteka hitreje, poleg tega je manjša tudi poraba mobilne faze. Poleg tega smo pri analitskih kolonah pričakovali tudi boljšo ločbo, saj je velikost delcev pri uporabljenih analitskih kolonah manjša (3 µm v primerjavi s 5 µm pri semi-preparativni koloni).

Dodatek DEA k mobilni fazi

Ker vrhova nista bila ločena na bazni liniji, smo sumili, da imamo enantiomera deloma v protonirani, deloma v neprotonirani obliki. Iz same strukture smo sklepali, da gre za šibko bazično spojino, kar smo potrdili s preizkusom z tankoplastno kromatografijo. Najprej smo kromatogram razvili v nevtralni mobilni fazi (EtOAc : heksan = 2 : 1) in opazili smo, da je imela lisa spojine značilen rep, kar je potrdilo našo domnevo. Razvili smo še 2 kromatograma, enega v mobilni fazi z dodatkom nekaj kapljic AcOH, drugega v mobilni fazi z dodatkom nekaj kapljic NH₃. V kisli mobilni fazi je bil rep še izrazitejši, medtem ko smo v bazični mobilni fazi dobili ostro liso brez repa, kar pomeni, da je naša spojina bazična.



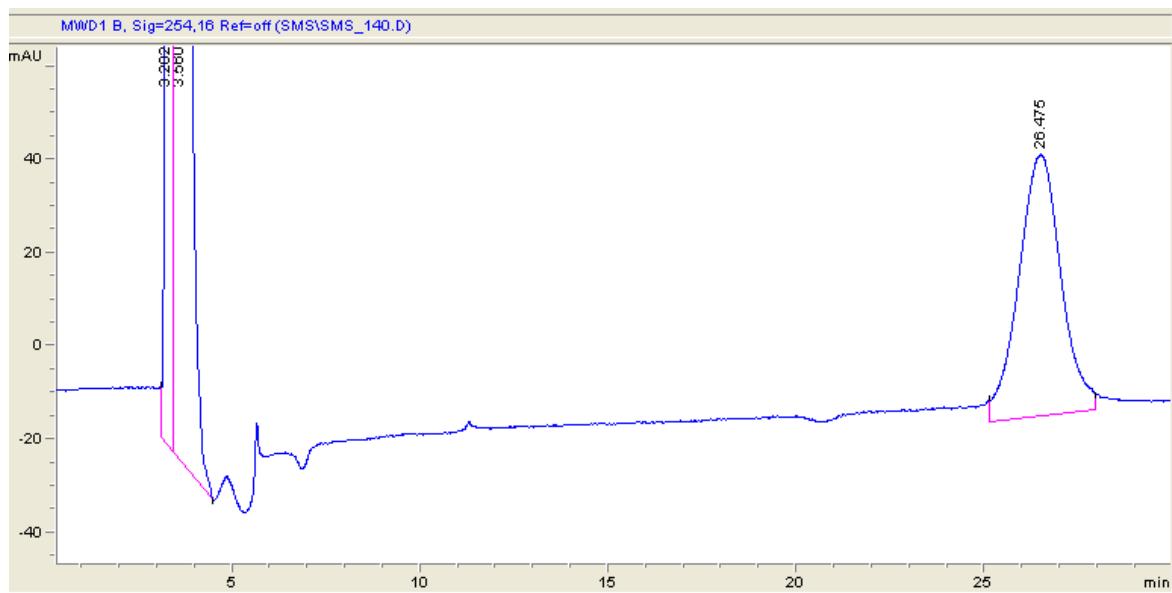
Slika 31: Možni oblici spojin **tiazol 1** in **tiazol 2**. Dodatek DEA usmeri razmerje na stran neprotoniranih oblik.

Preverjanje čistosti ločenih in zbranih frakcij spojine tiazol 1

Po končanem zbiranju smo na kolono injicirali 1. in 4. frakcijo, z namenom, da preverimo njuni čistosti:

Frakcija 1:

Tip kromatografije	Normalno fazna
Kolona	Kromasil 5-CelluCoat 10 × 250 mm
Volumen injiciranja	200 µL (0,02 mg/mL)
Temperatura kolone	Sobna
Valovna dolžina	254 nm
Pretok	4 mL/min
Mobilna faza	heksan : EtOH : MeOH = 90 : 5 : 5 + 0,3 % DEA

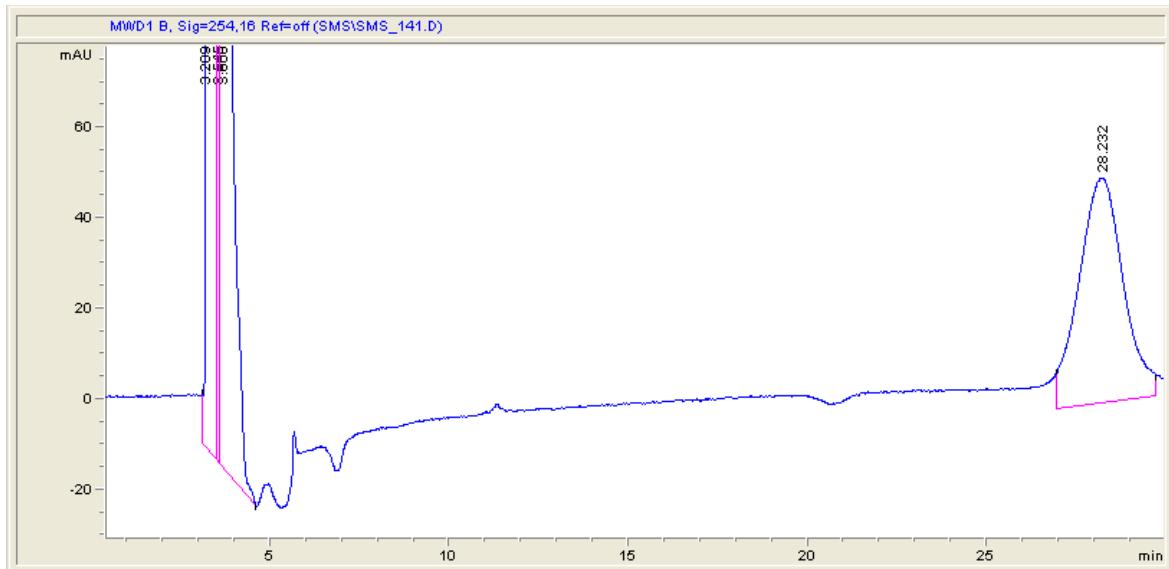


Slika 32: Zbrana frakcija 1 spojine tiazol 1.

Frakcija 4:

Tip kromatografije	Normalno fazna
Kolona	Kromasil 5-CelluCoat 10 × 250 mm
Volumen injiciranja	200 µL (0,02 mg/mL)
Temperatura kolone	Sobna

Valovna dolžina	254 nm
Pretok	4 mL/min
Mobilna faza	heksan : EtOH : MeOH = 90 : 5 : 5 + 0,3 % DEA



Slika 33: Zbrana frakcija 4 spojine **tiazol 1**.

Iz zgornjih kromatogramov je vidno, da je v vsaki frakciji le eden izmed enantiomerov.

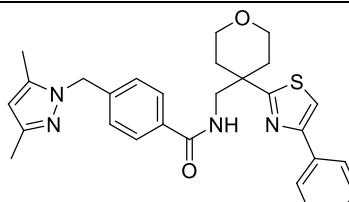
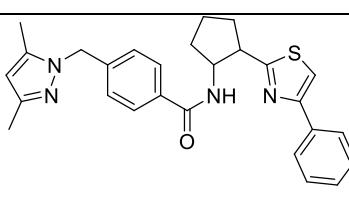
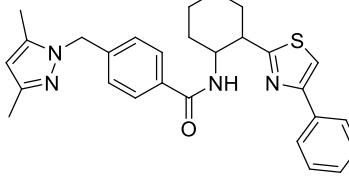
Čistote frakcij spojine **tiazol 2** nam ni uspelo določiti.

5.3 Rezultati

- **Testiranje sintetiziranih spojin**

Končni spojini **9a** in **9b** smo poslali na določanje vrednosti IC_{50} na izoliranem encimu InhA, ki so ga opravili na katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani. V spodnji preglednici smo navedli vrednosti za naši spojini in za primerjavo vrednost za spojino iz katere smo izhajali (spojina **I**).

Preglednica I: Rezultati določanja vrednosti InhA IC_{50} .

spojina	struktura	InhA IC_{50} [μM]
I		0,02
9a		0,579
9b		2

- **Rezultati ločevanja in zbiranja enantiomerov**

Ločevali in zbirali smo enantiomere spojin 1-(5-metiltiazol-2-il)-1-(2-(1-((2-metiltiazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-3-ilamino)tiazol-5-il)etanol (**tiazol 1**) in 1-(2-(1-benzil-1*H*-pirazol-3-ilamino)tiazol-5-il)-1-(5-metiltiazol-2-il)etanol (**tiazol 2**)

Preglednica II: Rezultati pogojev ločevanja enantiomerov po optimizaciji in mase zbranih enantiomerov

Spojina	Pogoji kiralne ločbe po optimizaciji	Mase zbranih enantiomerov
Tiazol 1	<i>Kolona:</i> Kromasil 5-CelluCoat 10 × 250 mm <i>Volumen injiciranja:</i> 100 μL (5 mg/mL)	enantiomer, ki se eluira prvi: $m_1 = 2,46 \text{ mg}$

	<p><i>Temperatura kolone:</i> sobna</p> <p><i>Valovna dolžina:</i> 254 nm</p> <p><i>Pretok:</i> 4 mL/min</p> <p><i>Mobilna faza:</i> heksan : EtOH : MeOH = 90 : 5 : 5 + 0,3 % DEA</p>	<p>enantiomer, ki se eluira drugi: $m_2 = 2,59 \text{ mg}$</p>
Tiazol 2	<p><i>Kolona:</i> Kromasil 5-CelluCoat 10 × 250 mm</p> <p><i>Volumen injiciranja:</i> 100 µL (5 mg/mL)</p> <p><i>Temperatura kolone:</i> sobna</p> <p><i>Valovna dolžina:</i> 254 nm</p> <p><i>Pretok:</i> 4 mL/min</p> <p><i>Mobilna faza:</i> heksan : iPrOH = 87 : 13 + 0,3 % DEA</p>	<p>Enantiomera smo ločili, vendar nam točne mase ni uspelo določiti.</p>

6. SKLEP

V prvem delu naše magistrske naloge smo načrtovali in sintetizirali dva zaviralca encima InhA, spojini **9a** in **9b**. Na izoliranem encimu InhA sta bila učinkovita oba, kot močnejši zaviralec pa se je izkazala spojina **9a**, ki vsebuje ciklopentanski vmesnik. Njena IC₅₀ je znašala 0,579 μM, ki je višja v primerjavi z 0,02 μM, kolikor znaša IC₅₀ spojine **I** iz katere smo izhajala. Upoštevati je potrebno, da imata spojini **9a** in **9b** vsaka po 2 kiralna centra, kar pomeni, da obstajata v štirih izomernih oblikah, predvidevamo pa, da je aktivna samo ena izmed njih. Posledično bi bila koncentracija IC₅₀ v primeru optično čiste spojine **9a** oz. **9b** bistveno nižja. Ravno zato je po našem mnenju nadaljnji razvoj predvsem na osnovi spojine **9a** smiseln, ponuja namreč nove možnosti za modifikacijo molekule na ciklopentanskem vmesniku. Pri sintezi smo imeli največ težav na začetku, pri uvajanju aminske skupine na mesto obročne karbonilne skupine. Tekom poskusov sinteze smo prišli do ugotovitve, da uvajanje najuspešneje poteka z reakcijo reduktivnega aminiranja z benzilaminom ob prisotnosti Na(AcO)₃BH, ki ga pripravimo *in situ*.

V drugem delu smo razvili metodo za ločbo in zbiranje posameznih enantiomerov spojin **tiazol 1** in **tiazol 2**. Z opremo, ki smo jo imeli na voljo nam ni uspelo doseči popolne ločbe, vendar je bila za naše potrebe zadostna, da smo posamezne enantiomere z modificirano metodo zbiranja uspešno zbrali v posameznih frakcijah.

7. VIRI

- (1) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/> (dostopano: 6. 6. 2017)
- (2) <http://www.klinika-golnik.si/dejavnost-bolnišnice/klinična-dejavnost/tuberkuloza/> (dostopano: 6. 6. 2017).
- (3) [http://www.who.int/tb/publications/2010/9789241547833/en/.](http://www.who.int/tb/publications/2010/9789241547833/en/>.) (dostopano: 6. 6. 2017)
- (4) Cerar T, Ružić-Sabljić E: Praktikum iz mikrobiologije za študente farmacije, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, 2010: 27, 46, 53.
- (5) Daffé M: The cell envelope of tubercle bacilli. *Tuberculosis* 2015; 1–4.
- (6) Brennan PJ: Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2003; 83: 91–97.
- (7) Jackson M: The Mycobacterial Cell Envelope - Lipids. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014; 4: a021105.
- (8) Kieser KJ, Rubin EJ: How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. *Nat Rev Microbiol* 2014; 12: 550–562.
- (9) Nataraj V, Varela C, Javid A, Singh A, Besra GS, Bhatt A: Mycolic acids: deciphering and targeting the Achilles' heel of the tubercle bacillus. *Mol Microbiol* 2015; 98(1): 7–16.
- (10) Pawełczyk J, Kremer L: The molecular genetics of mycolic acid biosynthesis. *Microbiol Spectr*. 2014; 2(4): MGM2-0003-2013.
- (11) Jankute M, Cox JAG, Harrison J, Besra GS: Assembly of the Mycobacterial Cell Wall. *Annu Rev Microbiol* 2015; 69: 405–23.
- (12) Cantaloube S, Veyron-Churlet R, Haddache N, Daffé M, Zerbib D: The *Mycobacterium Tuberculosis* FAS-II Dehydratases and Methyltransferases Define the Specificity of the Mycolic Acid Elongation Complexes. *PLoS ONE* 2011; 6(12): e29564.
- (13) Gurvitz A, Hiltunen JH, Kastaniotis AJ: Function of Heterologous *Mycobacterium tuberculosis* InhA, a Type 2 Fatty Acid Synthase Enzyme Involved in Extending C20 Fatty Acids to C60-to-C90 Mycolic Acids, during De Novo Lipoic Acid Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; 74(16): 5078–5085.
- (14) Manjunatha UH et al.: Direct inhibitors of InhA are active against *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Transl Med* 2015; 7(269): 269ra3.

- (15) Timmins GS, Deretic V: Mechanism of action of isoniazid. *Mol. Microbiol.* 2006; 62(5): 1220–1227.
- (16) Cade CE, Dlouhy AC, Medzihradszky KF, Salas-Castillo SP, Ghiladi RA: Isoniazid-resistance conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* KatG: catalase, peroxidase, and INH-NADH adduct formation activities. *Protein Sci* 2010; 19(3): 458–474.
- (17) Vale N, Gomes P, Santos HA: Metabolism of the Antituberculosis Drug Ethionamide. *Curr. Drug Metab.* 2013; 14: 151–158.
- (18) Wang F, Langley R, Gulten G, Dover LG, Besra GS, Jacobs Jr WR, Sacchettini JC: Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis and leprosy. *JEM* 2007; 204(1): 73–78.
- (19) Inturi B, Pujar GV, Purohit MN: Recent Advances and Structural Features of Enoyl-ACP Reductase Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Pharm Chem Life Sci* 2016; 349: 1–10.
- (20) Rožman K et al.: A new ‘golden age’ for the antitubercular target InhA. *Drug Discov Today* 2017; 22(3): 492–502.
- (21) Clayden J, Greeves N, Warren S: Organic chemistry 2. izdaja, Oxford University Press, New York 2012: 234, 302–307, 322–327.
- (22) Ribeiro AR, Maia AS, Cass QB, Tiritan ME: Enantioseparation of chiral pharmaceuticals in biomedical and environmental analyses by liquid chromatography: An overview. *J. Chromatogr. B* 2014; 968: 8–21.
- (23) Scott RPW: Principles and practice of chromatography, Libraryforscience, Washington, 2003.
- (24) <http://laboratoryinfo.com/hplc/> (dostopano: 8. 8. 2017).
- (25) Vaje iz instrumentalne farmacevtske analize, laboratorijski dnevnik, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2013.
- (26) Ettre LS: Nomenclature for chromatography (IUPAC recommendations 1993). *Pure Appl Chem* 1993; 65(4): 819–872.
- (27) Pajk S et al.: New direct inhibitors of InhA with antimycobacterial activity based on a tetrahydropyran scaffold. *Eur J Med Chem* 2016; 112: 252–257.
- (28) Wang Z: Hantzsch Thiazole Synthesis. *Compr. Org. Name React. Reag.* 2010; 296: 1330–1334.