NOVI PRISTOPI K SINTEZI PREDZDRAVIL FOSFATOV IN FOSFORILIRANI DERIVATI PANTOTENSKE KISLINE

Jerca Pahor

Doktorska disertacija
Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana
Ljubljana, Slovenija

Mentor: doc. dr. Ajda Podgoršek Berke, Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana in Lek d.d., Ljubljana, Slovenija
Somentor: prof. dr. Stojan Stavber, Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana in Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana, Slovenija

Komisija za oceno doktorske disertacije:
izr. prof. dr. Jernej Iskra, predsednik, Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana, Slovenija
izr. prof. dr. Marko Anderluh, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija
prof. dr. Janez Plavec, Kemijski inštitut, Ljubljana, Slovenija

MEDNARODNA PODIPLOMSKA ŠOLA JOŽEFA STEFANA
JOŽEF STEFAN INTERNATIONAL POSTGRADUATE SCHOOL



Jerca Pahor

NOVI PRISTOPI K SINTEZI PREDZDRAVIL FOSFATOV IN FOSFORILIRANI DERIVATI PANTOTENSKE KISLINE

Doktorska disertacija

NEW APPROACHES TO THE SYNTHESIS OF PRODRUGS OF PHOSPHATES AND PHOSPHORYLATED DERIVATIVES OF PANTOTHENIC ACID

Doctoral Dissertation

Mentor: doc. dr. Ajda Podgoršek Berke

Somentor: prof. dr. Stojan Stavber

Ljubljana, Slovenija, junij 2016

In ko na vrhu gore veseli umetnjakar ponudi roko izmučenemu umetniku in ga pozdravi z besedami: "Kaj ni to lepo, da se srečava na isti gori?" mu umetnik odgovori: "To ni ista gora."
(Svetlana Makarovič)

Zahvala

Pri svojem delu sem imela neprecenljivo možnost sodelovanja z več institucijami, podjetji in raziskovalci, kar je prispevalo k raznolikosti in poučnosti mojega doktorskega izobraževanja. Prav je, da se vsem, ki so mi delo omogočili, me tako ali drugače učili ali pa mi pomagali pri soustvarjanju doktorata, primerno zahvalim.

Zahvaljujem se za financiranje Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije v okviru financiranja programa mladih raziskovalcev (PR-05021) in raziskovalnega programa Kemija za trajnostni razvoj (PR-0134) ter Odseku za fizikalno in organsko kemijo Instituta »Jožef Stefan«. Zahvaljujemo se Evropskemu skladu za regionalni razvoj ter Ministrstvu za izobraževanje, znanost in šport za financiranje programa "raziskovalni vavčer" (št. 3330-13-500038). Delo je bilo financirano tudi s Sedmim okvirnim programom Evropske komisije (št. FP7/2007-2013, HEALTH-F2-2011, št. sporazuma 277984, TIRCON, namenjen podjetju Acies Bio d.o.o.). Zahvaljujem se tudi za možnost uporabe opreme centrov odličnosti CIPKeBiP in EN-FIST.

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Ajdi Podgoršek Berke za vse predano znanje, za vodenje in zgled, ki mi jih je velikodušno nudila že od mojih rosnih dodiplomskih časov. Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Stojanu Stavberju, ki mi je študij omogočil, nudil tako strokovno pomoč kot življenjske nasvete ter stal za vsakim mojim korakom po neuhojeni poti med akademskim in industrijskim svetom.

Zahvaljujem se članom komisije izr. prof. dr. Jerneju Iskri, izr. prof. dr. Marku Anderluhu ter prof. dr. Janezu Plavcu za strokoven pregled in oceno moje doktorske disertacije. Maši Matijaševič se zahvaljujem za lektoriranje.

Zahvaljujem se ekipi Slovenskega NMR centra Kemijskega inštituta za pomoč pri NMR analizah. Zahvaljujem se dr. Dušanu Žigonu s Centra za masno spektroskopijo Instituta »Jožef Stefan« za masnospektrometrične analize. Za pomoč pri LC-MS analizah se zahvaljujem dr. Jaku Horvatu iz podjetja Acies Bio d.o.o. Zahvaljujem se doc. dr. Krištofu Kranjcu za meritve tališča na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani.

Zahvaljujem se dr. Alenu Čusaku za neformalno mentorstvo, za nesebično pomoč pri realizaciji idej v bučkah, za vso predano znanje in zato, da so bile neskončne ure v laboratoriju prijetne. Za neformalno mentorstvo in predano znanje se zahvaljujem tudi Branku Jenku. Zahvaljujem se mu tudi za lekcije uporabe LC-MS ter za gostoljubje na Litijski. Zahvaljujem se izr. prof. dr. Hrvoju Petkoviću ter sodelavcem podjetja Acies Bio d.o.o., ki so mi omogočili delo na aplikativnih vsebinah projekta TIRCON. Zahvaljujem se dr. Gregorju Koscu za koordinacijo in usklajevanje interesov. Zahvaljujem se tudi za souporabo opreme in laboratorijev podjetja.

Zahvaljujem se vsem sodelavcem in nadrejenim tako z inštituta kot ostalih gostujočih delovnih mest za prijetno vzdušje.

Na koncu naj se zahvalim še družini, prijateljem in Davorju, ki so mi nudili oporo, razumeli pomanjkanje časa in celili rane iz bitke z mlini na veter. Z vašo pomočjo nobena gora ni neosvojljiva.

Povzetek

Priprava in vrednotenje biološke aktivnosti fosforiliranih derivatov pantotenske kisline sta pred kratkim ponovno pritegnila veliko zanimanja, saj so rezultati novih raziskav o zmožnosti teh spojin za obnavljanje znotrajceličnih količin CoA v celicah z okvarjeno biosintezo CoA zelo obetavni. Iskanje ustreznih sinteznih metod je nedvomno ključen korak, ki lahko omogoči popolno izkoriščenje farmacevtskega potenciala teh spojin. Zato je bil namen mojega raziskovanja pripraviti nove fosforilirane derivate pantotenske kisline, pri tem pa za sintezo uporabiti inovativne in učinkovite pristope. Ker je direktna uporaba fosforiliranih spojin v terapiji pogosto neuspešna zaradi omejene biološke uporabnosti in visoke hidrofilnosti fosfatnih monoestrov, sem se osredotočila na pripravo novih derivatov fosfopantotenata in fosfopanteteina z maskirano fosfatno skupino.

Najprej sem preučevala metode za učinkovito pripravo različnih aciloksialkilnih predzdravil fosfatov. Obstoječe sintezne metode so pogosto zelo zahtevne, večina literature pa pokriva zgolj pripravo pivaloiloksimetilnih predzdravil, sintezne metode priprave drugih aciloksialkilnih estrov pa je v literaturi mogoče zaslediti precej redkeje. Zato sem študirala možnost razvoja novih metod za pripravo tovrstnih predzdravil s pomočjo uporabe različnih klorofosfatnih reagentov. Uspešna sem bila pri sintezi novega reagenta, primernega za uvedbo izobutiriloksimetilnih skupin na predzdravilo. Z novim reagentom sem uspešno fosforilirala nekaj modelnih alkoholov. Poleg tega pa mi je iskanje optimalnih reakcijskih pogojev omogočilo fosforiliranje pod zelo ekonomičnimi in milimi reakcijskimi pogoji, primernimi tudi za fosforiliranje biološko aktivnih molekul.

V nadaljevanju raziskav sem študirala možnost učinkovite in selektivne sinteze novih derivatov pantotenske kisline z maskirano fosfatno skupino. Izbrala sem si ustrezna substrata za nadaljnje fosforiliranje (etil D-pantotenat in S-acetilpantetein) ter jih uspešno sintetizirala. V naslednjem koraku sinteze sem dodatno optimizirala reakcijski sistem, kar mi je omogočilo selektivno fosforiliranje primarne hidroksilne skupine izbranih substratov ter učinkovito izolacijo produktov. Najprej sem pripravila več derivatov, maskiranih s preprostimi alkilnimi in arilnimi skupinami z uporabo komercialno dostopnih klorofosfatnih reagentov. Posebno pozornost pa sem namenila pripravi derivatov, maskiranih z aciloksialkilnimi skupinami, ki so zelo razširjene pri pripravi predzdravil fosfatov. Tudi nove derivate, maskirane s temi skupinami, sem pripravila s pomočjo klorofosfatnih reagentov, in sicer z uporabo tako znanega kot novega reagenta, ki sem ga pripravila sama v prvem delu raziskav.

Skupno sem uspešno sintetizirala enajst novih derivatov fosfopantotenata in fosfopanteteina, primernih za testiranje biološke aktivnosti. Z njihovo pripravo pa sem prispevala k dopolnitvi še vedno pomanjkljivega znanja s področja priprave fosforiliranih derivatov pantotenske kisline ter priprave aciloksialkilnih predzdravil fosfatov.

Abstract

The preparation and evaluation of phosphorylated derivatives of pantothenic acid have recently gained a renewed interest, since the results of current studies on the ability of these compounds to restore intracellular CoA levels in cells with defective CoA synthesis are very promising. The quest for appropriate synthetic methods is a key step towards unlocking the full pharmaceutical potential of these compounds. Therefore, the aim of my study was to prepare novel phosphorylated derivatives of pantothenic acid while applying innovative approaches in the synthesis. Since the medical application of phosphorylated compounds was often found to be ineffective, due to a limited bioavailability and high hydrophilicity of phosphate monoesters, I have focused on the preparation of new derivatives of phosphopantothenate and phosphopantetheine with masked phosphate group.

The methods for efficient preparation of different acyloxyalkyl prodrugs of phosphates were firstly studied. The existing synthetic strategies frequently tend to be very challenging and the majority of the literature covers only the introductions of pivaloyloxymethyl groups, while preparation of other acyloxyalkyl phosphate esters is less commonly described. Therefore, the possibility of developing new methods by applying different chlorophosphate reagents for the preparation of related prodrugs has been studied. I was efficient in the synthesis of a new chlorophosphate reagent, suitable for the introduction of isobutyryloxymethyl functionality into the prodrug. New reagent was successfully used for the phosphorylation of a few different model alcohols. In addition, my search toward optimal reaction conditions resulted in highly economical and mild phosphorylation conditions, suitable for the use on biologically active molecules.

In the second part, I have studied the possibility of efficient and selective synthesis of new phosphorylated derivatives of pantothenic acid with masked phosphate group. The suitable substrates for further phosphorylation were chosen (ethyl D-pantothenate and S-acetilpantetheine) and successfully synthesized. Additional optimization of reaction system in the next step enabled selective phosphorylation of the primary hydroxyl group of chosen substrates and efficient isolation of phosphorylated products. Firstly, new derivatives masked with simple alkyl and aryl groups were synthesized using commercially available chlorophosphate reagents. Furthermore, special attention was given to the preparation of derivatives masked with acyloxyalkyl groups as the most prominent representatives used among prodrugs of phosphates. New derivatives masked with acyloxyalkyl groups were prepared using both, known and new chlorophosphate reagents.

In order to complement the list of available compounds suitable for testing on their biological activity, I successfully synthesized eleven new derivatives of phosphopantothenate and phosphopantetheine in good to moderate yields. Moreover, their preparation has notably contributed to still deficient knowledge in the field of the synthesis of phosphorylated derivatives of pantothenic acid and acyloxyalkyl prodrugs of phosphates.

Kazalo

Kazalo shem **xvii**

Kazalo slik **xix**

Kazalo tabel **xxi**

Kratice **xxiii**

1 Uvod **1**
1.1 Pantotenska kislina in njeni derivati ... 1
1.2 Fosforiliranje pantotenske kisline in njenih derivatov ... 4
1.2.1 Pregled objavljene literature ... 5
1.2.1.1 Prvi primeri priprave fosforiliranih derivatov pantotenske kisline ter uporaba difenil klorofosfata ... 5
1.2.1.2 Primeri uporabe dibenzil klorofosfata ... 7
1.2.1.3 Uporaba morfolino diklorofosfata ... 10
1.2.1.4 Uporaba 2-cianoetil fosfata ... 11
1.2.1.5 Uporaba dimetil klorofosfata ... 12
1.2.1.6 Uporaba 2-dimetilamino-4-nitrofenil fosfata ... 12
1.2.1.7 Uporaba dibenzil *N,N*-diizopropil fosforoamidita ... 12
1.2.2 V tabeli predstavljen pregled uporabljenih reagentov. ... 15
1.3 Predzdravila fosfatov ... 17
1.3.1 Splošno o predzdravilih ... 17
1.3.2 Razlogi za pripravo predzdravil fosfatov ... 17
1.3.3 Vrste predzdravil fosfatov ... 19
1.3.3.1 Kemijsko labilne zaščitne skupine fosfatov ... 20
1.3.3.2 Biološko labilne zaščitne skupine fosfatov ... 20
1.3.4 Aciloksialkilne skupine ... 20
1.3.4.1 Sinteza pivaloiloksimetilnih predzdravil fosfatov ... 21

2 Namen dela **23**

3 Materiali in metode **27**

4 Rezultati in razprava **29**
4.1 Razvoj novih metod za pripravo predzdravil fosfatov ... 29
4.1.1 Sinteza novih reagentov za fosforiliranje ... 31
4.1.1.1 Sinteza novega reagenta bis(*i*-BOM) klorofosfata **4b** ... 33
4.1.1.2 Poskus sinteze drugih novih aciloksialkilnih klorofosfatnih reagentov ... 35
4.1.2 Uporaba novega reagenta za fosforiliranje različnih tipov alkoholov ... 37
4.1.2.1 Optimizacija reakcijskih pogojev za fosforiliranje ... 37

4.1.2.2 Fosforiliranje z novim reagentom, bis(*i*-BOM) klorofosfatom .. 41
4.1.2.3 Fosforiliranje v manj strupenih topilih 44
4.1.3 Eksperimentalno delo 47
4.1.3.1 Eksperimentalni podatki za sintezo bis(POM) klorofosfata **4a** 47
4.1.3.2 Eksperimentalni podatki za sintezo bis(*i*-BOM) klorofosfata **4b** 50
4.1.3.3 Eksperimentalni podatki za sintezo tris(AM) fosfata **2c** 53
4.1.3.4 Eksperimentalni podatki za fosforiliranje benzil alkohola **5a** z dietil klorofosfatom **7a** 54
4.1.3.5 Eksperimentalni podatki za fosforiliranje alkoholov z bis(*i*-BOM) klorofosfatom **4b** 55
4.1.3.6 Eksperimentalni podatki za fosforiliranje benzil alkohola v manj strupenih topilih 58
4.2 Sinteza fosforiliranih derivatov pantotenske kisline 59
4.2.1 Sinteza maskiranih derivatov fosfopantotenata 61
4.2.1.1 Sinteza etil D-pantotenata **10** 62
4.2.1.2 Priprava novih derivatov fosfopantotenata s komercialno dostopnimi klorofosfatnimi reagenti 65
4.2.1.3 Priprava novega derivata fosfopantotenata, maskiranega s POM skupinami 68
4.2.1.4 Priprava novega derivata fosfopantotenata, maskiranega z *i*-BOM skupinami, z uporabo novega reagenta bis(*i*-BOM) klorofosfata 69
4.2.2 Sinteza maskiranih derivatov fosfopantoteina 70
4.2.2.1 Sinteza S-acetilpanteteina **15** 71
4.2.2.2 Priprava novih derivatov fosfopanteteina s komercialno dostopnimi klorofosfatnimi reagenti 72
4.2.2.3 Priprava novega derivata fosfopanteteina, maskiranega s POM skupinami 73
4.2.2.4 Karakterizacija derivatov fosfopanteteina s pomočjo sodobnih NMR pristopov 74
4.2.3 Eksperimentalno delo 80
4.2.3.1 Eksperimentalni podatki za sintezo etil D-pantotenata **10** 80
4.2.3.2 Eksperimentalni podatki za sintezo maskiranih derivatov fosfopantotenata z uporabo komercialno dostopnih klorofosfatnih reagentov **7** 82
4.2.3.3 Eksperimentalni podatki za sintezo derivata fosfopantotenata, maskiranega s POM skupinami **11h** 88
4.2.3.4 Eksperimentalni podatki za sintezo derivatov fosfopantotenata, maskiranega z *i*-BOM skupinami **11i** 89
4.2.3.5 Eksperimentalni podatki za sintezo S-acetil-panteteina **15** 90
4.2.3.6 Eksperimentalni podatki za sintezo maskiranih derivatov fosfopanteteina z uporabo komercialno dostopnih klorofosfatnih reagentov **7** 92
4.2.3.7 Eksperimentalni podatki za sintezo derivata fosfopanteteina, maskiranega s POM skupinami **16d** 95

5 Zaključki **97**

Dodatek ^{1}H, ^{13}C in ^{31}P NMR spektri spojin **101**

Literatura **147**

Bibliografija **159**

Biografija **161**

Stvarno kazalo **163**

Kazalo shem

Shema 1.1: Biosinteza CoA.....2
Shema 1.2: Fosfatna predzdravila s povečano vodotopnostjo. 4
Shema 1.3: Fosforilni reagent, uporabljen za fosforiliranje pantotenske kisline. 5
Shema 1.4: Fosforiliranje pantotenske kisline z difenil klorofosfatom **U1**.....6
Shema 1.5: Fosforiliranje s fenil diklororfosfatom **U1'**. 7
Shema 1.6: Priprava 4'-fosfopanteteina z uporabo dibenzil klororfosfata **U2**. 7
Shema 1.7: Fosforiliranje pantetina z dibenzil klorofosfatom **U2**. 8
Shema 1.8: Sinteza 4'-fosfopanteteina. 8
Shema 1.9: Fosforiliranje pantotenske kisline z **U1** in **U2**. 9
Shema 1.10: Fosforiliranje pantotenonitrila **U14** z reagentom **U2**. 9
Shema 1.11: Fosforiliranje pantetina. 10
Shema 1.12: Fosforiliranje pantetina z reagentoma morfolino diklorofosfat in P1-difenil-P2-morfolid pirofosforoklorid. 11
Shema 1.13: fosforiliranje metilpantotenata z 2-cianoetilfosfatom **U4**. 11
Shema 1.14: Uporaba dimetil klorofosfata **U5**. 12
Shema 1.15: Uporaba **U6.** 12
Shema 1.16: Fosforiliranje derivatov panteteina z **U7**. 13
Shema 1.17: Fosforiliranje z **U7** ter z dialil-N,N-diizopropilfosforoamiditom **U7'**. 14
Shema 1.18: Predzdravilni koncept priprave fosfatnih estrov. 18
Shema 1.19: Najpogosteje uporabljeni tipi predzdravil fosfatov. 19
Shema 1.20: Zdravili Hepsera® in Viread®. 21
Shema 1.21: Odcep aciloksialkilnih skupin. 21
Shema 1.22: Tri različne metode priprave bis(POM) predzdravil fosfatov. 22
Shema 4.1: Koncept priprave novih klororfosfatnih reagentov. 31
Shema 4.2: Bis(*i*-BOM) klorofosfatni reagent. 36
Shema 4.3: Fosforiliranje alkoholov z bis(*i*-BOM) klorofosfatnim reagentom **4b**. 37
Shema 4.4: Primerjava reakcijskih pogojev: a) fosforiliranje z bis(POM) klorofosfatom **4a** **[99];** b) fosforiliranje z novim reagentom, bis(*i*-BOM) klorofosfatom **4b**. 43
Shema 4.5: Sinteza bis(POM) klorofosfata **4a**.. 47
Shema 4.6: Sinteza bis(i-BOM) klorofosfata **4b**. 50
Shema 4.7: Struktura maskiranih derivatov fosfopantotenata. 61
Shema 4.8: Načrt sinteze novih maskiranih derivatov fosfopantotenata **11**. 61
Shema 4.9: Tri različne metode priprave estrov pantotenske kisline. 62
Shema 4.10: Sinteza etil D-pantotenata **10**. 63
Shema 4.11: Fosforiliranje etil D-pantotenata **10** z dietil klorofosfatom **7a**. 65
Shema 4.12: Struktura maskiranih derivatov fosfopanteteina. 70
Shema 4.13: Načrt sinteze novih maskiranih derivatov fosfopanteteina **11.** 70
Shema 4.14: Sinteza S-acetilpanteteina **15**.. 71
Shema 4.15: Sinteza derivata fosfopanteteina, maskiranega s POM skupinami. 73

Kazalo slik

Slika 4.1: LC-MS analiza čistosti produkta **3b** po čiščenju.....34
Slika 4.2: Vpliv 4 različnih aril fosfororamidatnih predzdravil fosfopantotenata **1***, **2***, **4*** in **6*** v primerjavi s fosfopantotenatom za višanje jetrnega CoA.....60
Slika 4.3: Izseki NMR spektrov, ki prikazujejo vpliv ^{31}P na sklopitve z drugimi jedri.....74
Slika 4.4: Ločitev signalov v ^{1}H NMR spektru.....75
Slika 4.5: Derivat fosfopanteteina, maskiran z metilnimi skupinami **16b**.....76
Slika 4.6: COSY spekter derivata **16b**.....76
Slika 4.7: HSQC spekter derivata **16b**.....77
Slika 4.8: HMBC spekter derivata **16b**.....78
Slika 4.9: ^{1}H NMR spekter derivata **16b** z asigniranimi signali.....79
Slika 4.10: ^{13}C NMR spekter derivata **16b** z asigniranimi signali.....79

Kazalo tabel

Tabela 1.1: Kronološki pregled uporabljenih fosforilnih reagentov za pripravo fosforiliranih derivatov pantotenske kisline. 15
Tabela 4.1: Priprava klororfosfatnih reagentov z aciloksialkilnimi in alkiloksikarboniloksialkilnimi skupinami. 32
Tabela 4.2: Sinteza bis(*i*-BOM) hidrogen fosfata **3b**. 33
Tabela 4.3: Analiza reakcijske zmesi po reakciji **2c** s piperidinom. 35
Tabela 4.4: Primeri fosforiliranja z bis(POM) klorofosfatom **4a** iz literature. 37
Tabela 4.5: Vpliv uporabe različnih aminov in topil na fosforiliranje alkohola **5a** s klorofosfatnim reagentom **7a**. 38
Tabela 4.6: Vpliv količine klorofosfatnega reagenta **7a** 39
Tabela 4.7: Vpliv količine amina na potek fosforiliranja alkohola **5a** 39
Tabela 4.8: Vpliv reakcijskega časa na potek fosforiliranja alkohola **5a** 40
Tabela 4.9: Slepi eksperimenti za fosforiliranje alkohola **5a** 41
Tabela 4.10: Fosforiliranje alkohola **5a** z bis(*i*-BOM) klorofosfatom **4b**. 41
Tabela 4.11: Fosforiliranje alkoholov z bis(*i*-BOM) klorofosfatom **4b.** 42
Tabela 4.12: Razvrstitev ostankov topil glede na oceno tveganja. 45
Tabela 4.13: Primerjava poteka fosforiliranja s klororfosfatnim reagentom **7a** v diklorometanu in izbranih manj strupenih topilih. 46
Tabela 4.14: Primerjava fosforiliranja s v diklorometanu in 2-metiltetrahidrofuranu. 46
Tabela 4.15: Vpliv dodatka molekulskih sit na potek estrenja 63
Tabela 4.16: Vpliv količine žveplove (V) kisline na potek estrenja 64
Tabela 4.17: Vpliv reakcijskega časa na potek estrenja 64
Tabela 4.18: Fosforiliranje etil D-pantotenata **10** z različnimi komercialno dostopnimi klorofosfatnimi reagenti. 66
Tabela 4.19: Sinteza derivatov fosfopantotenata. 69
Tabela 4.20: Fosforiliranje S-acetilpanteteina **15** z različnimi komercialno dostopnimi klorofosfatnimi reagenti. 72

Kratice

AM	...	Acetiloksimetil
Ang.	...	Angleško
App	...	Oznaka za navidezeno obliko vrhov v NMR spektrih (ang. *apparent*)
Ar	...	Aril
Br	...	Oznaka za razširjene vrhove v NMR spektrih (ang. *broad signal*)
i-BOM	...	Izobutirilmetil
t-Bu	...	*Terc*-butil
CoA	...	Koencim A
COSY	...	Homonuklearna 2D-NMR korelacijska spektroskopija (ang. *correlation spectroscopy*)
DCM	...	Diklorometan
DMF	...	*N*,*N*-dimetilformamid
DABCO	...	1,4-diazabiciklo[2.2.2]oktan
DIPEA	...	*N*,*N*- diizopropiletilamin
DMAP	...	4-dimetilaminopiridin
DTT	...	1,4-ditiotreitol
Ekv.	...	Ekvivalent
EtOAc	...	Etil acetat
Et	...	Etil
GMP	...	Dobra proizvodna praksa (ang. *good manufacturing practice*)
HeptDirect	...	Ciklični 1-aril-1,3-propanil estri
HMBC	...	Heteronuklearna 2D-NMR korelacijska spektroskopija preko več vezi (ang. *heteronuclear multiple bond correlation*)
HSQC	...	Heteronuklearna 2D-NMR korelacijska spektroskopija preko ene vezi (ang. *heteronuclear single quantum correlation*)
IE	...	Ionsko-izmenjevalna kolona (ang. *ion exchange column*)
Me	...	Metil
MeCN	...	Acetonitril
2-MeTHF	...	2-metiltetrahidrofuran
NBIA	...	Nevrodegeneracija z akumulacijo železa v možganih (ang. *neurodegeneration with brain iron accumulation*)
PANK2	...	Gen, ki kodira za encim pantotenat kinaza
PDE	...	Dovoljena dnevna izpostavitev (ang. *permitted daily exposure*)
Ph	...	Fenil
PKAN	...	Nevrodegeneracija, povezana s pantotenat kinazo; ang. *Pantothenate kinase-associated neurodegeneration*
POC	...	Izopropiloksikarboniloksimetil
POM	...	Pivaloiloksimetil

i-Pr	...	*izo*-propil
SATE	...	S-aciltioetil
s. t.	...	Sobna temperatura
THF	...	Tetrahidrofuran

Poglavje 1

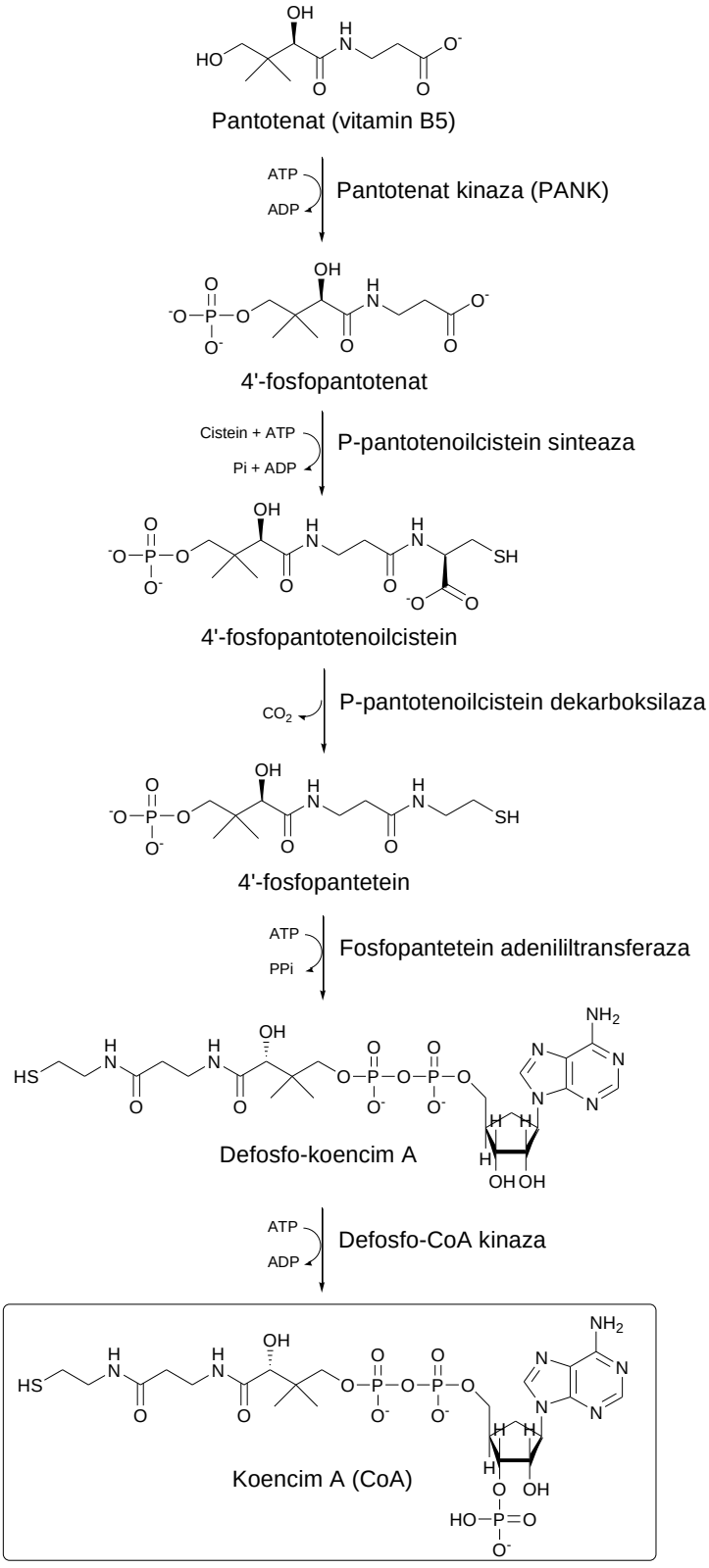
Uvod

1.1 Pantotenska kislina in njeni derivati

Pantotenska kislina (vitamin B5) je vodotopen vitamin, ki ga je leta 1933 odkril Roger J. Williams [1]. Spada v skupino vitaminov B-kompleksa in je kljub majhnosti in preprostosti molekule esencialna za živali in ljudi. Njeno ime izvira iz grške besede *panthos*, ki pomeni »od povsod«, saj se manjše količine pantotenske kisline nahajajo skoraj v vsej živeči materiji [2]. V naravi najdemo zgolj *(R)*-enantiomer vitamina (desnosučen, D-izomer), *(S)* oblika nima vitaminske aktivnosti [3]. Pantotenska kislina se v obliki kalcijevega pantotenata v velikih količinah uporablja predvsem kot dodatek h krmi živali ter v prehranskih dopolnilih v kombinaciji z ostalimi vitamini [4]. Pantotenska kislina in njeni naravni derivati (npr. pantenol) pa so zaradi njihovih blagodejnih lastnosti pogosto zastopani tudi v farmacevtskih in kozmetičnih izdelkih [3,5,6]. V bioloških sistemih ima pantotenska kislina vlogo prekurzorja za biosintezo koencima A (CoA), ki je ključen kofaktor v vseh živečih organizmih (Shema 1.1). Ocenjuje se, da CoA in njegovi tioesterni derivati sodelujejo v kar 4 % vseh reakcij v celicah ter da so ključni za potek več kot 100 različnih metabolnih reakcij, kot so reakcije Krebsovega cikla, biosinteza in degradacija lipidov, metabolizem aminokislin, biosinteza ketonskih telesc in holesterola [7,8].

Poleg že desetletja dobro poznane vloge CoA pri presnovnih reakcijah in celičnem metabolizmu pa so raziskave v zadnjih 20 letih razkrile precej širšo funkcionalnost CoA ter pokazale, da ta sodeluje tudi pri regulaciji številnih pomembnih ne-metabolnih procesov [9]. K temu je nedvomno močno pripomogla pojasnitev biosinteze CoA (Shema 1.1) ter identifikacija vseh z njo povezanih genov, kar je omogočilo razumevanje novih biokemijskih in fizioloških vlog CoA ter vodilo v številna nova odkritja [7]. Tako CoA danes med drugim povezujemo tudi s post-translacijskimi modifikacijami proteinov, signalizacijo, avtofagijo, biogenezo membran in aktivacijo zdravil [10].

Eno od pomembnih odkritij na tem področju pa je CoA in njegovo biosintezo povezalo tudi s specifičnimi oblikami nevrodegeneracije, kot je na primer nevrodegeneracija z akumulacijo železa v možganih (NBIA, *nevrodegeneration with brain iron accumulation*) [11-13]. Skoraj 50 % vseh zabeleženih primerov NBIA predstavlja nevrodegeneracija, povezana s pantotenat kinazo (PKAN, *Pantothenate kinase-associated neurodegeneration*), ki jo povzroča mutacija na genu *PANK2*, ki kodira za ključen encim za biosintezo CoA, pantotenat kinazo [11]. PKAN je avtosomna recesivna bolezen, ki se običajno razvije že v otroštvu z značilno distonijo, njen hiter napredek pa vodi v hudo invalidnost in v prezgodnjo smrt [13,14]. Trenutno ni na voljo nikakršne metode zdravljenja, ki bi preprečila napredovanje nevrodegeneracije, zato je razvoj novih zdravil na tem področju izjemnega pomena [15].



Shema 1.1: Biosinteza CoA [8].

Ker bolezen PKAN povzroča okvara encima pantotenat kinaza, so bile kot potencialne zdravilne učinkovine predlagane spojine, ki bi teoretično lahko »vskočile« v biosintezo CoA na točkah, nižjih od reakcije, ki jo katalizira ta encim [13]. Pantotenat kinaza v primeru normalnega delovanja katalizira fosforiliranje pantotenske kisline v fosfopantotenat, kar je prvi korak v biosintezi CoA (Shema 1.1). Fosforilirani derivati pantotenske kisline bi zato lahko služili kot učinkovine za nadomestno terapijo (*product replacement therapeutics).* Predpogoj za njihovo učinkovanje pa je, da obstaja pot do CoA, ki se za razliko od konvencionalno znane biosinteze ne začne nujno s pantotensko kislino. Vprašanje o možnosti uporabe teh alternativnih prekurzorjev CoA je v znanstveni stroki ostajalo odprto kar nekaj časa. Pred kratkim pa je bilo objavljeno, da molekula 4'-fosfopanteteina lahko služi kot nadomesten prekurzor, saj se ta znotraj celic lahko pretvori v CoA in s tem obnovi znotrajcelične količine CoA v celicah z okvarjeno biosintezo CoA [16]. Kmalu za tem je bila potrjena tudi možnost uporabe fosfopantotenata za obnovitev količin znotrajceličnega CoA, objavljena v neodvisni študiji [17]. Ti spodbudni rezultati nakazujejo, da je nadomestna terapija s fosforiliranimi derivati pantotenske kisline verjetna ter tako odpirajo nove obetavne možnosti za zdravljenje PKAN.

Obetavne so namreč tudi raziskave o biološki aktivnosti še enega derivata, ki je strukturno bližje CoA kot pa pantotenska kislina sama – pantetina (disulfidne, oksidirane oblike panteteina). Za pantetin je bilo že leta 1973 dokazano, da lahko služi kot alternativen prekurzor za CoA [18]. Številne novejše študije pa so pokazale, da ima uživanje tega derivata potencialne zmožnosti za zdravljenje zgodnjih oblik različnih nevrodegenerativnih bolezni [6,19]. V predkliničnih raziskavah je bilo na primer ugotovljeno, da pantetin preprečuje dopaminergično izgubo nevronov in motnje v gibljivosti pri Parkinsonovi bolezni [20].

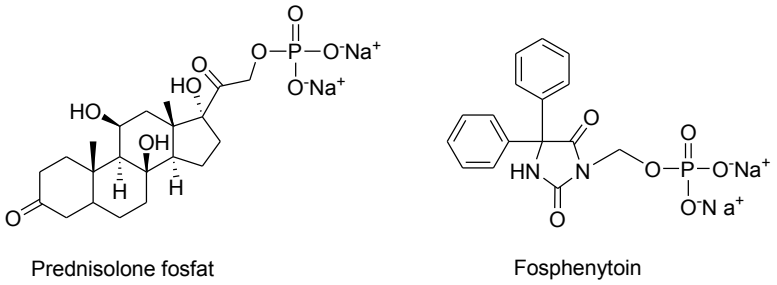
Poleg tega so bile uspešne tudi študije, v katerih je bilo pokazano, da pantetin znatno zniža raven celokupnega holesterola in LDL-holesterola, saj zvišuje raven CoA v celicah in tako ugodno vpliva na lipoproteinski metabolizem [21]. V nasprotju s fosforiliranimi derivati je pantetin komercialno dostopna spojina. Kljub temu pa je možnost njegove klinične uporabe omejena zaradi dejstva, da v primeru peroralne administracije pantetin hitro razpade, in sicer najprej na pantetein, ta pa se dalje hidrolizira v pantotenat in cisteamin [22].

Ker so fosforilirani derivati pantotenske kisline strukturno še bližje CoA kot pantetin, bi te spojine nemara lahko imele še večje terapevtsko učinkovanje na bolezni, povezane z biosintezo CoA, in s tem močno pripomogle k javnemu zdravju in zviševanju kvalitete življenja.

Večina objav v strokovni literaturi, povezanih s fosforiliranimi derivati pantotenske kisline, zajema njihovo pripravo z namenom nadaljnje sinteze CoA ali njegovih analogov in je bila objavljena v obdobju pred 1990. Ponovljivost starejših objavljenih receptur je pogosto vprašljiva, saj so bile sinteze objavljene v času, ko je bila dostopnost analitskih metod omejena. Nekoliko novejša literatura pa pogosto vključuje večstopenjske postopke ter zahtevne eksperimentalne pogoje. Celokupni izkoristki so v teh primerih praviloma slabi, sinteza, izolacija in čiščenje pa zahtevni za izvedbo, kar je še posebej velika ovira pri sintezi večjih količin spojin. Predvsem zaradi odkritja povezave med motnjami v biosintezi CoA ter nevrodegenerativnimi boleznimi iz skupine NBIA [11,12] so v zadnjem času fosforilirani derivati ponovno pritegnili veliko pozornosti v znanstveni stroki [16,17]. Žal pa je kljub pomembnosti in velikemu potencialu teh spojin njihova uporaba v bioloških študijah še vedno zelo omejena zaradi pomanjkanja enostavnih in zanesljivih metod za njihovo pripravo ter izolacijo. Pregled obstoječe literature s področja priprave fosforiliranih derivatov pantotenske kisline in derivatov je zbran v naslednjem poglavju.

1.2 Fosforiliranje pantotenske kisline in njenih derivatov

Fosforiliranje je zelo zanimiva kemijska reakcija za vrsto različnih substratov. Fosfatni estri se tvorijo pri kondenzaciji fosfatnega preostanka s hidroksilno skupino, ki je prisotna v proteinih, ogljikovih hidratih in v številnih drugih organskih molekulah. Tovrstna transformacija lahko bistveno spremeni fizikalne, kemijske in biološke lastnosti substrata, saj pri tem med drugim pride do spremembe topnosti, električnega naboja in proteinske prepoznavnosti spojine [23]. Fosforiliranje v bioloških sistemih večinoma poteka z ATP in je katalizirano z različnimi encimi, kinazami. Biološke molekule s fosfatno skupino predstavljajo velik delež celičnega matriksa [24]. Številne med njimi najdemo prav v obliki fosfatnih monoestrov, in sicer med nukleotidi, proteini, ogljikovi hidrati, lipidi, koencimi in steroidi [24]. Poleg bioloških molekul s fosfatno skupino je pomembnost fosfatne skupine podkrepljena tudi z njeno pogosto prisotnostjo med spojinami v farmacevtski kemiji, še posebej kadar je potrebna sinteza predzdravil s povečano topnostjo v vodi [25,26]. Pirmer sta predzdravili Fosphenytoin [27] in Prednisolone fosfat [28] (Shema 1.2).



Shema 1.2: Fosfatna predzdravila s povečano vodotopnostjo.

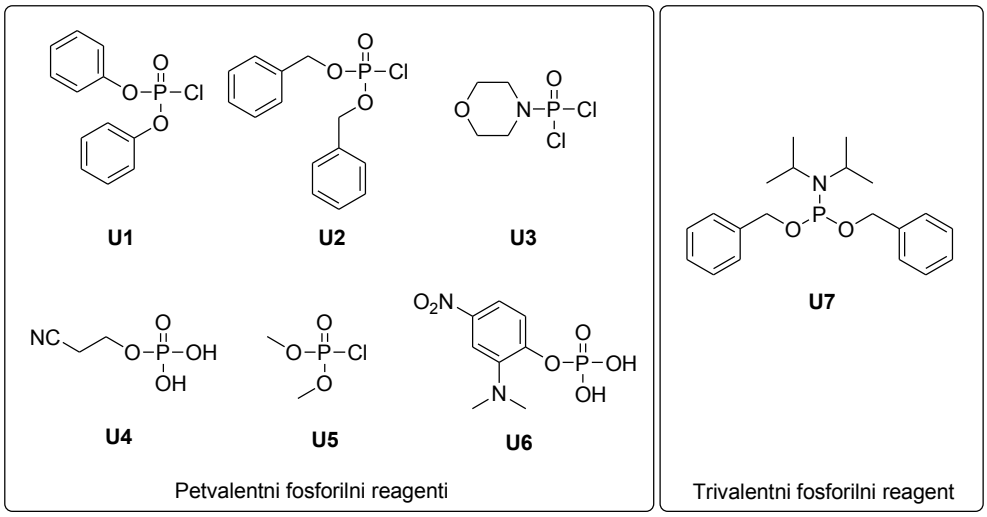
Fosfatni monoestri so pomembni v kemiji materialov [29,30]. Poleg tega pa njihovo pomembnost poudarjajo številne študije o farmakološko aktivnih fosfatih, objavljenih v novejši literaturi, med katere zagotovo sodijo tudi fosforilirani derivati pantotenske kisline.

1.2.1 Pregled objavljene literature

Kot že omenjeno, je večina literature s tega področja starejše, objavljene pred letom 1990. Raziskovalci so pantotensko kislino in njene derivate v večini primerov fosforilirali z namenom sinteze novih derivatov in analogov CoA, saj so te spojine pogosto uporabljene v študijah mehanizmov različnih encimskih reakcij ali njihove inhibicije, sintetizirali pa so jih bodisi kemijsko, encimatsko ali pa s kombinacijo obeh metod [31].

Poleg fosforiliranja s fosforjevo (V) kislino, fosforjevim (V) oksidom ter s piro- in polifosfornimi kislinami, se biološke molekule večinoma fosforilira z uporabo različnih fosforilnih reagentov [24,32]. Fosforilni reagenti so spojine, ki omogočajo prenos skupine $(HO)_2P(O)$- v prosti ali pa esterski obliki [33]. Tudi pantotensko kislino in njene derivate so raziskovalci najpogosteje fosforilirali z različnimi reagenti. Najpogosteje uporabljene reagente za fosforiliranje teh spojin prikazuje Shema 1.3.

V literaturi iz petdesetih in šestdesetih let sta bila kot najbolj obetavna reagenta najpogosteje uporabljena difenil klorofosfat (Shema 1.3, **U1**) ter njegov analog dibenzil klorofosfat (Shema 1.3, **U2**). Naslednji fosforilni reagent, ki je bil tudi uporabljen za fosforiliranje pantotenske kisline in derivatov, je morfolino diklorofosfat (Shema 1.3, **U3**). Ostali petvalentni reagenti, ki jih je moč zaslediti v literaturi s tega področja, so še 2-cianoetil fosfat (Shema 1.3, **U4**), dimetil klorofosfat (Shema 1.3, **U5**) in 2-dimetilamino-4-nitrofenil fosfat (Shema 1.3, **U6**). Poleg petvalentnih pa so raziskovalci za fosforiliranje uporabili tudi trivalentni reagent dibenzil *N,N*-diizopropilfosforoamidat (Shema 1.3, **U7**), in sicer predvsem v novejših študijah.



Shema 1.3: Fosforilni reagent, uporabljen za fosforiliranje pantotenske kisline in njenih derivatov.

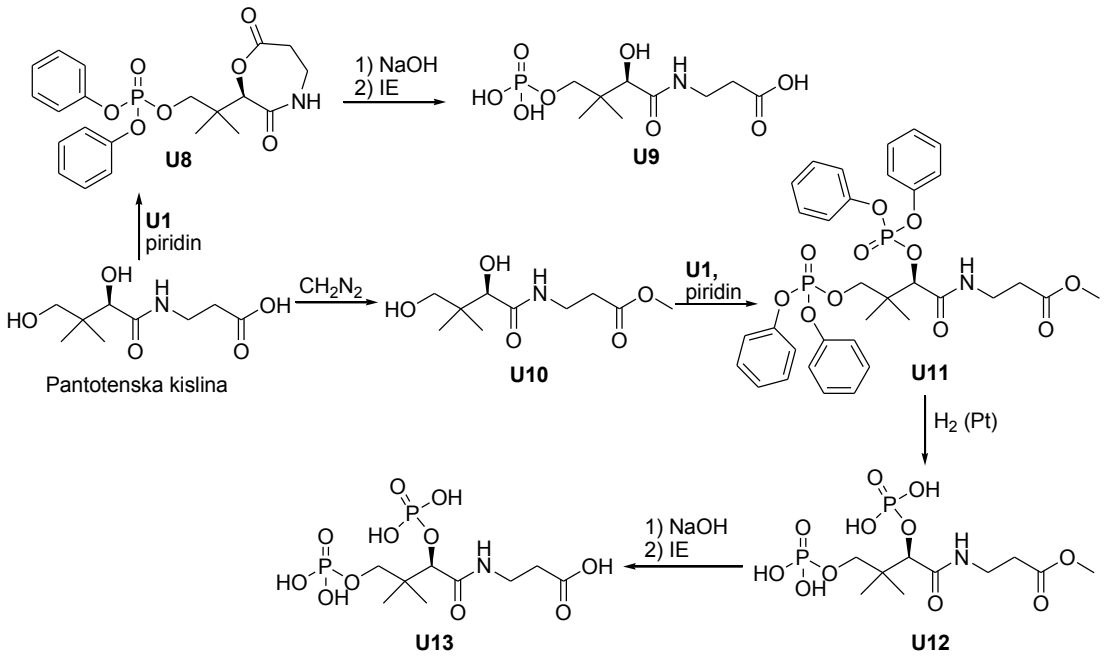
1.2.1.1 Prvi primeri priprave fosforiliranih derivatov pantotenske kisline ter uporaba difenil klorofosfata

Prvo sintezo fosforiliranega derivata pantotenske kisline je objavil Woolley leta 1940 [34]. Fosfat DL-pantotenske kisline je pripravil z direktnim fosforiliranjem s fosforil kloridom ($POCl_3$) v piridinu. Fosforiliranje naj bi vodilo do nastanka difosfata **U13**, vendar struktura ni bila točneje dokazana.

Leta 1950 je bilo že znano, da fosforilirani derivati pantotenske kisline igrajo pomembno vlogo v biokemijskih procesih, kljub temu da struktura CoA v tem času še ni bila znana. Prizadevanja za pripravo različnih fosforiliranih derivatov so se zato

nadaljevala. Ker je bilo več raziskovalcev pri ponavljanju Woolleyjeve metode neuspešnih, so za uspešno fosforiliranje preučevali uporabnost drugih reagentov [35]. Za uspešno se je izkazala izbira difenil klorofosfatnega reagenta, ki sta ga uporabila raziskovalca King in Strong [35]. Z njim sta pripravila tako difosforiliran derivat pantotenske kisline **U13** kot tudi monofosforiliranega s fosfatno skupino na terminalni (4'-) hidroksilni skupini **U9** (Shema 1.4). Nastanek difosfatnega produkta **U13** sta opazila, če sta za izhodni substrat uporabila metilpantotenat **U10**, medtem ko je monofosfat **U9** nastal pri direktnem fosforiliranju pantotenske kisline. V obeh primerih je reakcija med difenil klorofosfatom in izbranim substratom potekala v piridinu in vodila do nastanka vmesnih fosforiliranih produktov **U8** ali **U11**. Odstranitev fenilnih skupin s fosfata sta pri difosforiliranem vmesnem produktu **U11** dosegla z reduktivno cepitvijo z molekularnim vodikom v prisotnosti Adamovega katalizatorja, v primeru monofosfatnega vmesnega produkta **U8** pa kar z alkalno hidrolizo (Shema 1.4).

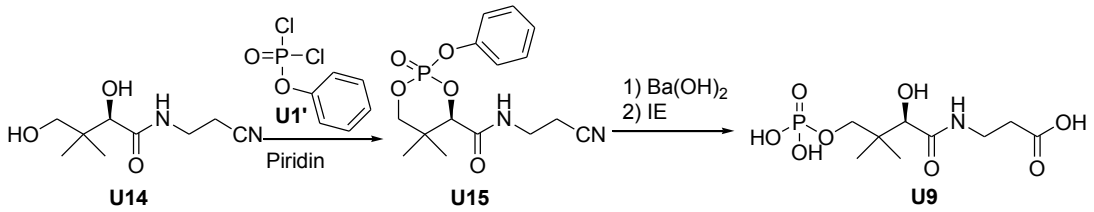
Raziskovalca sta nadaljevala s pripravo in preučevanjem lastnosti fosfatov pantotenske kisline. V kasnejših publikacijah sta ponovno objavila postopek priprave difosfosforilirane pantotenske kisline **U13** izhajajoč iz metilpantotenata **U10** ter sintezo monofosforilirane pantotenske kisline **U9** iz proste pantotenske kisline z uporabo difenil klorofosfata **U1** [36,37]. Pantotensko kislino sta sprva pripravljala iz komercialno dostopnega kalcijevega D-pantotenata z oksalno kislino v vodni raztopini. Ker je pantotenska kislina pri tem postopku ostajala kontaminirana s sledovi kalcijeve soli, sta razvila primernejšo metodo, ki je vključevala spuščanje vodne raztopine kalcijeve soli čez ionsko izmenjevalno kolono v protonirani obliki (IE, Amberlite IR-100) [36]. Ker pri odstranitvi fenilnih skupin s 4'-difenilfosfopantotenske kisline **U8** z vodikom na platini nista bila uspešna, sta odcepitev fenilnih skupin na tem substratu ponovno dosegla s segrevanjem intermediata v 1 M NaOH [37].



Shema 1.4: Fosforiliranje pantotenske kisline z difenil klorofosfatom **U1** [35].

4'-fosfopantotensko kislino **U9** je pripravljal tudi Atherton, in sicer s fosforiliranjem pantotenatnitrila **U14** z analogom fosforilnega reagenta fenil diklorofosfata **U1'**, ki mu je sledila hidroliza z barijevim hidroksidom (Shema 1.5) [38]. Za ustrezno terciarno bazo pri

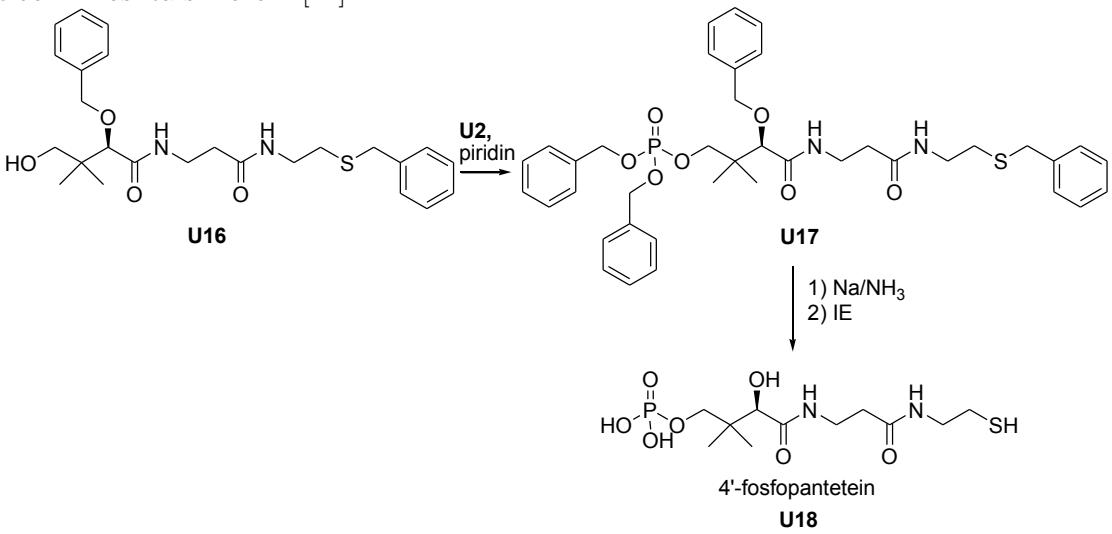
fosforiliranju je bil v tudi tem primeru izbran piridin, ostali podatki o reakcijskih pogojih pa so skromni, omejeni na opis, da je reakcija najprej potekala pri znižani nato pa pri povišani temperaturi.



Shema 1.5: Fosforiliranje s fenil diklorорfosfatom **U1'** [38].

1.2.1.2 Primeri uporabe dibenzil klorofosfata

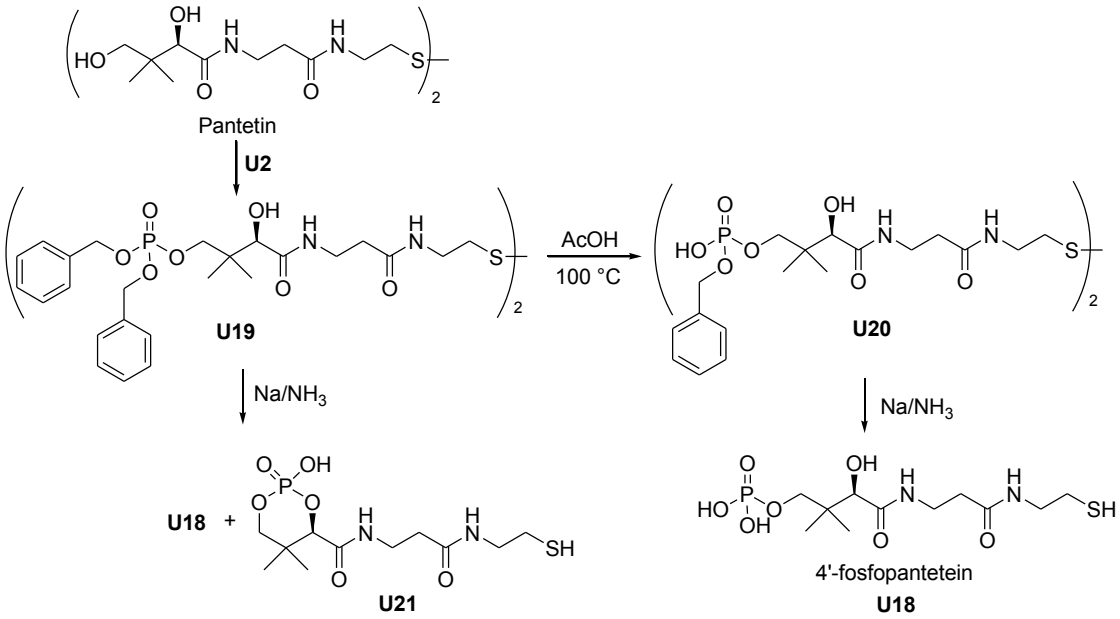
Leta 1953 je bila prvič objavljena struktura CoA, ki jo je uspela določiti raziskovalna skupina pod vodstvom raziskovalca Baddileya [39]. Poleg tega so raziskovalci istega leta sintetizirali 4'-fosfopantetein **U18**, takrat znan kot razpadni produkt CoA [40,41]. Sintezo so dosegli z direktnim fosforiliranjem 2'-O,S-dibenzilnega etra panteteina **U16** z dibenzil klorofosfatnim reagentom **U2**, ki mu je sledila odstranitev benzilnih skupin z natrijem v tekočem amoniaku in kolona z ionskim izmenjevalcem v protonirani obliki (Shema 1.6) [40,41]. Pri reakciji uporabljen reagent dibenzil klorofosfat **U2** pa je bil pripravljen iz dibenzil fosfita s klorom [42].



Shema 1.6: Priprava 4'-fosfopanteteina z uporabo dibenzil klororfosfata **U2** [37].

Tudi raziskovalca Moffat in Khorana, ki sta prva objavila totalno sintezo CoA leta 1958, sta pripravljala 4'-fosfopantetein **U18** z uporabo dibenzil klorofosfatnega reagenta **U2** [43,44]. 4'-fosfopantetein je bil v njunem primeru uporabljen kot prekurzor za nadaljnjo sintezo CoA, pripravila pa sta ga iz enakega izhodnega substrata, 2'-O,S-dibenzilpanteteina **U16,** in z nekoliko modificiranim sinteznim postopkom, ki sta ga pred tem razvila raziskovalca Baddiley in Thain, ki ga prikazuje Shema 1.6 [40].

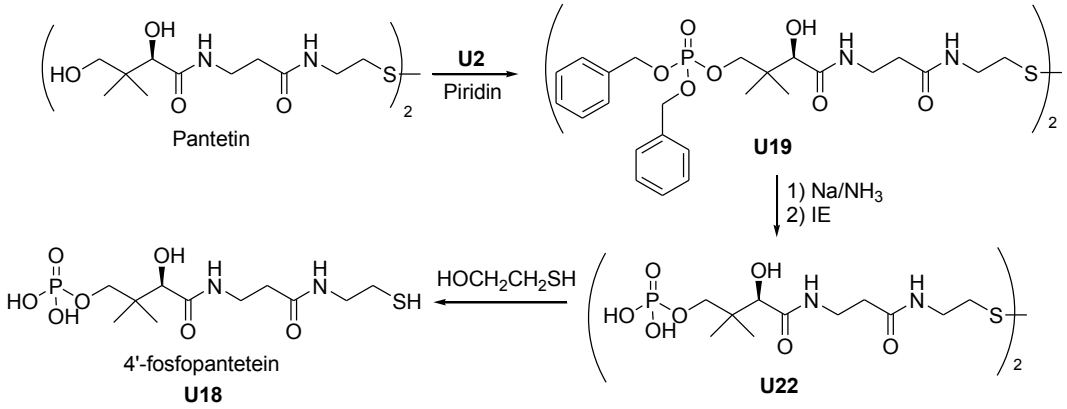
Raziskovalca Moffat in Khorana sta študirala tudi možnost direktnega fosforiliranja pantetina (disulfidne, oksidirane oblike panteteina) z dibenzil klorofosfatom **U2**, ki ji je sledila sočasna odstranitev benzilnih skupin ter redukcija disulfidne vezi z natrijem v tekočem amoniaku (Shema 1.7) [44].



Shema 1.7: Fosforiliranje pantetina z dibenzil klorofosfatom **U2** [44].

Po redukciji sta poleg 4'-fosfopanteteina **U18** opazila nastanek še enega fosforiliranega produkta s predlagano strukturo **U21** (Shema 1.6). Nastanek neželenega produkta **U21** sta preprečila s predhodno reakcijo pantetin 4',4''-bis-benzilfosfata **U19** s 50 % ocetno kislino pri 100 °C, saj naj bi v tem primeru po reakciji z natrijem v amoniaku dobila zgolj željeni 4'-fosfopantetein **U18**.

Leta 1964 je Michelson objavil izboljšano kemijsko sintezo CoA (izboljšana stopnja sinteze Pl-adenozin (2',3'-ciklo fosfat)-5'-P2-difenilpirofosfata) [45]. Tudi v tem primeru je bila za pripravo 4'-fosfopanteteina uporabljena modifikacija že znane recepture raziskovalcev Moffat in Khorana [44]. Tudi Michelson je brezvodni pantetin fosforiliral z dibenzilnim reagentom **U2** v suhem piridinu (Shema 1.8). Odščito benzilnih skupin s tako dobljenega pantetin 4',4''-bis-benzilfosfata **U19** je dosegel direktno z natrijem v amoniaku in z obdelavo vmesnega produkta z ionsko izmenjevalno smolo (Amberlite IR120). Dobljeni 4',4''-difosfopantetin **U22** pa je reduciral v 4'-fosfopantetein **U18** z 2-merkaptoetanolom (Shema 1.8).

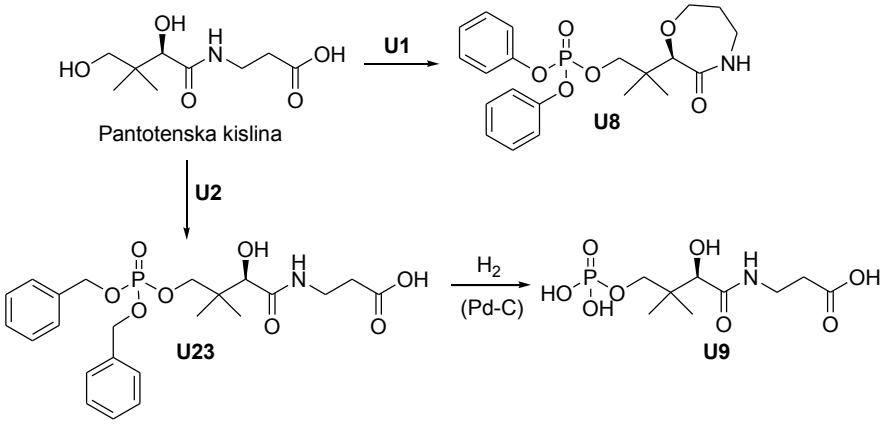


Shema 1.8: Sinteza 4'-fosfopanteteina [45].

Reagent **U2** je bil pod podobnimi pogoji v šestdesetih letih nato še večkrat uporabljen za sintezo fosfopanteteinskih prekurzorjev, ki so bili uporabljeni za pripravo različnih derivatov CoA [46-48].

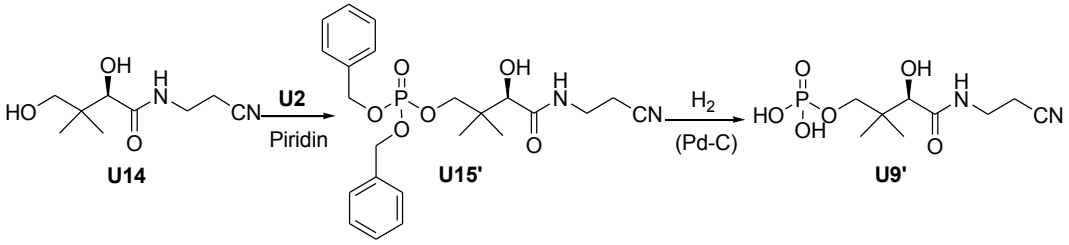
V objavi iz leta 1967 so raziskovalci pod podobnimi pogoji kot predhodniki uporabili oba reagenta, tako dibenzil klorofosfat **U2** kot difenil klorofosfat **U1**, in sicer za fosforiliranje pantotenatnitrila **U14** in pantotenske kisline [49]. V isti študiji je bil uporabljen tudi cianoetil klorofosfat **U4**, katerega uporaba je podrobneje opisana v enem izmed naslednjih poglavij.

Ker so bili vsi predhodno uporabljeni postopki dolgi in so pogosto vodili do nastanka stranskih produktov, je tudi raziskovalna skupina pod vodstvom Yoshioka leta 1969 objavila študijo uporabe obeh klorofosfatnih reagentov **U1** in **U2** za učinkovitejšo pripravo 4'-fosfopantotenata **U9** (Shema 1.9) [50]. Enostavnejšo metodo so razvili na podlagi ugotovitve, da se pri uporabi dibenzil klorofosfatnega reagenta **U2** primarna (4'-) hidroksilna skupina fosforilira veliko lažje od sekundarne. Ugotovili so tudi, da v primeru uporabe difenil klorofosfata **U1** pride znotraj molekule do tvorbe laktona **U8**, medtem ko pri uporabi dibenzil klorofosfata **U2** do nastanka laktona znotraj vmesnega produkta **U23** ne pride, kar je bilo potrjeno na podlagi IR absorpcije (Shema 1.9).



Shema 1.9: Fosforiliranje pantotenske kisline z **U1** in **U2** [50].

Leta 1970 je kemijsko sintezo analogov CoA objavil Shimizu [51]. Fosforilirane prekurzorje je pripravil s fosforiliranjem pantotenonitrila **U14** z dibenzil klorofosfatom **U2** v piridinu pri -40 °C (Shema 1.1, Shema 1.10).



Shema 1.10: Fosforiliranje pantotenonitrila **U14** z reagentom **U2** [51].

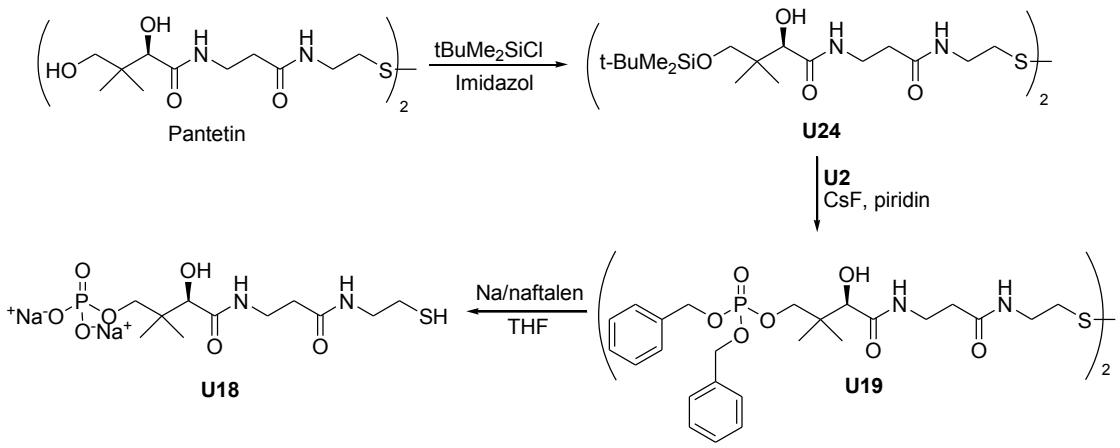
Različne prekurzorje za sintezo analogov CoA sta pripravljala tudi Henry in Mautner, in sicer z uporabo istega reagenta **U2**, s katerim sta fosforilirala različne derivate panteteina [52].

Totalno sintezo CoA sta leta 1977 objavila tudi Hashimoto and Mukaiyama, ki sta tako kot njuni predhodniki za ustrezen prekurzor uporabila 4'-fosfopantetein **U18** [53].

Za izhodni substrat sta si izbrala pantotensko kislino, jo pretvorila v pantetin in ga fosforilirala z dibenzil klorofosfatom **U2** v piridinu. Temu pa je sledila deprotekcija z natrijem v amoniaku. Redukcijo S-S vezi sta dosegla z uporabo 2-merkaptoetanola.

Z namenom nadaljnje sinteze različnih derivatov CoA sta z uporabo istega reagenta **U2** pripravila 4'-fosfopantetein **U18** tudi Gerngross in Martin leta 1995 [54]. Sintezo sta začela s fosforiliranjem pantetina pod enakimi reakcijskimi pogoji, kot jih je objavil Shimizu [51], v naslednjem koraku pa sta 4',4''-difosfopantetin **U22** reducirala v monomerno obliko.

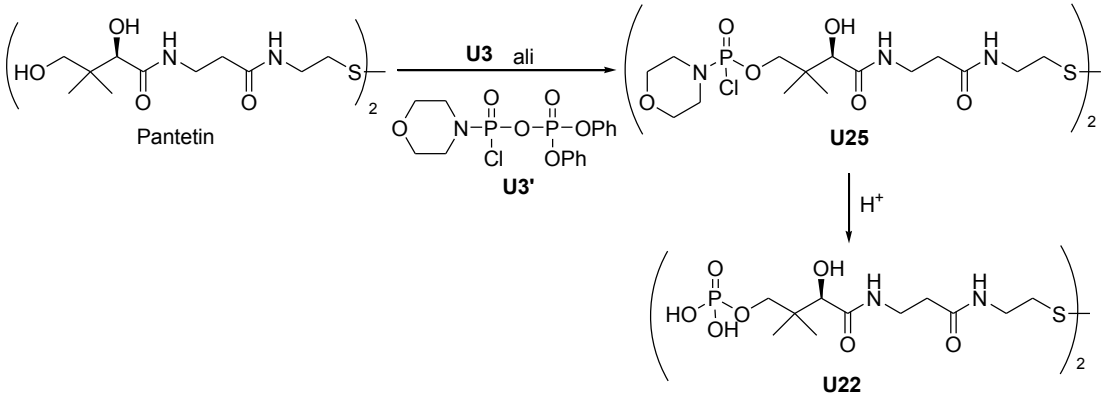
Eden od zadnjih primerov uporabe dibenzil klorofosfatnega reagenta **U2** za fosforiliranje pantotenske kisline in njenih derivatov je bil objavljen leta 2006 [55]. Raziskovalci so fosforilirali siliriran pantetin **U24** v piridinu v prisotnosti CsF (Shema 1.11). Pri direktnem fosforiliranju nesililiranega substrata niso bili uspešni. Predpostavili so, da ima terminalna OH skupina pantetina šibke nukleofilne lastnosti, za kar bi bila lahko kriva tvorba intermolekularne vodikove vezi z sekunadarno OH skupino. Zato so pripravili sililni eter **U24**, ki te vezi ne more tvoriti. Cepitev sililnega etra so dosegli in situ z CsF, ga fosforilirali v produkt **U19**. Reduktivno cepitev benzilnih skupin pa so dosegli s kombinacijo natrija in naftalena v THF pri -40 °C in dobili natrijevo sol 4'-fosfopanteteina **U18**.



Shema 1.11: Fosforiliranje pantetina [55].

1.2.1.3 Uporaba morfolino diklorofosfata

Naslednji fosforilni reagent, uporabljen za fosforiliranje derivata pantotenske kisline, je bil prvotno razvit za fosforiliranje nukleozidov, saj omogoča odcep zaščitne skupine pod milimi kislimi pogoji [56]. Gre za reagent morfolino diklorofosfat **U3**. Za fosforiliranje pantotenske kisline je bil uporabljen leta 1967, in sicer za pripravo prekurzorja za sintezo CoA, 4',4''-difosfopantetina **U22** [57]. V isti študiji so raziskovalci uporabili tudi reagent P1-difenil-P2-morfolid pirofosfoklorid **U3'**. V obeh primerih je fosforiliranje vodilo do nastanka fosforomorfolidata panteina **U25**, ki mu je sledila kislinska hidroliza (Shema 1.12).

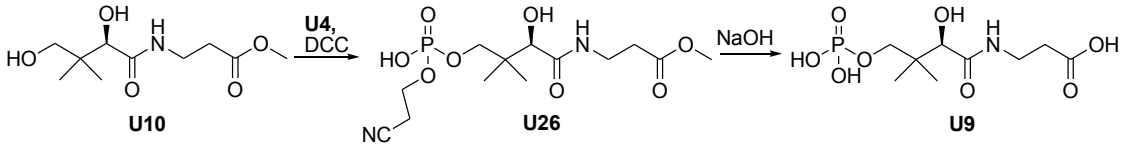


Shema 1.12: Fosforiliranje pantetina z reagentoma morfolino diklorofosfat in P1-difenil-P2-morfolid pirofosforoklorid.

Reagent U3 je bil v isti raziskovalni skupini uporabljen še leta 1979, in sicer za fosforiliranje S-sulfopanteteina [58].

1.2.1.4 Uporaba 2-cianoetil fosfata

Predstavnik fosfatnih monoestrov, uporabnih za fosforiliranje v prisotnosti ustreznih aktivacijskih reagentov (npr. karbodiimidov), je 2-cianoetil fosfat **U4** [59]. Pri tej reakciji gre za tvorbo fosfatnega diestra, zaščitno skupino pa je potrebno odstraniti v naslednji stopnji. Za fosforiliranje derivatov pantotenske kisline je bil ta reagent prvič preizkušen leta 1966 [49]. Raziskovalci so z njim fosforilirali metil-pantotenat **U10** v prisotnosti *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimida (DCC), temu pa je sledila hidroliza z NaOH, ki je vodila do nastanka 4'-fosfopantotenske kisline **U9 (**Shema 1.13).



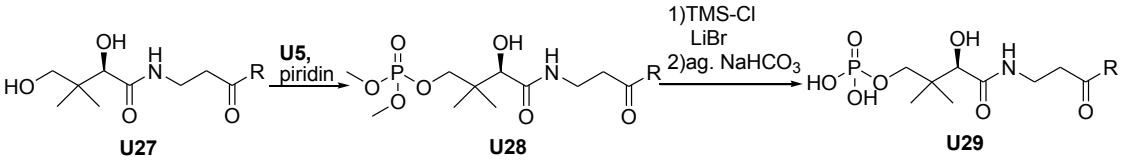
Shema 1.13: fosforiliranje metilpantotenata z 2-cianoetilfosfatom **U4** [49].

Kasneje je bil reagent **U4** uporabljen tudi za fosforiliranje pantetina pri pripravi več analogov CoA z modificiranim cisteaminskim delom [60]. Tudi v tem primeru je reakcija potekala v prisotnosti DCC reagenta ter po hidrolizi v drugi stopnji vodila do nastanka 4',4''-difosfopantetina.

Leta 1981 je bil 2-cianoetil fosfat **U4** ponovno uporabljen za sintezo 4'-fosfopantotenske kisline **U9**, in sicer pod podobnimi pogoji, kot jih prikazuje (Shema 1.13) [61]. Nekoliko kasneje pa je bil **U4** uporabljen še za fosforiliranje izotopsko označene pantotenske kisline za potrebe študije biotransformacij pantotenata, panteteina in fosfopantotenata v podganjih jetrih s pomanjkanjem pantotenske kisline [62]. Istega leta sta reagent **U4** za fosforiliranje amina pantotenske kisline uporabila tudi raziskovalca Michenfelder in Rétey [63]. V isti raziskovalni skupini pa je bil reagent ponovno uporabljen še leta 1993 in 1994, in sicer za sintezo različnih derivatov fosfopanteteina, ki so služili za pripravo analogov CoA [64,65].

1.2.1.5 Uporaba dimetil klorofosfata

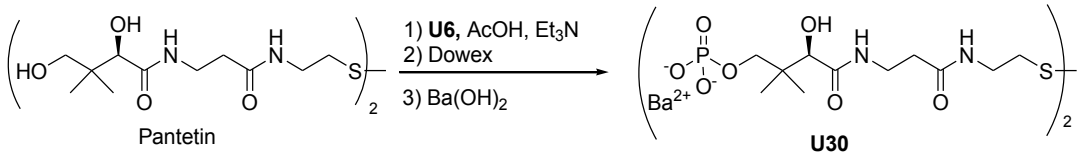
Leta 1992 so raziskovalci objavili kombiniran kemijsko-encimatski pristop k sintezi CoA in njegovih derivatov [66]. Kot ustrezne prekurzorje so v tej študiji uporabili različne fosforilirane derivate panteteina, ki so bili nato encimatsko pretvorjeni v končne produkte. Fosforilirane spojine so selektivno pripravili z dimetil klorofosfatnim reagentom **U5** v piridinu (Shema 1.14). Odcep metilne skupine iz tako nastalih dimetilfosforiliranih spojin s splošno formulo **U28** pa so dosegli s trimetilsilil kloridom in litijevim bromidom v acetonitrilu. Pod enakimi pogoji so v nekoliko razširjeni študiji avtorji uporabili reagent **U5** še leta 1994 [67].



Shema 1.14: Uporaba dimetil klorofosfata **U5** [66,67].

1.2.1.6 Uporaba 2-dimetilamino-4-nitrofenil fosfata

Še eden od monoesterskih fosfatnih reagentov, ki se poleg prej omenjenega 2-cianoetil fosfata **U4** uporablja za fosforiliranje alkoholov, je dimetilamino-4-nitrofenil fosfat **U6**. Za pripravo fosforiliranih derivatov pantotenske kisline ga je leta 1976 uporabil Taguchi s sodelavci, in sicer za pripravo derivatov CoA [68]. 4',4''-difosfopantetin **U22**, ki je bil uporabljen kot prekurzor za nadaljnjo sintezo, so raziskovalci najprej pripravili po Michelsonovi metodi, ki jo prikazuje Shema 1.8 [45]. Avtorjem se je ta metoda zdela preveč težavna, ker vključuje tri korake – fosforiliranje pantetina z dibenzil klorofosfatom **U2**, odščito 4'-dibenzilfosfopantetina ter redukcijo S-S vezi. Zato so razvili enostopenjsko sintezo z uporabo 2-dimetilamino-4-nitrofenil fosfata **U6**. Željen fosforiliran produkt so enostavno pripravili v obliki barijeve soli **U30** z reakcijo 1 ekvivalenta pantetina in 2 ekvivalentov reagenta **U6** v prisotnosti ocetne kisline in trietilamina v piridinu pri temperaturi refluksa (Shema 1.15) [68]. Reakciji je sledila ionsko izmenjevalna kromatografija (Dowex 50W x 8) in priprava barijeve soli. Avtorji so poudarili, da je za dobre rezultate ključna suhost vseh uporabljenih reagentov (tudi pantetina), saj je reakcija fosforiliranja zelo občutljiva na vodo [68].



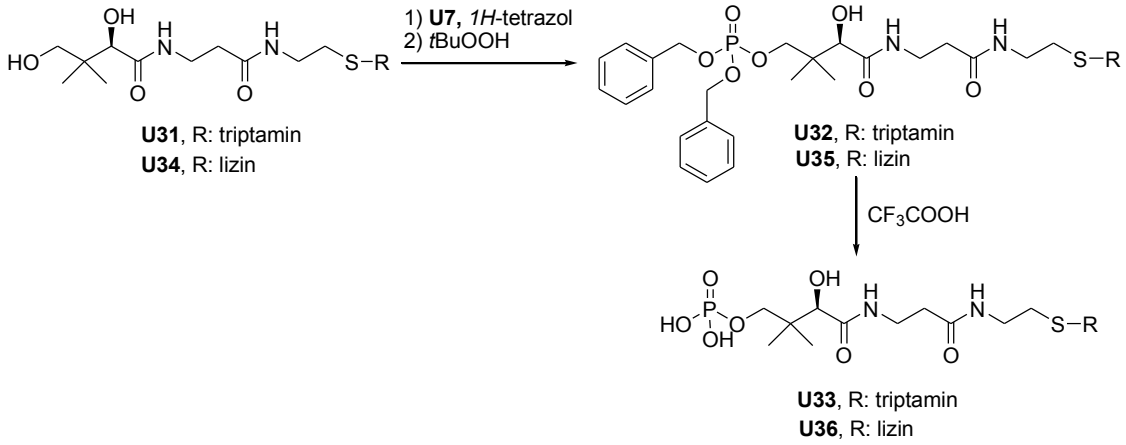
Shema 1.15: Uporaba **U6.**

1.2.1.7 Uporaba dibenzil *N,N*-diizopropil fosforoamidita

Raziskovalci so fosforilirane derivate pantotenske kisline pripravljali tudi z reagentom dibenzil N,N-diizopropil fosforoamiditom **U7**. Za razliko od prej uporabljenih reagentov ta ni tetrakoordinirana fosforjeva spojina, ampak trikordinirana P^{III} spojina. P^{III} fosforilni reagenti so za sintezo bioloških fosfatov zelo pomembni, njihova uporaba pa je na to področje doprinesla velik napredek. Ker P^{III} reagenti v obliki >P-X spojin vsebujejo primerne izstopajoče skupine, ki jih je mogoče odstraniti, so pri sintezi bioloških fosfatov

in njihovih analogov nepogrešljivi. [69] V primerjavi s P^V fosforilnimi reagenti tipa >P(O)-X so neprimerljivo bolj reaktivni za nukleofilno substitucijo na fosforjevem centru [69]. Zato so P^{III} reagenti uporabni tudi za fosforiliranje manj reaktivnih substratov, kot so nukleozidi [32]. Žal pa uporaba P^{III} reagentov doprinese dodaten korak k sintezi fosforiliranih spojin, in sicer oksidacijo fosforja iz oksidativnega stanja III v V, pri čemer lahko pride do tvorbe stranskih produktov.

Dibenzil *N,N*-diizopropil fosforoamidit **U7** je v novejši literaturi najpogosteje uporabljen reagent za fosforiliranje pantotenske kisline in njenih derivatov. Prvi primer uporabe reagenta na tem področju je bil objavljen leta 1999, in sicer za fosforiliranje derivata panteteina **U31** [70]. Raziskovalci so fosforiliranje dosegli v treh korakih, kot jih prikazuje Shema 1.16. Prvi korak je regioselektivna reakcija primarne hidroksilne skupine z dibenzil *N,N*- izopropil fosforoamiditom **U7** v prisotnosti *1H*-tetrazola, čemur sledi oksidacija s *t*-butil peroksidom v ustrezen dibenzil fosfatni triester **U32** ter odščita benzilnih skupin v zadnjem koraku do **U33**, ki so jo dosegli s kislinsko hidrolizo s 95 % vodno raztopino trifluoroocetne kisline (Shema 1.16) [70]. Na podoben način je bil z uporabo reagenta **U7** nekaj let kasneje pod enakimi eksperimentalnimi pogoji pripravljen še en na žveplu substituiran derivat 4'-fosfopanteteina **U36** (Shema 1.16) [71].

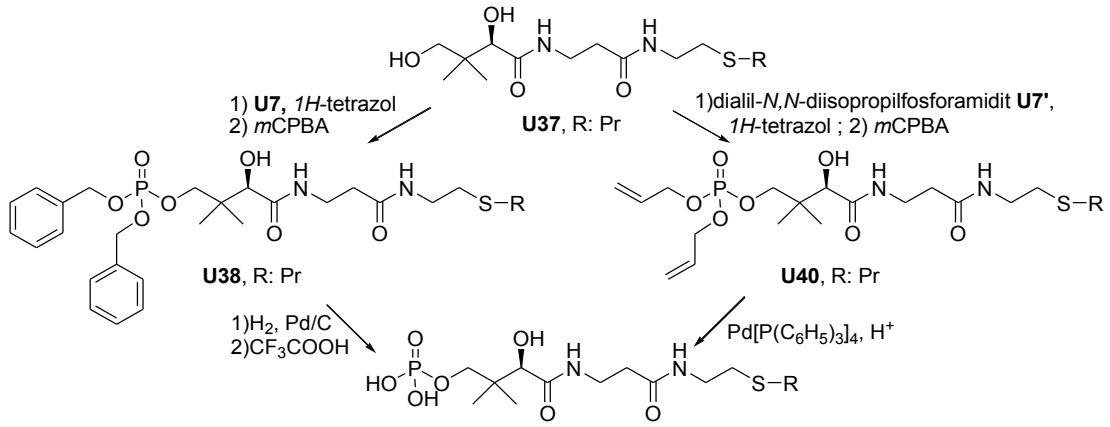


Shema 1.16: Fosforiliranje derivatov panteteina z **U7**.

Mandel s sodelavci je leta 2004 objavil totalno sintezo dveh prekurzorjev CoA panteteina in 4'-fosfopanteteina **U18** kot linearno sekvenco 9 oziroma 10 korakov [72]. Zaradi števila korakov, potrebnih za totalno sintezo, je objavljen postopek zelo zahteven za izvedbo, kljub temu pa ta način priprave prekurzorjev omogoča pripravo najrazličnejših derivatov CoA, modificiranih tako na cisteaminskem, β-alaninskem delu ali pa na delu pantoinske kisline. Raziskovalci so tudi v tem primeru za fosforiliranje uporabili dibenzil *N,N*-diizopropilfosforoamidit **U7**, oksidacijo v fosfat pa so dosegli z ozonom.

Zadnje fosforiliranje derivatov pantotenske kisline, ki ga je mogoče zaslediti v strokovni literaturi, sta leta 2010 objavila raziskovalca Tautz in Rétey [73]. Z namenom priprave derivata CoA sta uporabila dibenzil-*N,N*-diizopropil fosforoamidit **U7** v prisotnosti *1H*-tetrazola v acetonitrilu in brezvodnih pogojih ter tako dosegla selektivno fosforiliranje primarne hidroksilne skupine S-propilpanteteina **U37** (Shema 1.17). Nadaljnja oksidacija z m-kloroperbenzojsko kislino je vodila do nastanka dibenzil fosfatnega estra **U38**, odcep benzilnih skupin pa sta raziskovalca dosegla z vodikom v prisotnosti paladija na oglju. V isti študiji je bila objavljena tudi uporaba še enega PIII reagenta, in sicer dialil N,N-diizopropilfosforoamidita **U7'**. Fosforilacija in oksidacija

fosforja sta bili v tem primeru izvedeni pod enakimi pogoji, odščito alilnih skupin iz dialilnega estra **U40** pa sta avtorja dosegla s $Pd[P(C_6H_5)_3]_4$ (Shema 1.17).

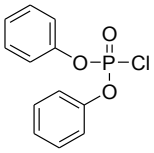
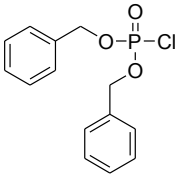
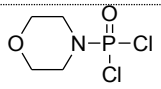
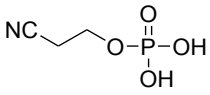
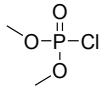


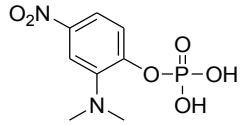
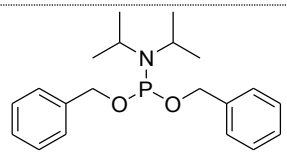
Shema 1.17: Fosforiliranje z **U7** ter z dialil-N,N-diizopropilfosforoamiditom **U7'**.

1.2.2 V tabeli predstavljen pregled uporabljenih reagentov.

Vso pripravo različnih fosforiliranih derivatov pantotenske kisline zajema Tabela 1.1.

Tabela 1.1: Kronološki pregled uporabljenih fosforilnih reagentov za pripravo fosforiliranih derivatov pantotenske kisline.

Fosforilni reagent	Produkt	Leto	Ref.
$POCl_3$	4',2'-difosfopantotenska kislina **U13**	1943	[34]
 **U1**	4'-fosfopantotenska kislina **U9** in 4',2'-difosfopantotenska kislina **U13**	1950 1951	[35] [36,37]
	4'-fosfopantotenska kislina **U9**	1959 1967 1969	[38] [49] [50]
 **U2**	4'-fosfopantetein **U18**	1953 1958 1964 1977 1995	[40,41] [43,44] [45] [53] [54]
	različni derivati 4'-fosfopanteteina	1965 1966 1968	[46] [47] [48]
	4'-fosfopantotenska kislina **U9**	1967 1969	[49] [50]
	različni fosforilirani derivati pantotenske kisline	1970 1970	[51] [52]
	Natrijeva sol 4'-fosfopanteteina **U18**	2006	[55]
 **U3**	4',4''-difosfopantetin **U22**	1967	[57]
	4'fosfo-S-sulfopantetein	1979	[58]
 **U4**	4'-fosfopantotenska kislina **U9**	1966 1981 1986	[49] [61] [63]
	4',4''-difosfopantetin **U22**	1968	[60]
	izotopsko označena 4'-fosfopantotenska kislina	1986	[62]
	različni derivati 4'-fosfopanteteina	1993	[64,65]
 **U5**	različni derivati 4'-fosfopanteteina	1992 1994	[66] [67]

 **U6**	4',4''-difosfopantetin **U22**	1976	[68]
 **U7**	različni derivati 4'-fosfopanteteina	1999 2003	[70] [71]
	4'-fosfopantetein **U18**	2004	[72]
	4'fosfo-S-propilpantetein **U39**	2010	[73]

1.3 Predzdravila fosfatov

1.3.1 Splošno o predzdravilih

Predzdravila (ang. *prodrugs*) so neaktivni, bioreverzibilni derivati učinkovin, na katerih mora *in vivo* poteči encimatska in/ali kemijska transformacija, da pride do sprostitve aktivne starševske molekule, ki nato izzove želen farmakološki učinek v telesu [25]. Priprava predzdravil je postala uveljavljen pristop za izboljšanje fizikalno-kemijskih, biofarmacevtskih, in farmakokinetičnih lastnosti učinkovin tako pri odkrivanju zdravil kot pri njihovem nadaljnjem razvoju in optimizaciji [74]. Trenutno je od 5 do 7 % vseh zdravil, prisotnih na tržišču, pripravljenih s predzdravili [74]. Najpogostejše ovire, na katere lahko naletimo pri razvoju zdravil in ki jih je mogoče premostiti z uporabo predzdravilnega pristopa, so povezane [25]:

- s formulacijo in aplikacijo (npr. slaba vodotopnost, neprijeten okus itd.),
- z absorpcijo (npr. slaba membranska permeabilnost ali pa nizka stabilnost v prebavnem traktu),
- z distribucijo,
- z metabolizmom in izločanjem,
- s strupenostjo ali pa
- z uravnavanjem življenjskega cikla učinkovine.

Med najpogostejšimi funkcionalnimi skupinami aktivnih molekul oz. učinkovin, ki jih je mogoče modificirati in tako pripraviti predzdravilo, so karboksilna, hidroksilna, aminska, fosfatna ali fosfonatna in karbonilna skupina, pri čemer tvorimo estre različnih kislin, karbonate, karbamate, amide, fosfate in oksime [74].

Kljub temu, da so v večini primerov predzdravila preprosti kemijski derivati, ki so od starševske molekule oddaljeni zgolj en ali dva kemijska in/ali encimatska koraka, je njihova priprava lahko zelo zahtevna, hkrati pa ključna za dosego želenega farmakološkega delovanja zdravilne učinkovine [25]. To področje farmacevtske kemije je zato zelo zanimivo in skupaj z novimi odkritji, ki dopolnjujejo znanje o delovanju učinkovin v telesu, omogoča razvoj bolj prefinjenih, varnejših in učinkovitejših zdravil.

1.3.2 Razlogi za pripravo predzdravil fosfatov

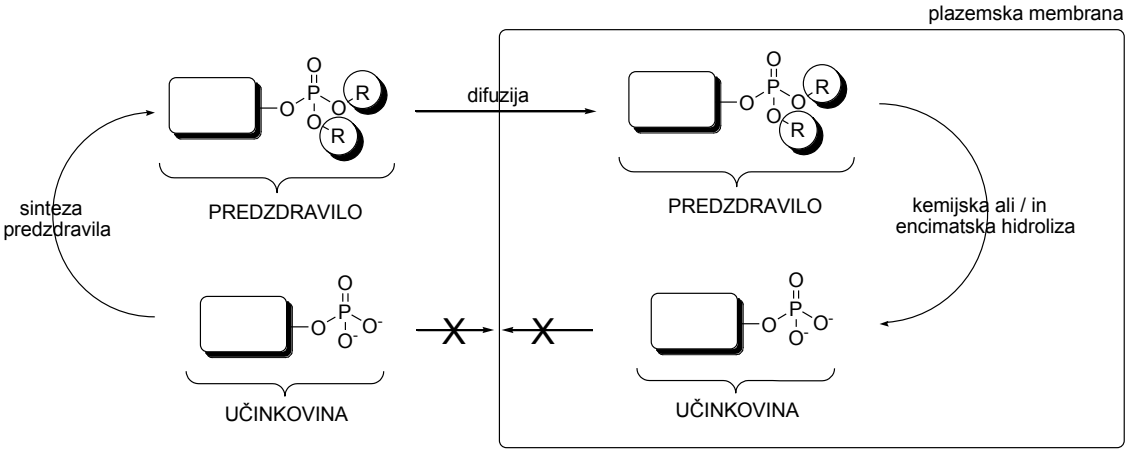
Ene izmed učinkovin, ki jih je za želen učinek največkrat potrebno pripraviti v obliki predzdravila, so tudi biološko aktivne spojine, ki kot strukturni element vsebujejo fosfatno skupino.

Številne študije o biološko aktivnih fosfatih, objavljene v literaturi, dokazujejo pomembnost fosfatnih estrov tudi na področju farmacevtske kemije. Fosfati nukleozidov ter njihovi fosfonatni analogi so izredno pomemben tip zdravil s protivirusnim in protitumornim delovanjem [75-77]. Poleg njih pa je v zadnjem času v literaturi moč zaslediti tudi kar nekaj na novo odkritih bioloških vlog spojin, ki vsebujejo fosfatno skupino in predstavljajo obetavne kandidate za zdravljenje različnih drugih bolezni [16,17].

Pri razvoju potencialnih učinkovin, ki imajo fosfatno skupino, pa je potrebno precej pozornosti posvetiti naboju skupine, ki večinoma onemogoča dosego zadostnih koncentracij učinkovine na ciljanem mestu. Fosfatni monoestri imajo namreč običajno nizke vrednosti pKa, pogosto med 1 in 2, zato so pri fiziološkem pH-ju, ki je 7,0–7,4, deprotonirani in posledično negativno nabiti [78]. Biološka uporabnost spojin, ki vsebujejo fosfatno skupino, je zaradi slabe absorpcije praviloma omejena, spojine pa so

nezmožne tudi pasivnega prehoda čez plazemsko membrano [79]. Poleg tega je poraba tovrstnih spojin omejena tudi z nestabilnostjo v bioloških tekočinah, in sicer zaradi prisotnosti fosfataz [79]. Direktna aplikacija učinkovin, ki so po svoji strukturi fosfatni monoestri, je zato v večini primerov onemogočena.

Problemom, povezanim z omejeno biološko uporabnostjo teh spojin, se lahko učinkovito izognemo s pripravo predzdravila, in sicer z uvedbo maskirnih skupin na prosto fosfatno skupino, ki nevtralizirajo negativen naboj in omogočijo boljšo absorpcijo fosfatnih učinkovin. Tako pripravljene nenabite spojine so zmožne difuzije skozi plazemske membrane, zato se stroka maskiranja fosfatov poslužuje tudi z namenom doseganja znotrajceličnih tarč, kar je pogoj za učinkovito delovanje marsikaterega zdravila (Shema 1.18) [79].



Shema 1.18: Predzdravilni koncept priprave fosfatnih estrov, ki omogoča dostavo zdravila znotraj celic, zajema uvedbo maskirnih skupin, ki omogočajo difuzijo skozi plazemsko membrano ter odcep skupin znotraj celice, pri čemer se sprosti aktivna starševska učinkovina [78].

Po vstopu takega predzdravila v celico je maskirna skupina odstranjena bodisi s kemijsko hidrolizo bodisi / in s pomočjo endogenih encimov, pri čemer spet dobimo izhodni fosfat, ki je nezmožen izhoda iz celice ter je biološko aktiven (Shema 1.18) [78]. Za uspešno delovanje učinkovine, ki mora doseči tarčo znotraj celice, je ključno, da njena predzdravilna oblika čim uspešneje preživi pot v prebavnem traktu, se absorbira v sistemski obtok, v njem ostane nedotaknjena dovolj dolgo, da lahko vstopi v celice, tam pa se mora učinkovito pretvoriti nazaj v starševsko molekulo [79]. Idealno predzdravilo je torej encimatsko in kemijsko popolnoma stabilno tekom absorpcijskega procesa in v krvi, medtem ko se mora po vstopu v ciljane celice takoj povrniti v aktivno, starševsko obliko [80].

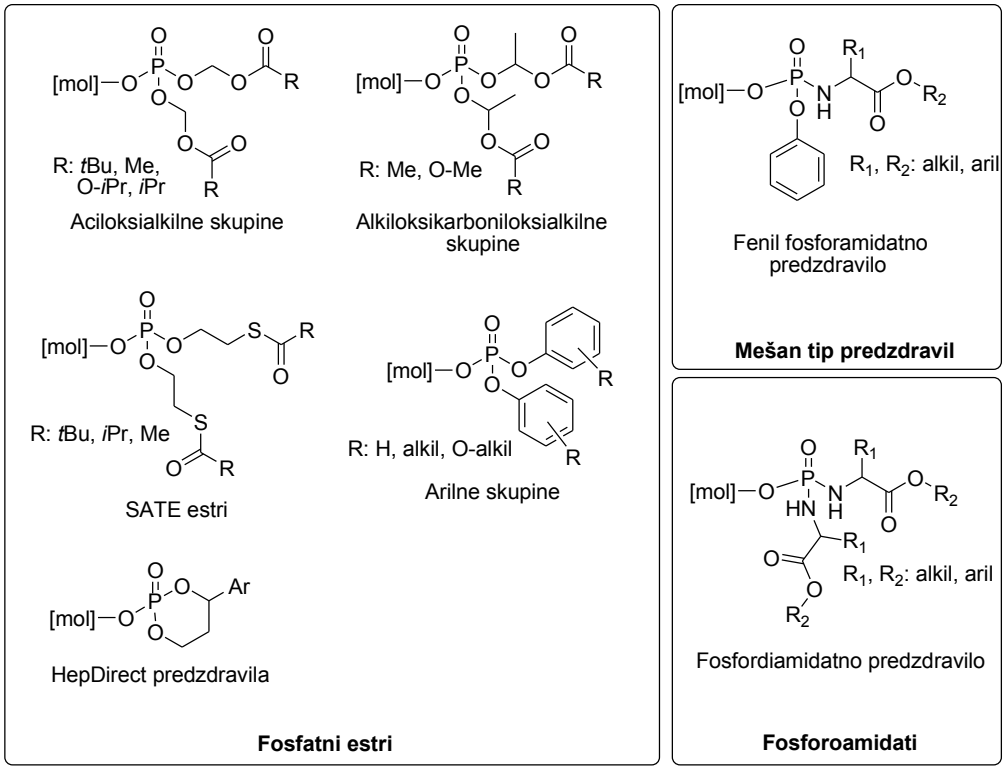
Ker se je tem idealnim pogojem v praksi možno zgolj približati, je za razvoj najučinkovitejšega zdravila ključno iskanje najprimernejšega predzdravilnega pristopa. Za povečevanje (peroralne) biološke uporabnosti, celične permeabilnosti in stabilnosti biološko aktivnih spojin, ki vsebujejo fosfatno skupino, je bila razvita vrsta različnih predzravilnih pristopov [78-80]. Večina raziskav na tem področju je bila narejena z namenom znotrajcelične dostave nukleozidnih monofosfatov s protivirusnim in protirakavim delovanjem [75,76,81,82].

1.3.3 Vrste predzdravil fosfatov

Uvedba maskirnih skupin predstavlja učinkovito orodje za izboljšanje lastnosti biološko aktivnih učinkovin, ki vsebujejo fosfatno skupino. Pri tem tvorimo različne fosfatne estre ali pa fosforoamidate. Različne vrste predzdravil fosfatov, ki jih je mogoče zaslediti v literaturi, vključujejo [78,79]:

- aciloksialkilne in alkiloksikarboniloksialkilne maskirne skupine,
- S-aciltioetil (SATE) maskirne skupine,
- arilne skupine,
- benzilne skupine,
- pripravo različnih fosforoamidatov,
- pripravo cikličnih 1-aril-1,3-propanil estrov (HeptDirect) ali pa
- pripravo lipidnih estrov.

Najpogosteje uporabljene maskirne skupine oziroma vrste predzdravil fosfatov prikazuje Shema 1.19.



Shema 1.19: Najpogosteje uporabljeni tipi predzdravil fosfatov.

Maskirne skupine za pripravo predzdravil fosfatov se delijo na dve skupini, in sicer glede na način sprostitve starševske spojine: do cepitve maskirne skupine lahko pride bodisi kemijsko bodisi encimatsko [78].

1.3.3.1 Kemijsko labilne zaščitne skupine fosfatov

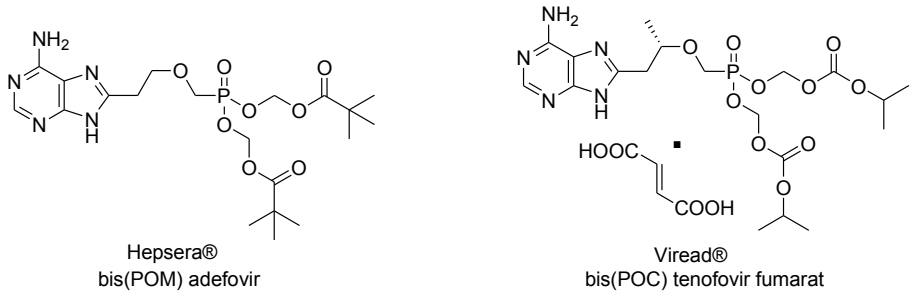
Začetni poskusi razvoja predzdravil fosfatov so sledili že uveljavljenim metodam za pripravo predzdravil karboksilnih kislin, zato so vključevali predvsem sintezo preprostih fosfatnih estrov. Medtem ko do *in vivo* degradacije preprostih estrov karboksilnih kislin pride zelo hitro s pomočjo encimov karboksilesteraz, encimi, ki bi bili v našem telesu sposobni razgraditi preproste fosfatne triestre, niso bili identificirani [79]. Aktivnost metabolno stabilnih predzdravil oziroma odščita tovrstnih maskirnih skupin je zato odvisna zgolj od kemijske hidrolize. Poleg preprostih alkilnih skupin (npr. etilna skupina) sodijo v to skupino tudi fenilna in benzilna skupina [78]. Hitrost njihovega razpada je odvisna predvsem od lastnosti izstopajoče skupine. Preprosti alkilni estri fosfatov, pri katerih zelo težko pride do sprostitve aktivne starševske oblike učinkovine, so zaradi svoje stabilnosti zato največkrat neustrezen način za pripravo predzdravila [79].

1.3.3.2 Biološko labilne zaščitne skupine fosfatov

Za farmacevtsko kemijo bolj zanimive pa so maskirne skupine, ki jih cepijo encimi. Če zaščitno skupino cepijo šele endogeni encimi, lahko ob uporabi takega pristopa povečamo tudi akumulacijo zdravila v celicah (Shema 1.18). Izbira bioaktivabilnih zaščitnih skupin je presenetljivo majhna, saj encimov, ki bi bili sposobni cepiti triestre fosfatov, v naravi ni [78]. Zato mora biti ustrezno predzdravilo zasnovano tako, da dopušča encimatsko cepitev na točki zaščitne skupine, ki je od fosfata nekoliko oddaljena, tej pa sledi spontana sprostitev preostanka, ki je povezoval fosfat in točko cepitve (tridelni predzdravilni koncept) [78]. Tipični primeri biolabilnih zaščitnih skupin vključujejo aciloksialkilne, alkiloksikarboniloksialkilne, SATE in nekatere benzilne maskirne skupine ter HeptDirect in fosforoamidatna predzdravila [79].

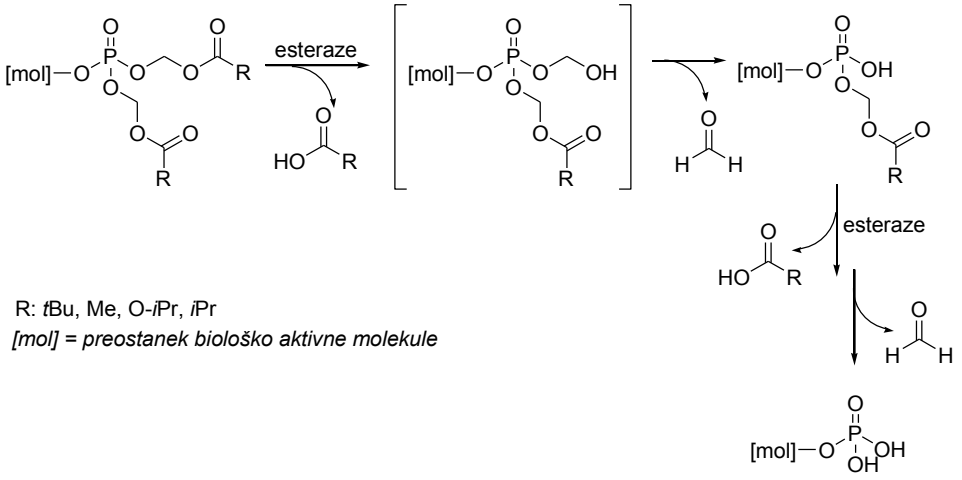
1.3.4 Aciloksialkilne skupine

Tvorba različnih aciloksialkilnih estrov je najpogostejši način za pripravo predzdravil fosfatov in fosfonatov [79]. Pristop je bil prvotno razvit za maskiranje karboksilne skupine. Začetki na tem področju so vključevali maskiranje karboksilne skupine penicilinov z acetoksimetilno (AM) skupino [83]. Kasneje pa se je močno uveljavila uporaba pivaloiloksimetilnih (POM) skupin. Primer je predzdravilo β-laktamskega antibiotika ampicilina s povečano biološko uporabnostjo, ki je odobreno zdravilo in je bilo pod imenom Pivampillicin® kar 17 let prisotno na tržišču [84]. Na področje priprave predzdravil fosfatov je aciloksialkilni pristop prenesel Farquhar s sodelavci v zgodnjih osemdesetih letih prejšnjega stoletja in dokazal uporabnost skupin tudi za maskiranje fosfata [85,86]. Kasneje se je priprava aciloksialkilnih predzdravil fosfatov in fosfonatov močno uveljavila. Aciloksialkilne skupine se tipično uporabljajo za pripravo predzdravil učinkovin s protivirusnim delovanjem, s čimer lahko uspešno povečamo celično permeabilnost, kemijsko stabilnost in biološko dostopnost učinkovin. Primer s tega področja sta dve na trgu prisotni protivirusni zdravili: zdravilo Hepsera®, namenjeno zdravljenju Hepatitisa B [87] in Viread®, namenjeno zdravljenju Hepatitisa B ter okužbe s HIV [88]. V obeh primerih gre za predzdravilo fosfonata, pripravljeno s POM in izopropiloksikarboniloksimetilnimi (POC) skupinami, strukturi predzdravil pa prikazuje Shema 1.20.



Shema 1.20: Zdravili Hepsera® in Viread®.

Odcep aciloksialkilnih skupin je večstopenjski, zanj pa je ključno delovanje encimov, esteraz, ki cepijo estersko vez na distalni maskirni skupini, preostanek skupine pa se hitro kemijsko spontano razpade (Shema 1.21) [78,79]. Esteraze, encimi, odgovorni za razpad tovrstnih predzdravil, kot so karboksilesteraze in paraoksonaze, so prisotne v velikem številu v najrazličnejših tkivih [89]. Po absorpciji esteraze, prisotne v krvi in drugih tkivih, hitro pretvorijo aciloksialkilna predzdravila v starševsko učinkovino, žal pa peroralno biološko uporabnost nekoliko zmanjšujejo že esteraze, prisotne v tankem črevesu [79]. Pri odcepu dveh aciloskialkilnih skupin se sprostita dve molekuli formaldehida ter dve molekuli pripadajočih kislin (Shema 1.21).



Shema 1.21: Odcep aciloksialkilnih skupin [78,79].

Kemijska stabilnost skupin, ki jo je potrebno upoštevati pri iskanju najoptimalnejšega predzdravila, med skupinami variira [86]. V literaturi lahko najpogosteje zasledimo uporabo POM skupin, ki je postala zelo uveljavljen način za pripravo predzdravilnih oblik biološko aktivnih molekul s fosfatno skupino [78,79,85,90-97].

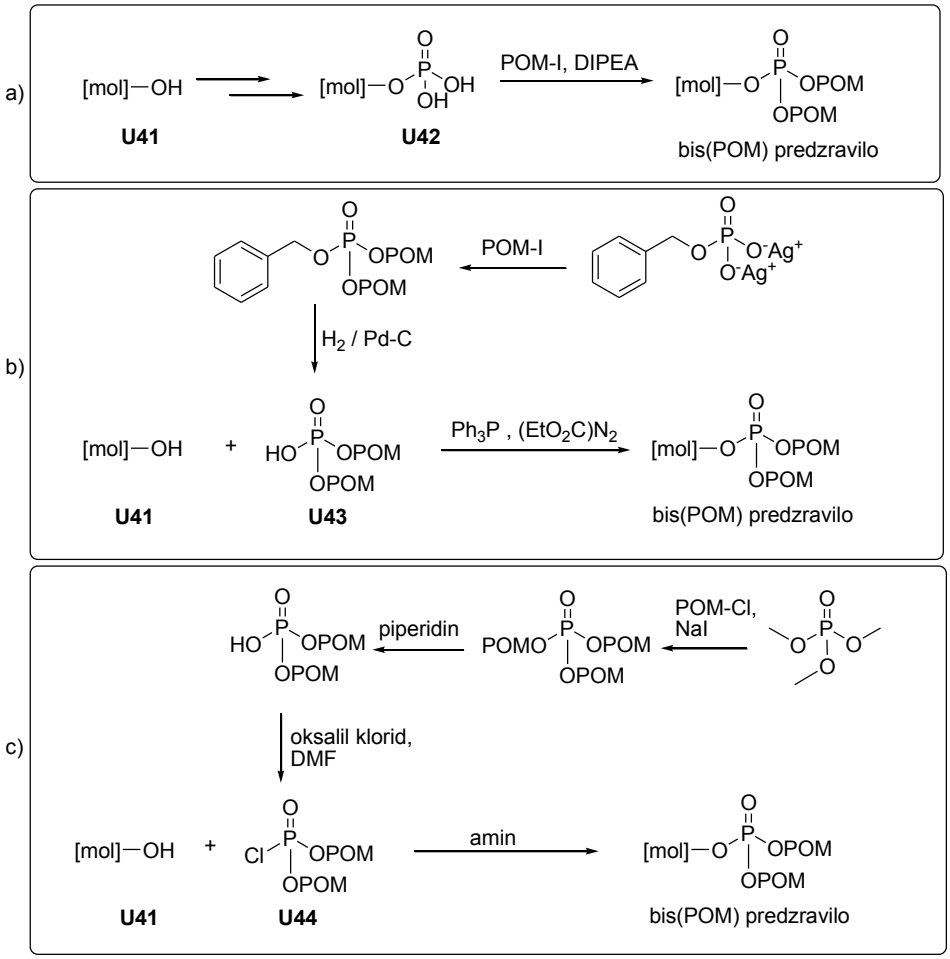
1.3.4.1 Sinteza pivaloiloksimetilnih predzdravil fosfatov

Priprava POM predzdravil je pogosto zelo zahtevna, saj kompleksne večstopenjske sinteze lahko vodijo do kompleksnih zmesi in posledično nizkih izkoristkov. V literaturi je mogoče za pripravo bis(POM) predzdravil fosfatov najti 3 generalne metode, ki jih prikazuje Shema 1.22.

Metoda a) vključuje fosforiliranje hidroksilne skupine prekurzorja **U41** do prostega fosfata **U42**, čemur sledi dvojna alkilacija s pivaloiloksimetil jodidom (POM-I) v prisotnosti *N,N*-diizopropildietil amina (DIPEA) (Shema 1.22.a)[98].

Druga metoda zajema direktno kondenzacijo prekurzorja **U41** z bis(POM) hidrogenfosfatom **U43** v prisotnosti trifenilfosfina in dietil azodikarboksilata pod Mitsunobu reakcijskimi pogoji (Shema 1.22.b) [91].

Metoda c) pa je enostopenjska reakcija med prekurzorjem **U41** in bis(POM) klorofosfatom **U44**, ki prav tako direktno vodi do nastanka želenega produkta (Shema 1.22.c) [99].



Shema 1.22: Tri različne metode priprave bis(POM) predzdravil fosfatov.

Poglavje 2

Namen dela

Koencimu A (CoA) in njegovi biosintezi se v zadnjem času ponovno posveča veliko pozornosti. Nedavna odkritja so namreč pokazala, da ima CoA pomembno vlogo tudi pri regulaciji številnih nemetabolnih procesov [9]. Odkritja na tem področju so med drugim pokazala, da so okvare v biosintezi CoA direktno povezane z več oblikami nevrodegenerativne bolezni NBIA [11,12]. Mednje sodi tudi nevrodegenerativna bolezen, povezana s pantotenat kinazo (PKAN), ki jo povzroča okvara ključnega encima v biosintezi CoA, pantotenat kinaze [11]. Zato so bila za zdravljenje te redke, vendar hude nevrodegenerativne bolezni predlagane spojine, ki preskočijo nedelujoč encimski korak v biosintezi CoA. Ker pantotenat kinaza katalizira fosforiliranje pantotenata v fosfopantotenat v prvem koraku biosinteze CoA, je bilo predlagano, da bi PKAN nemara lahko zdravili s fosforiliranimi derivati pantotenske kisline.

Fosforilirani derivati pantotenske kisline so zaradi svojega velikega potenciala kot učinkovine za zdravljenje bolezni, povezanih z biosintezo CoA, ponovno pritegnili veliko zanimanja, kar dokazujejo tako sveže objave s tega področja v najuglednejših znanstvenih revijah [16,17] kot tudi patentne prijave, ki ščitijo uporabo teh perspektivnih spojin za zdravljenje PKAN [100,101]. Kljub atraktivnosti področja in kljub temu, da je bilo v preteklosti objavljenih že kar nekaj različnih metod za fosforiliranje pantotenske kisline in njenih derivatov, pa so raziskave o biološki aktivnosti teh spojin še vedno močno omejene zaradi pomanjkanja dobro definiranih in generalno uporabnih sinteznih ter izolacijskih postopkov. Ponovljivost velikega deleža objavljenih receptur je vprašljiva, saj gre za starejšo literaturo. Novejše objave pa pogosto vključujejo večstopenjske postopke ter zahtevne eksperimentalne pogoje. Izkoristki reakcij so praviloma nizki, sinteza, izolacija in čiščenje pa zelo zahtevni za izvedbo, sploh pri sintezi večjih količin spojin.

Ker sem ugotovila, da ustreznih sinteznih metod še vedno primanjkuje, sem se v okviru doktorske disertacije posvetila razvoju metod za učinkovito in selektivno pripravo fosforiliranih derivatov pantotenske kisline s potencialno biološko aktivnostjo. S pomočjo rezultatov bioloških študij na že znanih spojinah ter teoretičnega znanja s tega področja sem si izbrala več ciljnih molekul in si za enega od ciljev zadala njihovo sintezo. Tako sem želela pripraviti nove fosforilirane derivate pantotenske kisline, ki bi bili obetavni kandidati bodisi za testiranje njihove zmožnosti dvigovanja ravni CoA ali druge potencialne biološke aktivnosti. S svojim raziskovalnim delom pa nisem želela zgolj dopolniti knjižnice že znanih spojin, ampak tudi prispevati k razširitvi še vedno pomanjkljivega znanja na področju fosforiliranja pantotenske kisline. Namen mojih raziskav zato ni bil zgolj ciljno usmerjena sinteza, ampak sem se posvetila tudi iskanju najučinkovitejših metod za pripravo teh spojin, torej iskanju najoptimalnejših pogojev, ki bi vodili do zadovoljivih izkoristkov in selektivne sinteze.

Zaradi močnega negativnega naboja fosfatnih monoestrov pri fiziološkem pH je pri razvoju potencialnih učinkovin tega strukturnega tipa treba nasloviti tudi ovire, povezane s slabo absorpcijo, kar zmanjšuje biološko uporabnost tovrstnih učinkovin. Poleg nezmožnosti prehajanja čez membrane možnost direktne aplikacije zmanjšuje tudi nestabilnost fosfatov v bioloških tekočinah. Tem problemom se lahko učinkovito izognemo s pripravo predzdravila, in sicer z uvedbo maskirnih skupin, ki nevtralizirajo negativen naboj ter s tem omogočijo absorpcijo in povečajo celično permeabilnost učinkovine. Znanih je kar nekaj različnih predzdravilnih pristopov, ki lahko izboljšajo fizikalno-kemijske, biofarmacevtske in farmakokinetične lastnosti učinkovin, ki vsebujejo fosfatno skupino [78-80], med katerimi je najpogostejša uporaba aciloksialkilnih maskirnih skupin. Največ literature s področja sinteze aciloksialkilnih predzdravil je znane za pripravo fosfatov, maskiranih s pivaloiloksimetilno skupino, vendar je večina opisanih postopkov zelo zapletenih, izkoristki reakcij pa so praviloma nizki.

Ker je med pristopi za izboljševanje lastnosti učinkovin, ki vsebujejo fosfatno skupino, uporaba aciloksialkilnih maskirnih skupin med najpogostejšimi, sem tudi sama tekom svojih raziskav največ pozornosti namenila prav tem maskirnim skupinam. Večina objavljenih procedur za pripravo takšnih predzdravil fosfatov je vezanih zgolj na pripravo pivaloiloksimetilnih estrov, manj obetavni pa so objavljeni sintezni postopki za uvedbo drugih aciloksialkilnih skupin. Za primer, v literaturi sem našla zgolj eno objavo, ki vključuje sintezo predzdravila z izobutiriloksimetilno skupino [102]. Ker pa dolgotrajnejša uporaba zdravil, ki vsebujejo pivaloiloksimetilne skupine, zbuja pomisleke glede varnosti [79], je priprava drugih aciloksimetilnih predzdravil, ki pri odcepu ne generirajo pivalne kisline, zelo zaželena. Poleg tega pa kemijska stabilnost posameznih aciloksialkilnih skupin močno variira glede na strukturo, kar je ključno pri načrtovanju predzdravila in optimizaciji njegovih lastnosti. Za optimalen razvoj aktivnih učinkovin je zato nujna dostopnost metod za učinkovito pripravo različnih aciloksialkilnih predzdravil.

Zato sem velik del svojih raziskav želela posvetiti tudi razvoju metod za učinkovitejšo pripravo aciloksimetilnih predzdravil fosfatov, ki bi bile splošno uporabne. Na podlagi obstoječe literature ter lastnih izkušenj s tega področja sem ocenila, da je najprimernejša metoda za njihovo pripravo sinteza novih klorofosfatnih reagentov, zaščitenih z ustreznimi aciloskialkilnimi skupinami. Zato sem si za cilj zadala pripravo novih bis(aciloksialkilnih) klorofosfatnih reagentov, ki bi bili primerni za sintezo različnih aciloksialkilnih predzdravil fosfatov. Pripravljene nove reagente sem želela najprej preizkusiti za fosforiliranje različnih tipov alkoholov in s tem raziskati generalnost metode. V tem delu doktorskih raziskav sem poleg tega želela poiskati tudi najoptimalnejše pogoje za uporabo bis(aciloksialkilnih) klorofosfatnih reagentov ter preizkusiti možnost njihove uporabe v topilih, sprejemljivih za farmacevtsko industrijo. Za konec pa sem seveda želela tako pripravljene reagente preizkusiti za fosforiliranje biološko aktivnih spojin in z njimi pripraviti nove fosforilirane derivate pantotenske kisline z maskirano fosfatno skupino.

Hipoteza:

V okviru svojega raziskovanja sem želela preveriti in ovrednotiti naslednjo hipotezo: »Predpostavljam, da je uporaba klorofosfatnih reagentov najprimernejši način za pripravo fosforiliranih derivatov pantotenske kisline. Predpostavljam tudi, da je mogoče metodo priprave bis(pivaloiloksimetil) klorofosfatnega reagenta razširiti in uporabiti za pripravo reagentov z drugimi aciloksialkilnimi skupinami.«

Rezultate raziskav, dosežene v okviru doktorske disertacije, sem razdelila na sledeči poglavji:

4.1 Razvoj novih metod za pripravo predzdravil fosfatov
4.2 Sinteza fosforiliranih derivatov pantotenske kisline

Poglavje 3

Materiali in metode

Uporabljeni reagenti in topila
Klorometil izobutirat (CAS 61644-18-6) in klorometil acetat (CAS 625-56-9) sta bila naročena pri AKos GmbH (Steinn, Nemčija). Vse ostale kemikalije, uporabljene pri delu, so komercialno dostopne, dobavljive pri znanih proizvajalcih (Sigma Aldrich, Merck, Fluka, Acros organics, Fischer BioReagents, Alfa Aesar) in so bile uporabljene brez predhodnega čiščenja. Razen reakcij, izvedenih v vodi, so bile vse reakcije izvedene pod argonovo atmosfero, v sušeni steklovini in z uporabo brezvodnih topil. Brezvodna topila smo hranili na aktiviranih molekulskih sitih (4 Å) ali brezvodnem Na_2SO_4 pod dušikovo atmosfero.

Termostatiranje reakcij
Reakcije, izvedene pri povišani temperaturi, sem termostatirala v oljnih kopelih, segretih na magnetnih mešalih Heidolph, MR Hei-end. Reakcije, izvedene pri 0 °C, sem termostatirala na ledeni kopeli. Za daljše termostatiranje reakcij, izvedenih pri 4 °C, pa sem uporabila kriostat s potopnim hladilnikom FT902 proizvajalca Julabo, potopljen v Dewar posodo z metanolom, v katero je bila potopljena tudi bučka z reakcijsko zmesjo.

Odparevanje topila
Topila sem odparevala pod znižanim tlakom pri temperaturi 40 °C z rotavaporjem Büchi R-215. Produkte sem sušila pod visokim vakuumom, in sicer z oljno vakuumsko črpalko proizvajalca Ilmvac GmbH.

Tankoplastna kromatografija (TLC)
Potek reakcij sem spremljala s tankoplastno kromatografijo (TLC). TLC sem razvijala na ploščah Silica gel/TLC-cards DC-Alufolien-Kieselgel proizvajalca Fluka z 0,2 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu. V primeru, da detekcija spojin s pomočjo UV ni bila mogoča, sem za vizualizacijo spojin uporabila orositveni reagent: raztopino kalijevega permanganata. Orositveni reagent sem pripravila po klasični recepturi, in sicer z 1,5 g $KMnO_4$, 10 g K_2CO_3 in 1,25 ml 10 % NaOH raztopine, raztopljenih v 200 ml destilirane vode.

Kolonska kromatografija
Pripravljene produkte sem čistila s kolonsko kromatografijo pod zmernim nadtlakom (uporaba ročne pumpice). Za stacionarno fazo sem uporabljala silikagel 60 Å s premerom delcev 0,040–0,063 mm, za mobilno fazo pa različne mešanice topil, ki so podane pri vsakem posameznem produktu.

Jedrska magnetna resonanca (NMR)
^{1}H, ^{13}C, ^{31}P, COSY, HSQC in HMBC NMR spektri so bili posneti na Slovenskem NMR centru Kemijskega inštituta z Varian Inova 300 spektrometrom (300 MHz) pri 25 °C. Kemijske premike (δ) sem določevala v ppm, in sicer: glede na interni standard (Me_4Si) ali signal nedevteriranih ostankov topila (H_2O, CH_3OH) v ^{1}H NMR spektrih, glede na signal topila ($CDCl_3$, CD_3OD) v ^{13}C NMR ali glede na eksterni standard (85 % H_3PO_4) v ^{31}P NMR spektrih.

Masna spektroskopija (MS)
Poteku posameznih kemijskih reakcij sem sledila tudi z uporabo LC-MS (Thermo Scientific TSQ Quantum Access MAX/Accela 1250) Centra za integrirane pristope v kemiji in biologiji proteinov v podjetju Acies Bio. Masni spektri (ESI) in masni spektri visoke ločljivosti (HR-MS) čistih produktov pa so bili posneti na Q-TOF Premier masnem spektrometru proizvajalca Micromass v Centru za masno spektrometrijo na Institutu »Jožef Stefan«.

Določevanje tališča
Tališče sem določila na objektnem steklu z mikroskopom Leica Galen III na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani.

Varnost
Pri eksperimentalnem delu sem dosledno upoštevala navodila za varnost pri delu v laboratoriju, pri tem uporabljala vsa predvidena zaščitna sredstva (zaščitna halja, zaščitna očala, zaščitne rokavice, maska) ter z nevarnimi kemikalijami ravnala v skladu z navedenimi opozorili.

Poglavje 4

Rezultati in razprava

4.1 Razvoj novih metod za pripravo predzdravil fosfatov

Priprava predzdravil je uveljavljen pristop v farmacevtski kemiji za izboljšanje fizikalno-kemijskih, biofarmacevtskih, farmakokinetičnih in farmakodinamičnih lastnosti učinkovin. Tudi omejitvam, povezanim z omejeno absorpcijo in nestabilnostjo učinkovin, ki vsebujejo fosfatno skupino, se lahko učinkovito izognemo s pripravo predzdravila. Znanih je kar nekaj različnih predzdravilnih pristopov, s katerimi je mogoče povečati biološko uporabnost fosfatov in izboljšati njihovo zmožnost prehajanja skozi membrane [78-80]. Najpogosteje uporabljen tip predzdravila za fosfate so aciloksialkilni estri [79], največ literature s tega področja pa zajema pripravo predzdravil s POM maskirnimi skupinami. Med tem ko so obstoječe metode za pripravo POM fosfatnih estrov [91,98,99] v posameznih primerih učinkovite, je njihova priprava pogosto zelo zahtevna, večstopenjski postopki pa pogosto vodijo do nastanka kompleksnih zmesi in nizkih izkoristkov. O neuspešnosti obstoječih metod v literaturi nemalokrat poročajo različni avtorji [71,96,99], z enakimi težavami pa sem se pri pripravi POM predzdravil srečala tudi sama [101]. Še manj obetavni so objavljeni sintezni postopki za pripravo drugih aciloksialkilnih estrov, ki jih je v literaturi neprimerljivo manj.

Pri razvoju ustreznega predzdravila je poleg njegove stabilnosti, zmožnosti absorpcije ter uspešne povrnitve v izhodno aktivno obliko zelo pomembno tudi to, da ostanki maskirnih skupin, ki se sprostijo po cepitvi, niso toksični. Kljub temu, da je priprava POM estrov zelo uporaben predzdravilni pristop, kar dokazujejo tudi odobrena in že na tržišču prisotna zdravila [84,87,88], dolgotrajnejša uporaba takšnih zdravil zbuja pomisleke glede varnosti [79]. Pri cepitvi POM fosfatnega estra pride do nastanka dveh stranskih produktov, in sicer formaldehida ter pivalne kisline (Shema 1.21). Nastanek formaldehida, ki je skupen cepitvi vseh aciloksialkilnih predzdravil, je dolgo veljal za spornega. Danes formaldehid velja za manj nevaren stranski produkt [79]. Vpliv manjših količin formaldehida na organizem naj bi bil manj problematičen, saj se tudi vsakodnevni vnos metanola, prisotnega v naši prehrani, pretežno presnovi v format prav preko formaldehida [103]. Bolj zaskrbljujoč pa je nastanek pivalne kisline, ki se prav tako sprosti pri cepitvi POM estra, saj so znanstveniki pokazali, da je dolgotrajna izpostavitev pivalatu povezana s toksičnim pomanjkanjem karnitina [104]. Ker je dolgotrajnejša uporaba večjih količin zdravil, ki vsebujejo POM skupine, zato lahko škodljiva, je zelo zaželena priprava drugih aciloksialnkilnih predzdravil, ki pri cepitvi ne razpadejo na pivalnene kisline.

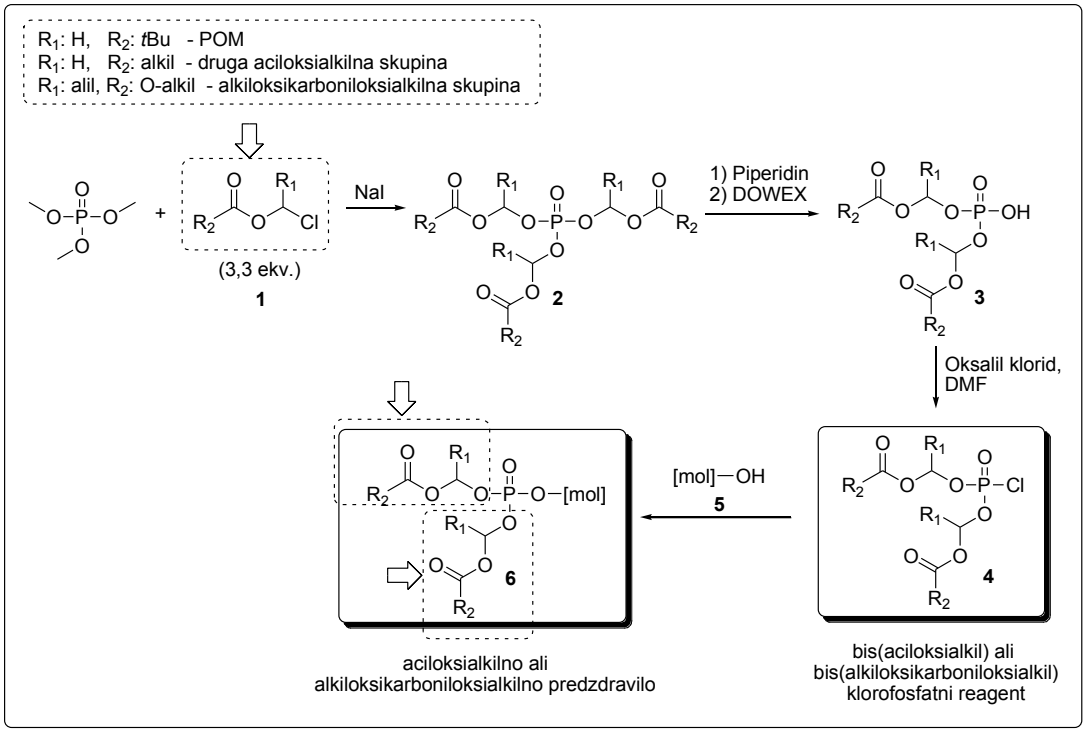
Poleg tega kemijska in metabolna stabilnost aciloksialkilnih skupin glede na strukturo močno variira [86], kar moramo upoštevati pri načrtovanju predzdravila in optimizaciji njegovih lastnosti [79]. Za optimalen razvoj aktivnih učinkovin je zato nujna dostopnost

metod za učinkovito pripravo različnih aciloksialkilnih predzdravil, ki omogočajo pripravo derivatov z različnimi maskirnimi skupinami in primerjavo njihovih lastnosti.

Poleg priprave POM predzdravil lahko zato v literaturi zasledimo tudi primere priprave drugih aciloksialkilnih fosfatnih estrov [98,102,105-108], vendar je raznolikost in učinkovitost obstoječih sinteznih metod za njihovo pripravo neprimerljivo slabša. V delu raziskav, predstavljenih v tem poglavju, sem se zato posvetila razvoju metod za uspešnejšo pripravo aciloksialkilnih predzdravil, ki bi bile splošno uporabne za pripravo predzdravilnih oblik najrazličnejših učinkovin.

4.1.1 Sinteza novih reagentov za fosforiliranje

Kot omenjeno v poglavju Sinteza pivaloiloksimetilnih predzdravil fosfatov (str. 21), je v literaturi mogoče najti tri različne pristope za pripravo POM predzdravil (Shema 1.22, str. 22) [91,98,99]. Izkoristki prvih dveh metod (Shema 1.22, a in b) so praviloma nižji od tistih, ki jih dosegajo avtorji ob uporabi tretje metode c) [96]. Še posebno nizki so izkoristki prvih dveh metod pri uvedbi POM skupin na derivate pantotenske kisline (< 10 %) [71,99]. Do podobnih ugotovitev smo prišli tudi v naši raziskovalni skupini [101]. Na podlagi izkušenj sem tako ugotovila, da je za pripravo POM fosfatnih predzdravil najučinkovitejša uporaba bis(POM) klorofosfatnega reagenta, ki sta ga pripravila raziskovalca Hwang in Cole (Shema 1.22c) [99]. Zato sem se odločila študirati možnost uporabe te metode za pripravo drugih sorodnih aciloksialkilnih in alkiloksikarboniloksialkilnih predzdravil. Želela sem torej preučiti možnost priprave novih aciloksialkilnih in alkiloksikarboniloksialkilnih klorofosfatnih reagentov **4** z razširitvijo postopka, ki sta ga objavila avtorja za pripravo bis(POM) klorofosfatnega reagenta [99], in tako pripravljene nove reagente uporabiti za pripravo sorodnih predzdravil **6** (Shema 4.1).



[mol] = preostanek biološko aktivne molekule

Shema 4.1: Koncept priprave novih klororfosfatnih reagentov za pripravo aciloksialkilnih in alkiloksikarboniloksialkilnih predzdravil z razširitvijo metode za pripravo POM predzdravil.

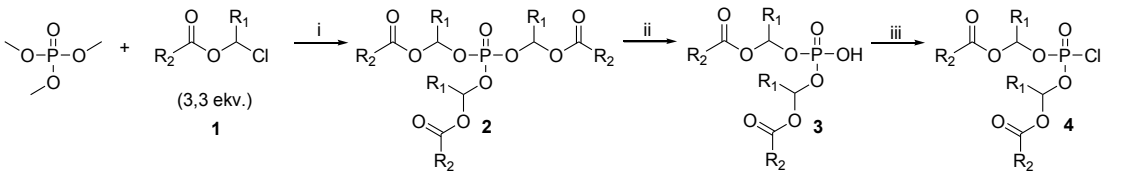
Predpostavila sem, da je predlagan koncept mogoče izkoristiti za pripravo več različnih klorofosfatnih reagentov, in sicer v primeru, da je mogoče pivaloilmetilklorid iz prve stopnje sinteze reagenta uspešno zamenjati z drugimi ustreznimi kloridi **1**, s čimer bi dosegla uvedbo drugih aciloksialkilnih in alkiloksikarboniloksialkilnih skupin na reagent in v zadnjem koraku dobila pripadajoče predzdravilo (Shema 4.1). V literaturi nisem

našla podatkov o pripravi drugih reagentov, kar me je še dodatno spodbudilo k preizkušanju uporabnosti predlaganega koncepta za pripravo novih reagentov.

Najprej sem želela optimizirati pogoje sinteze, objavljene za pripravo znanega reagenta bis(POM) klorofosfata **4a** (Tabela 4.1, vnos 1) [99], saj so avtorji v literaturi poročali o potrebi po optimizaciji objavljenega postopka [96,109].

Tudi sama sem ugotovila, da je za uspešno transesterifikacijo trimetil fosfata s pivaloilmetilkloridom **1a** ključna uporaba suhega topila in zagotovitev inertnih pogojev, česar avtorja nista izpostavila, saj sem bila pri prvotnem ponavljanju reakcije v nesuhih pogojih neuspešna. Po optimizaciji pogojev sem uspešno sintetizirala tris(POM) fosfat **2a** in ga izolirala s še nekoliko višjim izkoristkom (74 %) od navedenega v literaturi (63 %) [99]. V naslednjem koraku sem uspešno pripravila bis(POM) hidrogenfosfat **3a**, saj je pri reakciji v piperidinu prišlo do selektivnega odcepa zgolj ene od POM skupin. Ugotovila sem tudi, da za selektivno pretvorbo v hidrogen fosfat po reakciji s piperidinom produkta ni potrebno spustiti čez ionsko-izmenjevalno kolono in analizirati zbranih frakcij, kot sta navedla avtorja, ampak za izolacijo čistega produkta zadostuje zgolj mešanje z ionsko-izmenjevalno smolo v H^+ obliki in filtracija. S tem sem se izognila zelo zamudnemu zbiranju posameznih vodnih frakcij, ki jih je bilo potrebno analizirati z LC-MS. Za pripravo bis(POM) klorofosfatnega reagenta **4a** je bila ponovno ključna suhost vseh uporabljenih kemikalij in topil, zato sem izhoden hidrogenfosfat **3a** po odparevanju vode še dodatno sušila na vakuumski črpalki čez noč, pred reakcijo pa ga trikrat sušila na rotavaporju s toluenom. Konverzijo v zadnji stopnji sem določila s pomočjo ^{1}H NMR spektra surove reakcijske zmesi takoj po odparevanju preostanka oksalil klorida in topila. Sklepala sem, da je tako določeni izkoristek pretvorbe v **4a** zelo verjetno nižji od resničnega, saj se je del reagenta zaradi občutljivosti na vlago kljub pazljivosti med pripravo, transportom in snemanjem NMR spektra vzorca najverjetneje delno pretvoril nazaj v izhodno spojino. Kljub temu je bil celokupen izkoristek priprave bis(POM) klorofosfata **4a** zadovoljiv (51 %), primerljiv s tistim, ki sta ga navedla avtorja (49 %) [99].

Tabela 4.1: Priprava klororfosfatnih reagentov z aciloksialkilnimi in alkiloksikarboniloksialkilnimi skupinami.[a]



V.	R_1	R_2	Reag. **1**	Produkt **2**, izkoristek[b]	Produkt **3**, izkoristek[b]	Produkt **4**, konverzija[c] (cel. izkoristek)[d]
1	H	tBu	**1a**	**2a**, 74 %	**3a**, 81 %	**4a**, 85 % (51 %)
2	H	iPr	**1b**	**2b**, 65 %	**3b**, 57 %	**4b**, 80 % (30 %)
3	H	Me	**1c**	**2c**, 18 %	/	/
4	Me	OEt	**1d**	/	/	/

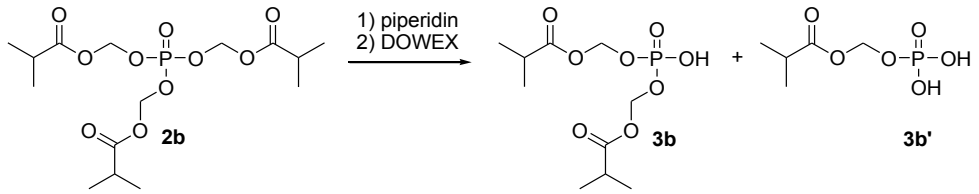
[a]Reagenti in reakcijski pogoji: (i) NaI, MeCN, refluks, 72 h; (ii) 1) piperidin, s. t. ali 0 °C - s. t., 4 ali 12 h, 2) dowex, voda, s. t., 1h; (iii) oksalil klorid, DMF, DCM, s. t., 2 h. [b]Izkoristek izoliranega in čiščenega produkta. [c]Konverzijo v produkt **4** v zadnjem koraku sem določila iz ^{1}H NMR spektra surove reakcijske zmesi. [d]Celokupen izkoristek vseh treh korakov sinteze.

Uspešno pripravljen reagent sem direktno uporabila za fosforiliranje izbranih substratov v poglavjih Priprava novega derivata fosfopantotenata, maskiranega s POM skupinami in Priprava novega derivata fosfopanteteina, maskiranega s POM skupinami, optimizirane reakcijske pogoje pa za pripravo novih klorofosfatnih reagentov.

4.1.1.1 Sinteza novega reagenta bis(*i*-BOM) klorofosfata 4b

Najprej sem želela pripraviti nov reagent z izobutirilmetilnimi (*i*-BOM) skupinami, ki so POM skupini po strukturi najbližje (Tabela 4.1, vnos 2). V prvem koraku priprave reagenta sem uspešno dosegla transesterifikacijo trimetil fosfata v tris(*i*-BOM) fosfat **2b** pod enakimi reakcijskimi pogoji kot pri pripravi POM analoga **1b**, le da sem namesto pivaloilmetilklorida **1a** uporabila klorometil izobutirat **2a**. Dobljeni produkt **2b** sem uspešno izolirala in očistila z dobrim izkoristkom (65 %). V naslednji stopnji sem pod enakimi reakcijskimi pogoji kot pri POM analogu v piperidinu želela doseči odcepitev zgolj ene *i*-BOM skupine s triestra **2b**, vendar reakcija na tem substratu ni potekla selektivno. Poleg željenega bis(*i*-BOM) hidrogen fosfata **3b** sem v LC-MS kromatogramu reakcijske zmesi opazila tudi vrh, ki po masnem piku najverjetneje ustreza mono(*i*-BOM) dihidrogen fosfatu **3b'**, ki pa ga zaradi nestabilnosti nisem uspela izolirati (Tabela 4.2).

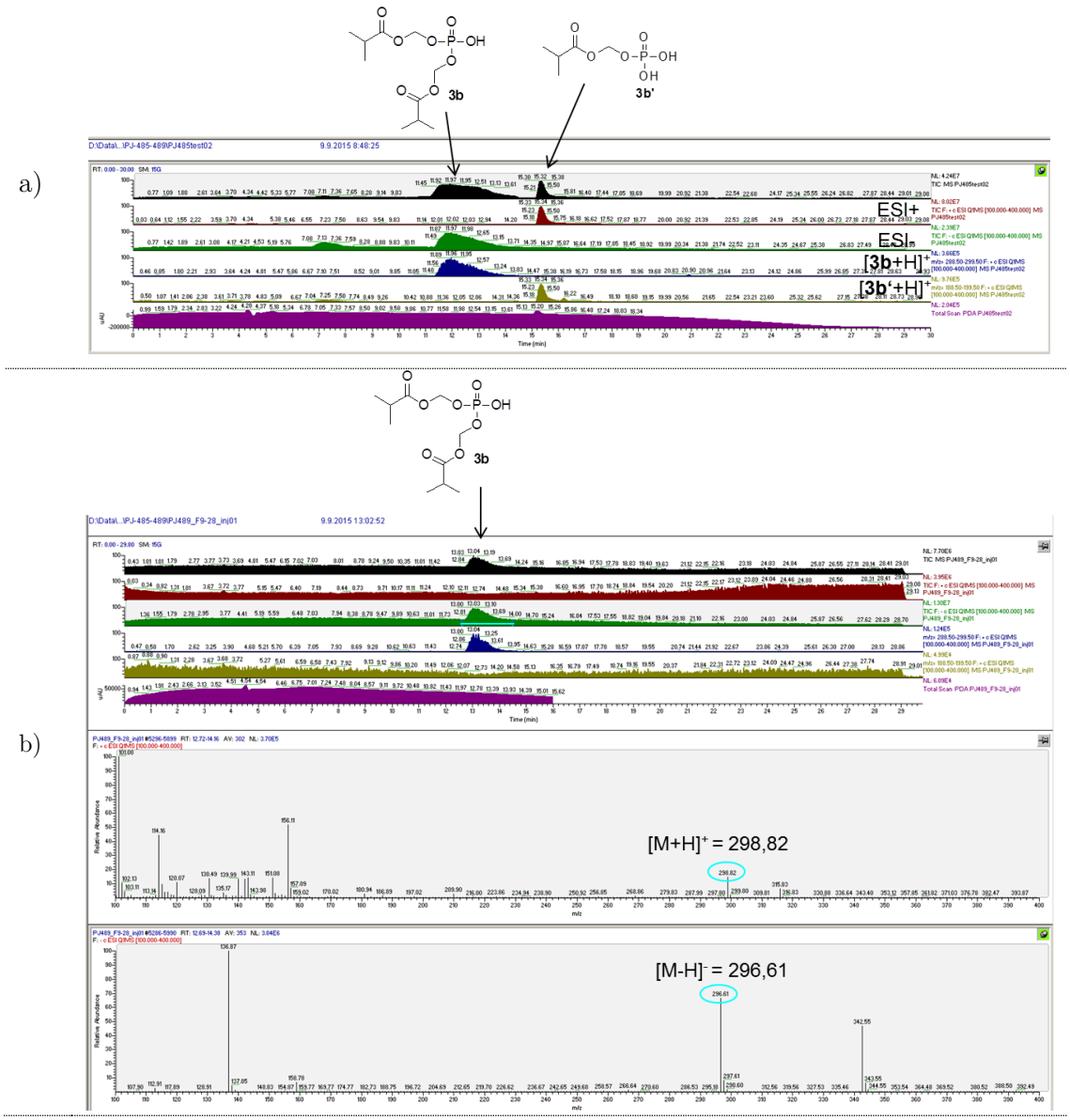
Tabela 4.2: Sinteza bis(*i*-BOM) hidrogen fosfata **3b**.[a]



Vnos	Temperatura	Porazdelitev produktov v reakcijski zmesi:[b]	
		3b	**3b'**
1	s. t.	50 %	50 %
2	0 °C – s. t.	70 %	30 %

[a]Reagenti in reakcijski pogoji: 1) piperidin, s. t. ali 0 °C - s. t., 4 h, 2) dowex, voda, s. t., 1 h; [b]Približna porazdelitev produktov **3b** in **3b'** v reakcijski zmesi, ocenjena s pomočjo LC-MS analize reakcijske zmesi.

Pod takšnimi reakcijskimi pogoji sta bis(*i*-BOM) hidrogen fosfat **3b** in mono(*i*-BOM) dihidrogen fosfat **3b'** nastala približno v razmerju 1:1 (Tabela 4.2, vnos 1). Da bi se izognila neselektivnemu poteku reakcije, sem poskusila optimizirati reakcijske pogoje. Ugotovila sem, da potek reakcije lahko delno pomaknem v prid nastanka želenega produkta **3b**, če piperidin dodam pri 0 °C, nato pa reakcijsko zmes postopno ogrejem nazaj na s. t. (Tabela 4.2, vnos 2). Ker popolne selektivnosti reakcije nisem uspela doseči, sem imela veliko težav tudi pri izolaciji želenega bis(*i*-BOM) hidrogen fosfata **3b**. V nasprotju s pričakovanji produktov **3b** in **3b'** nisem uspela ločiti na ionsko-izmenjevalni koloni (Slika 4.1.a). Izolacijo čistega bis(*i*-BOM) hidrogen fosfata **3b** sem dosegla s čiščenjem na običajni koloni s silikagelom z uporabo mešanice topil etil acetata in metanola, in sicer gradientnim spreminjanjem razmerja topil od 9:1 do 1:9 (Slika 4.1b). Zaradi neselektivnosti reakcije pa je bil izkoristek izoliranega čistega produkta (57 %) precej nižji od tistega, ki sem ga dobila pri pripravi POM analoga **3a** (81 %).



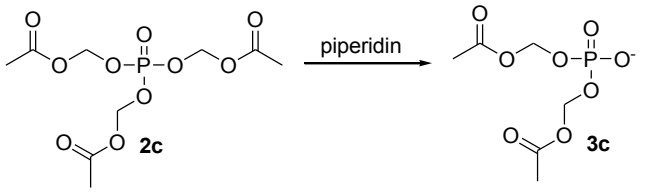
Slika 4.1: LC-MS analiza čistosti produkta **3b** po čiščenju: a) LC-MS kromatogram po čiščenju z ionsko-izmenjevalno kolono; b) LC-MS kromatogram ter ESI+ in ESI- spekter po čiščenju s kolonsko kromatografijo na silikagelu.

V zadnjem koraku sinteze sem iz dobro sušenega produkta **3b** uspešno pripravila bis(*i*-BOM) klorofosfat **4b** (Tabela 4.2, vnos 2), ki sem ga direktno uporabila za fosforiliranje izbranih substratov, predstavljeno v naslednjih poglavjih. Tudi v tem primeru sem konverzijo v zadnji stopnji določila iz ^{1}H NMR spektra surove reakcijske zmesi takoj po odparevanju preostanka oksalil klorida in topila. Določena konverzija v **4b** (80 %) je zaradi občutljivosti reagenta in možnosti razpada med analizo vzorca zelo verjetno nižja od resnične. Celokupni izkoristek priprave reagenta **4b**, ki sem ga dobila (30 %), je precej nižji od izkoristka priprave POM reagenta **4a** (51 %), kar je posledica predvsem neselektivnosti v drugem koraku sinteze (Tabela 4.2).

4.1.1.2 Poskus sinteze drugih novih aciloksialkilnih klorofosfatnih reagentov

V nadaljevanju študije sem po analognem postopku poskusila pripraviti še druge nove reagente. Najprej sem poskusila pripraviti klorofosfatni reagent, ki bi omogočal uvedbo še ene aciloksialkilne skupine, in sicer reagent z acetiloksimetilnimi (AM) skupinami (Tabela 4.1, vnos 3). V prvi stopnji sem transesterificirala trimetil fosfat v prisotnosti klorometil acetata **1c** pod enakimi reakcijskimi pogoji kot v prejšnjih primerih. Produkt tris(AM) fosfat **2c** sem sicer uspela pripraviti, vendar sem ga izolirala z zelo nizkim izkoristkom (18 %), znatno nižjim od doseženih pri sintezi analogov **2a** in **2b** (74 in 65 %). Kljub temu sem nadaljevala z naslednjim korakom sinteze. Pri reakciji v piperidinu je pod reakcijskimi pogoji, ki so bili uspešni pri sintezi POM reagenta, v tem primeru prišlo do popolnega razpada izhodne spojine, saj v reakcijski zmesi nisem uspela detektirati ne želenega produkta **3c** in ne izhodnega substrata **2c** (Tabela 4.3., vnos 1). Ker sem želela poiskati milejše reakcijske pogoje, pod katerimi bi lahko dosegla pretvorbo v **3c**, sem reakcijo ponovila z manjšo količino piperidina v različnih topilih. Izbrala sem reakcijske pogoje, ki so jih za odcep ene od treh skupin s fosfata v literaturi navedli različni avtorji [110-113], in analizirala surove reakcijske zmesi z LC-MS (Tabela 4.3., vhod 2 - 6). Ugotovila sem, da sta pri uporabi zgolj enega ekvivalenta piperidina v reakcijski zmesi prisotna tako izhodni substrat **2c** kot produkt **3c**, in sicer približno v razmerju 1:1 (Tabela 4.3., vhod 2 in 3). Pri uporabi večjih količin piperidina pa hitro pride do razpada substrata, saj v reakcijski zmesi nisem opazila ne produkta **3c** in ne izhodne spojine **2c** (Tabela 4.3., vhod 4 - 6). Ker je bil že izkoristek prvega koraka sinteze bis(AM) klorofosfatnega reagenta zelo nizek in ker je bil tudi potek drugega koraka neugoden, sem se odločila, da produkta **3c** ne bom izolirala ter da s sintezo tega reagenta ni smiselno nadaljevati (Tabela 4.1, vhod 3).

Tabela 4.3: Analiza reakcijske zmesi po reakciji **2c** s piperidinom.[a]



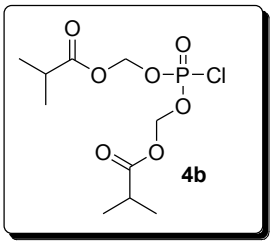
Vnos	Količina piperidina	Topilo	Izhodni substrat **2c**[b]	Produkt **3c**[b]
1	30 ekv.	Piperidin	/	/
2	1 ekv.	DCM	da	da
3	1 ekv.	MeCN	da	da
4	4 ekv.	DCM	/	/
5	4 ekv.	MeCN	/	/
6	20 vol. %	DMF	/	/

[a]Reagenti in reakcijski pogoji: 1) piperidin, s. t., 4 h. [b]Prisotnost spojin v reakcijski zmesi sem določevala s pomočjo LC-MS analize surove reakcijske zmesi. Produkta **3c** zaradi nestabilnosti nisem uspela izolirati, njegovo prisotnost pa sem prepostavila na podlagi ustreznega masnega pika v LC-MS kromatogramu.

Neuspešen je bil tudi moj poskus sinteze reagenta z alkiloksikarboniloksialkilnimi skupinami (Tabela 4.1, vhod 4). V tem primeru sem na nepremagljive težave naletela že v prvem koraku sinteze regenta. Pri transesterifikaciji trimetil fosfata v prisotnosti 1-kloroetil etil karbonata **1d** je hitro prišlo do razpada ali pa polimerizacije, saj se je reakcijska zmes zgostila in počrnela. V kompleksni reakcijski zmesi s pomočjo LC-MS

nisem uspela detektirati želenega produkta, zato sem bila tudi sintezo reagenta s to funkcionalno skupino primorana opustiti.

Koncept priprave novih klorofosfatnih reagentov za pripravo aciloksialkilnih in alkiloksikarboniloksialkilnih predzdravil z razširitvijo znane metode, ki ga prikazuje Shema 4.1, se je tako izkazal za le delno izvedljivega. Ugotovila sem, da je razširitev postopka za pripravo bis(POM) klorofosfata **4a** [99] sicer možna, ampak le za skupine, ki so po strukturi in stabilnosti zelo podobne POM skupini, saj sem bila uspešna zgolj pri sintezi bis(*i*-BOM) klorofosfata **4a** (Shema 4.2). Sklepala sem, da je za neuspešno sintezo ostalih reagentov odgovorna nestabilnost skupin. Nižjo kemijsko stabilnost aciloskialkilnih skupin z manj razvejanimi substituentami sta pokazala raziskovalca Srivastva in Farquhar, ki sta primerjala kemijsko in encimsko stabilnost različnih aciloksialkilnih skupin [86]. Zato sem sklepala, da predlagani koncept ni primeren za pripravo reagentov z manj stabilnimi skupinami, kot so manj razvejane aciloskialkilne skupine (npr. AM) ter skupine s karbonatno vezjo (Tabela 4.1, vhod 3 in 4).

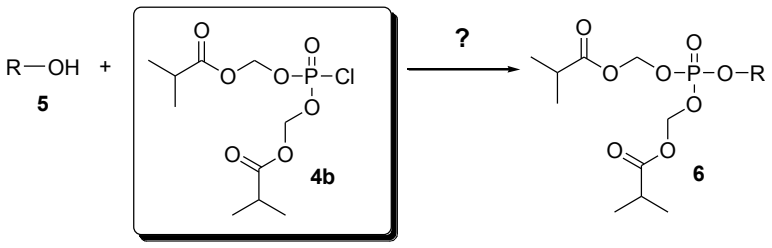


Shema 4.2: Bis(*i*-BOM) klorofosfatni reagent.

4.1.2 Uporaba novega reagenta za fosforiliranje različnih tipov alkoholov

4.1.2.1 Optimizacija reakcijskih pogojev za fosforiliranje

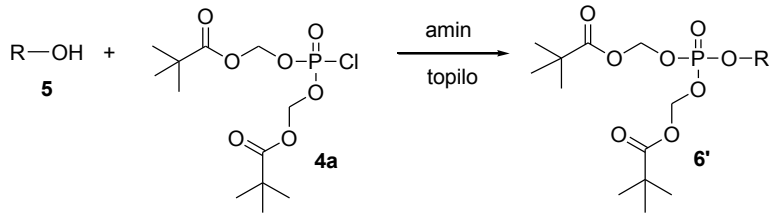
V nadaljevanju raziskav sem želela nov reagent bis(*i*-BOM) klorofosfat **4b** preizkusiti za fosforiliranje različnih alkoholov (Shema 4.3).



Shema 4.3: Fosforiliranje alkoholov z bis(*i*-BOM) klorofosfatnim reagentom **4b**.

Pred uporabo reagenta **4b** sem želela poiskati najoptimalnejše reakcijske pogoje za fosforiliranje s klorofosfatnimi reagenti. Za fosforiliranje z analogom pripravljenega reagenta, bis(POM) klorofosfatom **4a**, so različni avtorji uporabili precej neekonomične reakcijske pogoje, in sicer presežne količine reagenta **4a** in aminskih baz (Tabela 1.1).

Tabela 4.4: Primeri fosforiliranja z bis(POM) klorofosfatom **4a** iz literature.

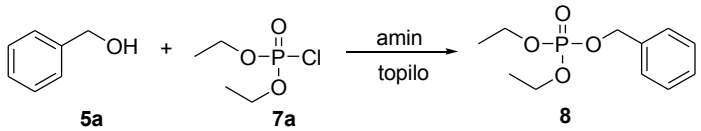


Vnos	Topilo	Ekvivalent **4a**	Amin	Ekvivalent amina	Ref.
1	Et_2O	5,1	Et_3N	7,7	[99]
2	DCM	5,3	2,6-lutidin	13,4	[114]
3	DCM	5,1	Et_3N	Ni podan	[109]
4	THF	3,7	Piridin	9,3	[96]

Ker sem želela uspešno fosforiliranje s pripravljenim reagentom **4b** doseči z manjšimi količinami reagenta in amina, sem se lotila iskanja ustreznejših pogojev od teh, ki so bili v literaturi uporabljeni za fosforiliranje s **4a** [96,99,109,114]. Za ta namen sem si izbrala poenostavljen reakcijski model, ki bi mi omogočil hitrejšo primerjavo poteka reakcije pod različnimi reakcijskimi pogoji. Za nukleofil sem si izbrala benzilni alkohol **5a**, za modelni klorofosfat pa sem izbrala komercialno dostopen reagent – dietil klorofosfat **7a**. V prvi fazi optimizacije sem želela poiskati najustreznejšo aminsko bazo ter topilo. Izbrala sem 4 različne amine oziroma kombinacije aminov, ki se v literaturi tipično uporabljajo za fosforiliranje s klorofosfatnimi reagenti: trietilamin (Et_3N) [115-122], piridin [123-128], kombinacijo *N,N*-diizopropiletil amina (DIPEA) in 4-dimetilamino piridina (DMAP) [129-133] ter 1,4-diazabiciklo[2.2.2]oktan (DABCO) [134]. Izvedla sem primerjalne eksperimente z izbranimi amini v treh različnih topilih: tatrahidrofuranu (THF),

acetonitrilu (MeCN) in diklorometanu (DCM) ter primerjala uspešnost poteka reakcije (Tabela 4.5).

Tabela 4.5: Vpliv uporabe različnih aminov in topil na fosforiliranje alkohola **5a** s klorofosfatnim reagentom **7a**.[a]



5a **7a** **8**

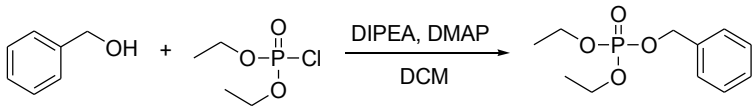
Vhod	Amin	Ekv. amina	Ekv. **7a**	Topilo	Konverzija v **8** [%][b]
1	Et_3N	1,5	1,5	THF	10
2	Et_3N	1,5	1,5	MeCN	21
3	Et_3N	1,5	1,5	DCM	34
4	Piridin	1,5	1,5	THF	13
5	Piridin	1,5	1,5	MeCN	78
6	Piridin	1,5	1,5	DCM	83
7	DABCO	1,5	1,5	THF	84
8	DABCO	1,5	1,5	MeCN	68
9	DABCO	1,5	1,5	DCM	84
10	DIPEA, DMAP	1,5 0,1	1,5	THF	83
11	DIPEA, DMAP	1,5 0,1	1,5	MeCN	42
12	DIPEA, DMAP	1,5 0,1	1,5	DCM	93

[a] Reagenti in reakcijski pogoji: benzil alkohol **5a** (0,5 mmol) in amin sem raztopila v topilu (2,5 ml) ter po kapljicah dodala dietil klorofosfat **7a** (1,5 ekv.) pod Ar atmosfero. Reakcijsko zmes sem mešala še 2 uri pri s. t.; [b]Konverzijo v **8** sem določila iz ^{1}H NMR spektra surove reakcijske zmesi.

Ugotovila sem, da je reakcija potekla z najvišjo konverzijo v **8** ob uporabi razvejane baze DIPEA in podstehiometričnih količin DMAP v diklorometanu (Tabela 4.5, vnos 12). Za to kombinacijo aminov v literaturi poročajo, da je zelo primerna tudi za fosforiliranje biološko aktivnih molekul [131,135,136], zato sem nadaljevala z optimizacijo reakcijskega sistema z uporabo DIPEA in DMAP.

V nadaljevanju sem želela poiskati optimalno količino klorofosfatnega reagenta, ki zadostuje za uspešno fosforiliranje. Primerjavo poteka primerjalnih eksperimentov prikazuje Tabela 4.6. Dobro pretvorbo v produkt **8** (94 %) sem dosegla z uporabo 1,3 ekvivalentov reagenta (Tabela 4.6, vnos 4). Dodatno večanje količine **7a** ni doprineslo k boljši konverziji (Tabela 4.6, vnos 5–7), zato sem pri nadaljnji optimizaciji pogojev uporabljala 1,3 ekvivalenta **7a**.

Tabela 4.6: Vpliv količine klorofosfatnega reagenta **7a** na potek fosforiliranja alkohola **5a**.[a]



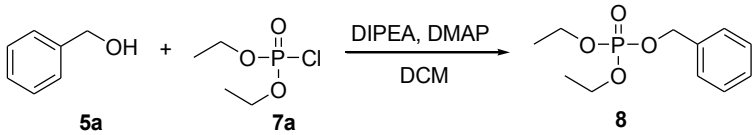
5a **7a** **8**

Vnos	Ekvivalent **7a**	Konverzija v **8** [%][b]
1	1	15
2	1,1	68
3	1,2	74
4	1,3	94
5	1,4	89
6	1,5	93
7	2	87

[a]Reagenti in reakcijski pogoji: benzil alkohol **5a** (0,5 mmol) DIPEA (1,5 ekv.) in DMAP (0,1 ekv.) sem raztopila v DCM (2,5 ml) ter po kapljicah dodala dietil klorofosfat **7a** (1–2 ekv.) pod Ar atmosfero. Reakcijsko zmes sem mešala še 2 uri pri s. t.; [b]Konverzijo v **8** sem določila iz ^{1}H NMR spektra surove reakcijske zmesi.

V naslednjem koraku optimizacije sem želela poiskati ustrezno količino DIPEA (Tabela 4.7). Ugotovila sem, da spreminjanje količine uporabljene baze od 1 ekvivalenta do 2 ekvivalentov nima znatnejšega vpliva na potek reakcije ter da za uspešno pretvorbo v 7**a** zadostuje 1,5 ekvivalenta DIPEA v kombinaciji z 0,1 ekvivalentom DMAP (Tabela 4.7, vnos 6).

Tabela 4.7: Vpliv količine amina na potek fosforiliranja alkohola **5a** s klorofosfatnim reagentom **7a**.[a]



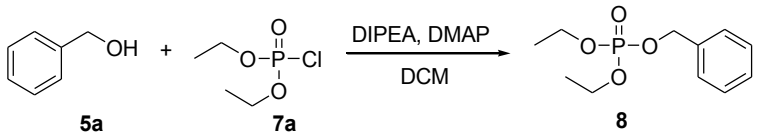
5a **7a** **8**

Vnos	Ekvivalent DIPEA	Konverzija v **8** [%][b]
1	1	85
2	1.1	88
3	1.2	84
4	1.3	86
5	1.4	89
6	1.5	94
7	2	86

[a]Reagenti in reakcijski pogoji: benzil alkohol **5a** (0,5 mmol) DIPEA (1–2 ekv.) in DMAP (0,1 ekv.) sem raztopila v DCM (2,5 ml) ter po kapljicah dodala dietil klorofosfat **7a** (1,3 ekv.) pod Ar atmosfero. Reakcijsko zmes sem mešala še 2 uri pri s. t.; [b]Konverzijo v **8** sem določila iz ^{1}H NMR spektra surove reakcijske zmesi.

Optimizirati sem želela tudi reakcijski čas. Primerjala sem konverzije v **8** po različnih reakcijskih časih od 15 minut do 20 ur (Tabela 4.8). Ugotovila sem, da reakcija uspešno poteče po 2 urah ter da nadaljnje podaljševanje reakcijskega časa ni smiselno (Tabela 4.8, vnos 4).

Tabela 4.8: Vpliv reakcijskega časa na potek fosforiliranja alkohola **5a** s klorofosfatnim reagentom **7a**.[a]



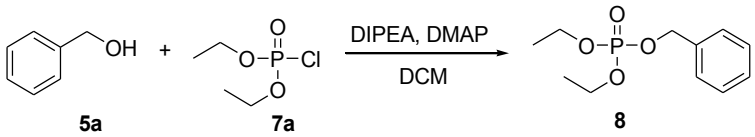
5a **7a** **8**

Vnos	Reakcijski čas [h]	Konverzija v **8** [%][b]
1	0,25	33
2	0,5	35
3	1	48
4	2	94
5	20	94

[a]Reagenti in reakcijski pogoji: benzil alkohol **5a** (0,5 mmol) DIPEA (1,5 ekv.) in DMAP (0,1 ekv.) sem raztopila v DCM (2,5 ml) ter po kapljicah dodala dietil klorofosfat **7a** (1,3 ekv.) pod Ar atmosfero. Reakcijsko zmes sem mešala še 0,25 do 20 ur pri s. t.; [b]Konverzijo v **8** sem določila iz ^{1}H NMR spektra surove reakcijske zmesi.

S pomočjo primerjave optimizacijskih eksperimentov na modelnem sistemu sem dobila optimalen reakcijski sistem, ki vključuje 1,3 ekvivalenta klorofosfatnega reagenta, 1,5 ekvivalentov DIPEA, 0,1 ekvivalenta DMAP, reakcija pa uspešno poteče v diklorometanu v 2 urah pod inertnimi pogoji s 94 % konverzijo. Tako dobljene reakcijske pogoje oziroma vpliv prisotnih reagentov sem na koncu študije preverila tudi s slepimi eksperimenti (Tabela 4.9). Ugotovila sem, da je za uspešno fosforiliranje ključna prisotnost tako DIPEA kot tudi podstehiometričnih količin DMAP, ki ima najverjetneje vlogo pomožnega nukleofila, saj je reakcija v odsotnosti posameznega amina potekla zgolj z 10 % izkoristkom (Tabela 4.9, vnos 2 in 3).

Tabela 4.9: Slepi eksperimenti za fosforiliranje alkohola **5a** s klorofosfatnim reagentom **7a**.[a]



5a **7a** **8**

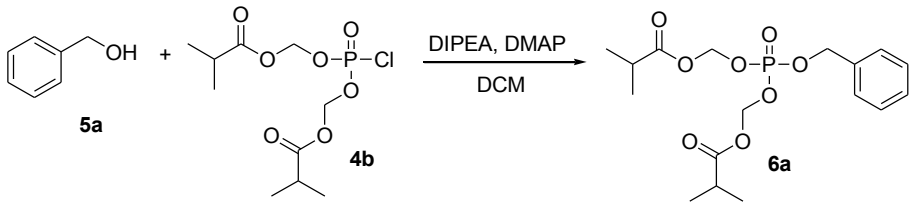
Vnos	Ekvivalent DIPEA	Ekvivalent DMAP	Konverzija v **8** [%][b]
1	1,5	0,1	94
2	/	0,1	10
3	1,5	/	11
4	/	/	6

[a]Reagenti in reakcijski pogoji: benzil alkohol **5a** (0,5 mmol) DIPEA (0 ali 1,5 ekv.) in DMAP (0 ali 0,1 ekv.) sem raztopila v DCM (2,5 ml) ter po kapljicah dodala dietil klorofosfat **7a** (1,3 ekv.) pod Ar atmosfero. Reakcijsko zmes sem mešala še 2 h pri s. t.; [b]Konverzijo v **8** sem določila iz ^{1}H NMR spektra surove reakcijske zmesi.

4.1.2.2 Fosforiliranje z novim reagentom, bis(*i*-BOM) klorofosfatom

V naslednjem koraku študije sem želela optimizirane reakcijske pogoje iz modelnega sistema prenesti na reakcijski sistem za fosforiliranje alkoholov z novim reagentom bis(*i*-BOM) klorofosfatom **4b**. Za prvi substrat sem si ponovno izbrala benzil alkohol **5a** in ga fosforilirala s **4b** (Tabela 4.10). Pri prenosu sistema sem zaradi občutljivosti reagenta in praktičnosti izvedbe eksperimentalne pogoje nekoliko prilagodila. Reagent **4b** sem pred dodajanjem substratu raztopila v manjši količini topila (DCM) ter ga dodajala v reakcijsko zmes pri 0 °C, nato pa reakcijsko zmes pustila ogreti se na sobno temperaturo. Poleg tega sem ugotovila, da je za uspešno fosforiliranje benzil alkohola **5a** potrebno uporabiti 1,5 ekvivalenta reagenta **4b** (Tabela 4.10, vnos 2), saj je reakcija pri uporabi zgolj 1,3 ekvivalenta **4b** potekla znatno slabše (Tabela 4.10, vnos 1).

Tabela 4.10: Fosforiliranje alkohola **5a** z bis(*i*-BOM) klorofosfatom **4b**.[a]



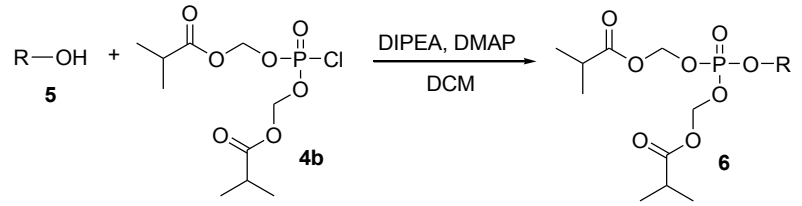
5a **4b** **6a**

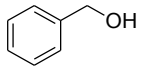
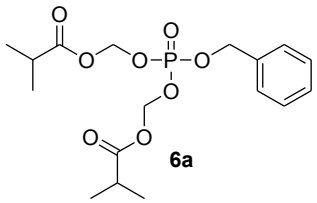
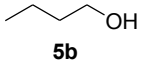
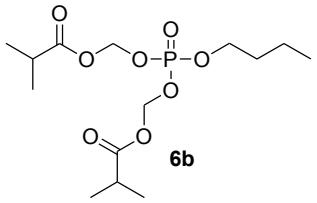
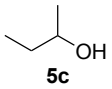
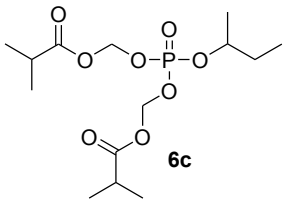
Vnos	Ekvivalent **4b**	Izkoristek **6a** [%][b]
1	1,3	29
2	1,5	72

[a]Reagenti in reakcijski pogoji: benzil alkohol **5a** (1 mmol) DIPEA (1,5 ekv.) in DMAP (0,1 ekv.) sem raztopila v DCM (6 ml) ter po kapljicah dodala raztopino bis(*i*-BOM) klorofosfata **4b** (1,3 ali 1,5 ekv.) v DCM (6 ml) pod Ar atmosfero. Reakcijsko zmes sem mešala še 12 h pri s. t.; [b]Izkoristek izoliranega in čiščenega produkta.

Poleg benzil alkohola **5a** sem si za fosforiliranje z bis(*i*-BOM) klorofosfatom **4b** izbrala še dva modelna alkohola, in sicer butan-1-ol **5b** in butan-2-ol **5c** (Tabela 4.11). Oba primarna alkohola (**5a** in **5b**) sem fosforilirala z dobrim izkoristkom (72–77 %), sekundarni alkohol (**5c**) pa pričakovano z nekoliko nižjim izkoristkom (39 %).

Tabela 4.11: Fosforiliranje alkoholov z bis(*i*-BOM) klorofosfatom **4b.**[a]

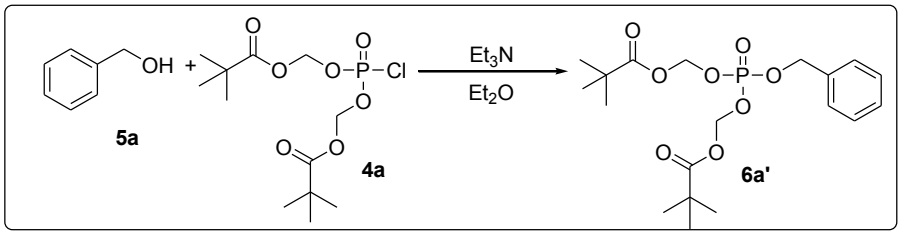


Alkohol	Produkt	Izkoristek[b]
 **5a**	 **6a**	72 %
 **5b**	 **6b**	77 %
 **5c**	 **6c**	39 %

[a]Reagenti in reakcijski pogoji: alkohol **5a**, **5b** ali **5c** (1 mmol) DIPEA (1,5 ekv.) in DMAP (0,1 ekv.) sem raztopila v DCM (10 mL) ter po kapljicah dodala raztopino bis(*i*-BOM) klorofosfata **4b** (1,5 equiv.) v DCM (5 mL) pri 0 °C pod Ar atmosfero. Reakcijsko zmes sem mešala še 12 h pri s. t.; [b]Izkoristek izoliranega in čiščenega produkta.

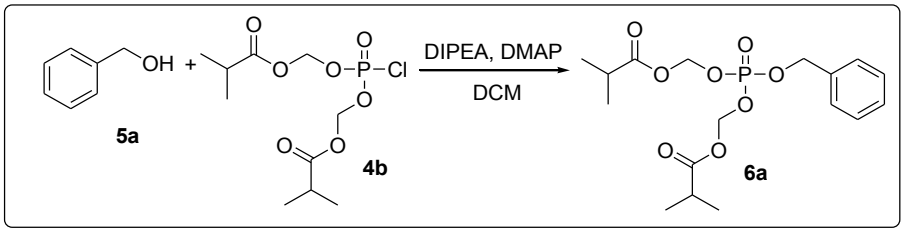
Izkoristki, ki sem jih dosegla (39–77 %), so nekoliko slabši od tistih, ki sta jih na enakih substratih dosegla raziskovalca Hwang in Cole pri fosforiliranju z analognim reagentom **4a** (45–90 %) [99]. Vendar pa velja poudariti, da sem sama za fosforiliranje uporabila neprimerno bolj mile in ekonomične reakcijske pogoje od tistih, ki so jih avtorji uporabili v literaturi (Tabela 4.4 in Shema 4.4). Avtorja Hwang in Cole sta z bis(POM) klorofosfatom **4a** fosforilirala benzil alkohol **5a** s 81 % izkoristkom, vendar sta zato uporabila 5,1 ekvivalentov reagenta **4a** in 7,7 ekvivalentov Et_3N (Shema 4.4a). V mojem primeru pa sem benzil alkohol **5a** fosforilirala z bis(*i*-BOM) klorofosfatom **4b** z 72 % izkoristkom, za to pa sem potrebovala zgolj 1,5 ekvivalenta reagenta **4b**, 1,5 ekvivalenta DIPEA in 0,1 ekvivalenta DMAP (Shema 4.4b).

a)



Ekv. **4a**	Amin	Ekv. amina	Izkoristek	Ref.	E faktor[(brez topil)a]	E faktor[b]
5,1	Et_3N	7,7	81 %	[99]	6,8	770

b)



Ekv. **4a**	Amin	Ekv. amina	Izkoristek	Ref.	E faktor[(brez topil)a]	E faktor[b]
1,5	DIPEA DMAP	1,5 0,1	72 %	-	1,8	1037

[a]E faktor[(brez topil)a] sem izračunala po formuli $E\ faktor\ (brez\ topil) = \frac{Masa\ odpada\ (brez\ topil)}{masa\ produkta}$, pri tem pa nisem upoštevala mase odpada, ki jo prispevajo uporabljena topila [b]E faktor sem izračunala po fromuli $E\ faktor = \frac{Celotna\ masa\ odpada}{masa\ produkta}$, pri čemer sem pri masi odpada upoštevala tudi maso topil, uporabljenih pri reakciji, ekstrakciji ter pri kolonjskem čiščenju.

Shema 4.4: Primerjava reakcijskih pogojev: a) fosforiliranje z bis(POM) klorofosfatom **4a** **[99];** b) fosforiliranje z novim reagentom, bis(*i*-BOM) klorofosfatom **4b**.

Optimizirane reakcijske pogoje sem želela z uporabljenimi v literaturi natančneje primerjati še s pomočjo izračuna E faktorja [137]. Izračunala sem E faktor[(brez topil)], pri čemer nisem upoštevala mase odpadnih topil, ter E faktor z upoštevanjem celotne mase odpada, ki zajema tudi topila, uporabljena pri reakciji, izolaciji in čiščenju produkta (Shema 4.4). Izračunani vrednosti za E faktor[(brez topil)] potrdita, da je moj reakcijski sistem res bolj ekonomičen. Vendar pa izračun E faktorja, pri katerem sem upoštevala celotno maso odpada, pokaže nižjo vrednost za sintezo produkta **6a'** iz literature. To pomeni, da pri moji reakciji, izolaciji in čiščenju produkta nastane večja masa odpada, kot pri postopku iz literature, za kar je kriva predvsem uporaba diklorometana pri reakciji in izolaciji produkta, ki bi ga bilo smiselno zamenjati z etil acetatom, ki so ga uporabili v literaturi. Velja poudariti, da sta celokupna E faktorja obeh reakcij zelo visoka in da bi bilo za sprejemljiveše vrednosti E faktorja nujno optimizirati predvsem postopek izolacije in čiščenja produkta. K tako visokim vrednostim E faktorjev namreč prispeva predvsem masa topil, ki se jih uporabi pri izolaciji in kromatografskem čiščenju.

4.1.2.3 Fosforiliranje v manj strupenih topilih

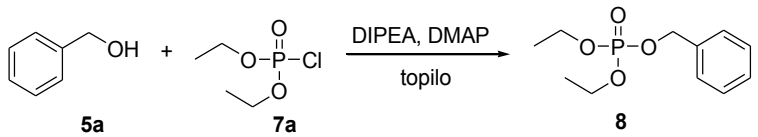
V zadnjem delu raziskave, povezane s pripravo novega aciloksialkilnega klorofosfatnega reagenta, sem želela preveriti možnost uporabe reagenta **4b** za fosforiliranje v topilih, ki so manj strupena in nevarna za človekovo zdravje. V farmacevtski industriji se je namreč potrebno čim bolj izogniti uporabi toksičnih topil, saj so ostanki topil kljub čiščenju v manjših količinah še prisotni v sintetizirani zdravilni učinkovini [138]. Ostanke topil je potrebno v najboljši možni meri odstraniti, da se lahko doseže predpisane specifikacije produkta, standarde dobre proizvodne prakse (GMP) in druge kakovostne standarde [139]. Ostanki topil so glede na oceno tveganja in vrednosti dovoljene dnevne izpostavitve (*permitted daily exposure,* PDE) razdeljeni v več razredov (Tabela 4.12) [139]. Zaželeno je, da pri sintezi, čiščenju in kristalizaciji zdravilnih učinkovin, če je le mogoče, uporabimo manj toksična topila iz 3. razreda ostankov topil (Tabela 4.12, Razred 3).

Tabela 4.12: Razvrstitev ostankov topil glede na oceno tveganja.

Razred ostankov topil		Primeri topil
Razred 1	Topila, ki se jim je potrebno izogniti: - potrjeni karcinogeni, - topila, ki so najverjetneje karcinogena, - okolju nevarna topila.	Benzen, karbon tetraklorid, 1,2-dikloroetan, 1,1-dikloroeten itd.
Razred 2	Topila, katerih uporabo je potrebno čim bolj omejiti: - negenotoksični živalski karcinogeni ali verjetni povzročitelji druge ireverzibilne toksičnosti, kot je nevrotoksičnost ali teratogenost, - topila, ki so najverjetneje močno, ampak reverzibilno toksična.	Acetonitril, kloroform *N,N*-dimetilformamid, etilen glikol, heksan, metanol, **diklorometan**, piridin, tetrahidrofuran, toluen itd.
Razred 3	Topila z nizko toksičnostjo: - zdravila, ki so za ljudi praktično nestrupena, - dovoljena dnevna izpostavitev (PDE) tudi do 50 mg /dan.	Ocetna kislina, **heptan**, pentan aceton, anizol, **etil acetat**, izopropil acetat, etanol, 1-butanol, 2-butanol, 1-propanol, 2-propanol, **tert-butilmetil eter**, dietil eter, dimetil sulfoksid itd.
Ostali ostanki topil	Tudi ta topila so zanimiva za proizvodnjo zdravil, vendar ni podatkov o toksičnosti.	1,1-dimetoksimetan, **2-metiltetrahidrofuran**, trikloroocetna kislina, izopropil eter, trifluoroocetna kislina, itd.

Zato sem tudi sama želela fosforiliranje z bis(*i*-BOM) klorofosfatom **4b** izvesti v manj strupenih topilih. Izbrala sem si topila: heptan, *terc*-butilmetil eter (*t*-BuOMe), etil acetat (EtOAc) in 2-metiltetrahidrofuran (2-MeTHF). Za preizkus ustreznosti izbranih topil za fosforiliranje s klorofosfatnimi reagenti sem se ponovno vrnila k modelnemu sistemu in primerjala potek fosforiliranja benzilnega alkohola **5a** z dietil klorofosfatom **7a** v izbranih topilih (Tabela 4.13).

Tabela 4.13: Primerjava poteka fosforiliranja s klororfosfatnim reagentom **7a** v diklorometanu in izbranih manj strupenih topilih.[a]



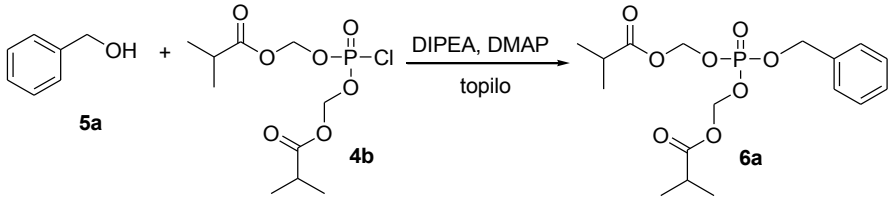
5a **7a** **8**

Vnos	Topilo	Konverzija v **8** [%][b]
1	DCM	94
2	heptan	31
3	t-BuOMe	50
4	EtOAc	74
5	2-MeTHF	82

[a]Reagenti in reakcijski pogoji: benzil alkohol **5a** (0,5 mmol) DIPEA (1,5 ekv.) in DMAP (0,1 ekv.) sem raztopila v topilu (2,5 ml) ter po kapljicah dodala dietil klorofosfat **7a** (1,3 ekv.) pod Ar atmosfero. Reakcijsko zmes sem mešala še 2 h pri s. t.; [b]Konverzijo v **8** sem določila iz ^{1}H NMR spektra surove reakcijske zmesi.

Konverzije, ki sem jo dosegla pri fosforiliranju v diklorometanu (Tabela 4.13, vnos 1), nisem uspela doseči, sem pa se ji približala v 2-metiltetrahidrofuranu (Tabela 4.13, vnos 5). Topilo sem zato uporabila še za fosforiliranje z novim regentom **4b** in tudi v tem primeru uspešno izolirala željen produkt z nekoliko manjšim, vendar uporabnim izkoristkom (Tabela 4.14).

Tabela 4.14: Primerjava fosforiliranja s **4b** v diklorometanu in 2-metiltetrahidrofuranu.[a]



5a **4b** **6a**

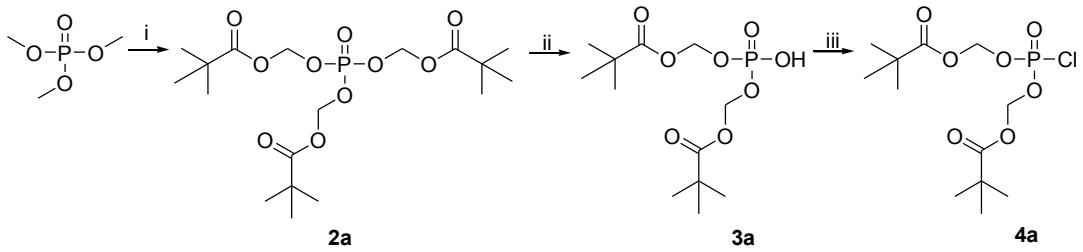
Vnos	Topilo	Izkoristek **6a** [%][b]
1	DCM	72
2	2-Me-THF	30

[a]Reagenti in reakcijski pogoji: benzil alkohol **5a** (1 mmol) DIPEA (1,5 ekv.) in DMAP (0,1 ekv.) sem raztopila v topilu (6 ml) ter po kapljicah dodala raztopino bis(*i*-BOM) klorofosfata **4b** (1,3 ali 1,5 ekv.) v topilu (6 ml) pod Ar atmosfero. Reakcijsko zmes sem mešala še 12 h pri s. t.; [b]Izkoristek izoliranega in čiščenega produkta.

4.1.3 Eksperimentalno delo

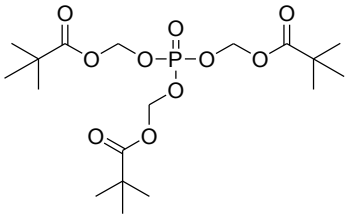
4.1.3.1 Eksperimentalni podatki za sintezo bis(POM) klorofosfata 4a

Bis(POM) klorofosfatni reagent **4a** je bil pripravljen v 3 korakih, kot prikazuje Shema 4.5. Eksperimentalni podatki za stopnje sinteze (i), (ii) in (iii) so opisani pri posameznih produktih **2a**, **3a** in **4a**.



Shema 4.5: Sinteza bis(POM) klorofosfata **4a**. Reagenti in reakcijski pogoji: (i) NaI, MeCN, refluks, 72 h; (ii) 1) piperidin, s. t., 12 h, 2) dowex, voda, s. t., 1h; (iii) oksalil klorid, DMF, DCM, s. t., 2 h.

Tris(pivaloiloksimetil) fosfat (2a) [99]



$C_{18}H_{33}O_{10}P$, M_r = 440,18

Priprava (i): Raztopini trimetil fosfata (2,8 g, 20 mmol) v suhem MeCN (17 mL) sem dodala klorometil pivalat **1a** (11,2 ml, 78 mmol) in NaI (8,99 g, 60 mmol) pod Ar atmosfero. Reakcijsko zmes sem segrevala pri temperaturi refluksa (85 °C) 72 ur, jo ohladila na sobno temperaturo in razredčila z Et_2O (160 mL). Organsko fazo sem spirala z vodo (2 x 50 ml) in nasičeno raztopino $Na_2S_2O_3$ (2 x 50 mL), jo sušila z Na_2SO_4 in koncentrirala pod znižanim tlakom.
Čiščenje: kolonska kromatografija na silikagelu, mobilna faza: heksan-EtOAc, 4:1.
Izkoristek: 6,478 g (74 %); svetlo rumeno olje.
Rf = 0,25 (heksan-EtOAc, 4:1).

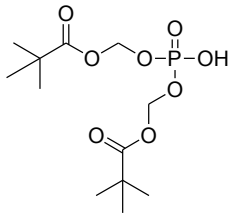
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 1,24 (s, 27 H), 5,66 (d, J = 13,7 Hz, 6 H).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 26,95, 38,89, 82,93 (d, J = 5,0 Hz), 176,73.

^{31}P NMR (120 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = -4,74 (s).

HR-MS (M+H$^+$) izračunano za $C_{18}H_{34}O_{10}P$: 441,1890; izmerjeno: 441,1901.

Bis(pivaloiloksimetil) hidrogen fosfat (3a) [99]



$C_{12}H_{23}O_8P$, M_r = 326,11

Priprava (ii): Tris(pivaloiloksimetil) fosfat **2a** (1 g, 2,3 mmol) sem raztopila v piperidinu (7 mL) in reakcijsko zmes mešala pri sobni temperaturi 12 ur. Reakcijsko zmes sem koncentrirala pri znižanem tlaku in sušila na vakuumski črpalki do konstantne mase (935 mg, 99,0 %). Surovo olje (935 mg, 2,28 mmol) sem raztopila v destilirani vodi (20 ml) in dodala ionsko-izmenjevalno smolo v H^+ obliki Dowex W50X2 (19,2 g, 11,4 mmol, 0,6 mmol/g). Suspenzijo sem mešala pri sobni temperaturi 1 uro. Ionsko-izmenjevalno smolo sem nato filtrirala in spirala z vodo. Filtrat sem koncentrirala pod znižanim tlakom in sušila pod vakuumom 12 ur.
Izkoristek: 609 mg (82 %); bela mazljiva pasta.

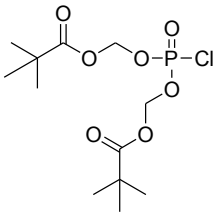
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 1,23 (s, 18 H), 5,62 (d, J = 13,2 Hz, 4 H), 8,45 (bs, 1 H).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 26,96, 38,85, 82,88 (d, J = 5,1 Hz), 177,02.

^{31}P NMR (120 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = -3,37 (s).

HR-MS ($M+H^+$) izračunano za $C_{12}H_{24}O_8P$: 327,1209; izmerjeno: 327,1207.

Bis(pivaloiloksimetil) klorofosfat (4a) [99]



$C_{12}H_{22}ClO_7P$ $M_r = 344{,}08$

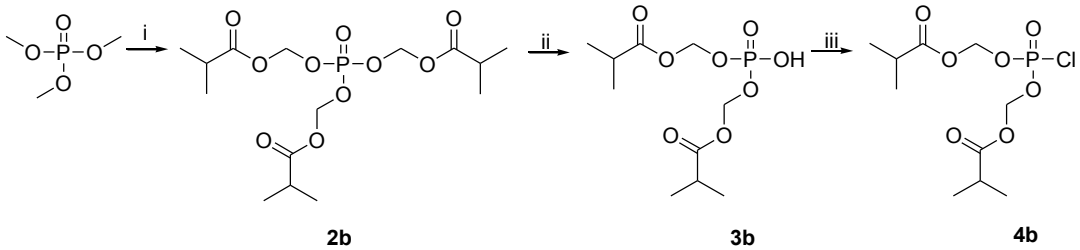
Priprava (iii): Raztopino bis(pivaloiloksimetil) hidrogen fosfata **3a** (576 mg, 1,77 mmol) in DMF (17 µL, 0,22 mmol) v DCM (6,5 mL) sem po kapljicah med mešanjem dodala raztopini oksalil klorida (788 µL, 8,85 mmol) v DCM (6,5 mL) pod Ar pri sobni temperaturi. Reakcijsko zmes sem mešala 2 uri pri sobni temperaturi in nato koncentrirala pod znižanim tlakom. Produkt **4a** sem hranila pod Ar atmosfero in direktno uporabila za fosforiliranje.
Izkoristek: 516 mg (1,5 mmol); rumeno olje.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 1,25 (s, 18 H), 5,80 (m, 4 H).

^{31}P NMR (120 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 3,25 (s).

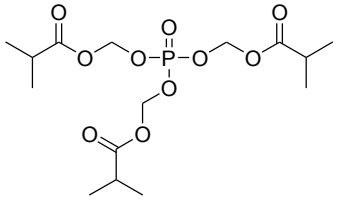
4.1.3.2 Eksperimentalni podatki za sintezo bis(*i*-BOM) klorofosfata 4b

Bis(*i*-BOM) klorofosfatni reagent **4b** je bil pripravljen v 3 korakih, kot prikazuje Shema 4.6. Eksperimentalni podatki za stopnje sinteze (i), (ii) in (iii) so opisani pri posameznih produktih **2b**, **3b** in **4b**.



Shema 4.6: Sinteza bis(i-BOM) klorofosfata **4b**. [a]Reagenti in reakcijski pogoji: (i) NaI, MeCN, refluks, 72 h; (ii) 1) piperidin, 0 °C - s. t., 4 h, 2) dowex, voda, s. t., 1h; (iii) oksalil klorid, DMF, DCM, s. t., 2 h

Tris(izobutiriloksimetil) fosfat (2b)



$C_{15}H_{27}O_{10}P$, M_r = 398,13

Priprava (i): Raztopini trimetil fosfata (7,0 g, 50 mmol) v suhem MeCN (43 mL) sem dodala klorormetil izobutirat **1b** (25,96 ml, 195 mmol) in NaI (22,48 g, 150 mmol) pod Ar atmosfero. Reakcijsko zmes sem segrevala pri temperaturi refluksa (85 °C) 72 ur, jo ohladila na sobno temperaturo in razredčila z Et_2O (400 mL). Organsko fazo sem spirala z vodo (2 x 100 ml) in nasičeno raztopino $Na_2S_2O_3$ (2 x 100 mL), jo sušila z Na_2SO_4 in koncentrirala pod znižanim tlakom.
Čiščenje: kolonska kromatografija na silikagelu, mobilna faza: heksan-EtOAc, 4:6
Izkoristek: 12,938 g (65 %); svetlo rumeno olje.
Rf = 0,33 (heksan-EtOAc, 4:6).

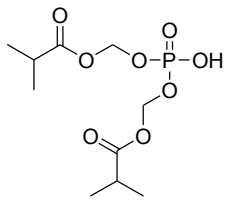
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 1,21 (d, J = 7,0 Hz, 18 H), 2,63 (hept, J = 7,0 Hz, 3 H), 5,6 (d, J = 13,7 Hz, 6 H).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 18,59, 33,79, 82,70 (d, J = 5,1 Hz), 175,21.

^{31}P NMR (120 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = -4,76 (s).

HR-MS (M+H^+) izračunano za $C_{15}H_{28}O_{10}P$: 399,1420; izmerjeno: 399,1410

Bis(izobutiriloksimetil) hidrogen fosfat (3b)



$C_{10}H_{19}O_8P$, M_r = 298,08

Priprava (ii): Tris(izobutiriloksimetil) fosfat **2b** (4,90 g, 12,3 mmol) sem raztopila v piperidinu (30 mL) pri 0 °C. Reakcijsko zmes sem nato pustila počasi segreti se na sobno temperaturo in mešala dodatne 4 ure. Reakcijsko zmes sem koncentrirala pri znižanem tlaku in sušila na vakuumski črpalki do konstantne mase (4,67 g, 99,0 %). Surovo olje (4,67 mg, 12,2 mmol) sem raztopila v destilirani vodi (100 ml) in dodala ionsko-izmenjevalno smolo v H^+ obliki Dowex W50X2 (102 g, 61 mmol, 0,6 mmol/g). Suspenzijo sem mešala pri sobni temperaturi 1 uro. Ionsko-izmenjevalno smolo sem nato filtrirala in spirala z vodo. Filtrat sem koncentrirala pod znižanim tlakom in sušila pod vakuumom 12 ur.
Čiščenje: Kolonska kromatografija na silikagelu, mobilna faza: EtOAc-MeOH gradient topila od 9:1 do 1:9.
Izkoristek: 609 mg (82 %); svetlo rumeno viskozno olje.
Rf = 0,19 (EtOAc-MeOH, 8:2).

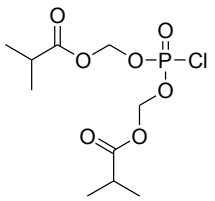
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 1,15 (d, J = 7,0 Hz, 12 H), 2,58 (hept, J = 7,0 Hz, 2 H), 5,53 (d, J = 10,1 Hz, 4 H).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 18,72, 33,92, 83,08 (d, J = 4,1 Hz), 176,62.

^{31}P NMR (120 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = -3,45 (s).

HR-MS ($M+H^+$) izračunano za $C_{10}H_{20}O_8P$: 299,0896; izmerjeno: 299,0893.

Bis(izobutiriloksimetil) klorofosfat (4b)



$C_{10}H_{18}ClO_7P$ M_r = 316,05

Priprava (iii): Raztopino bis(izobutiriloksimetil) hidrogen fosfata **3b** (1,789 g, 6 mmol) in DMF (59 µL, 0,76 mmol) v DCM (24 mL) sem po kapljicah med mešanjem dodala raztopini oksalil klorida (2,6 mL, 30 mmol) v DCM (24 mL) pod Ar pri sobni temperaturi. Reakcijsko zmes sem mešala 2 uri pri sobni temperaturi in nato koncentrirala pod znižanim tlakom. Produkt **4a** sem hranila pod Ar atmosfero in direktno uporabila za fosforiliranje
Izkoristek: 1,517 g (4,8 mmol); oranžna pasta.

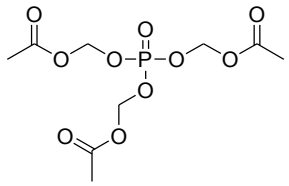
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 1,22 (d, J = 7,0 Hz, 12 H), 2,63 (m, 2 H), 5,73 (d, J = 9,4 Hz, 4 H).

^{31}P NMR (120 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 3,12 (s).

4.1.3.3 Eksperimentalni podatki za sintezo tris(AM) fosfata 2c

Trsi(AM) fosfat **2c** je bil pripravljen po opisanem postopku v enem koraku:

Tris(acetiloksimetil) fosfat (2c)



$C_9H_{15}O_{10}P$, M_r = 314,04

Priprava: Raztopini trimetil fosfata (1,4 g, 10 mmol) v suhem MeCN (8,5 mL) sem dodala klorometil acetat **1c** (4,0 ml, 39 mmol) in NaI (4,50 g, 30 mmol) pod Ar atmosfero. Reakcijsko zmes sem segrevala pri temperaturi refluksa (85 °C) 72 ur, jo ohladila na sobno temperaturo in razredčila z Et_2O (50 mL). Organsko fazo sem spirala z vodo (2 x 20 ml) in nasičeno raztopino $Na_2S_2O_3$ (2 x 20 mL), jo sušila z Na_2SO_4 in koncentrirala pod znižanim tlakom.
Čiščenje: Kolonska kromatografija na silikagelu, mobilna faza: heksan-EtOAc, 7:3.
Izkoristek: 0,566 g (18 %); svetlo rumeno olje.
Rf = 0,35 (heksan-EtOAc, 7:3).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 2,16 (s, 9 H), 5,65 (d, J = 13,6 Hz, 6 H).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 20,70, 82,67 (d, J = 5,1 Hz), 169,22.

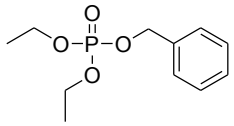
^{31}P NMR (120 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = -5,27 (s).

HR-MS ($M+H^+$) izračunano za $C_9H_{16}O_{10}P$: 315,0481; izmerjeno: 315,0476.

4.1.3.4 Eksperimentalni podatki za fosforiliranje benzil alkohola 5a z dietil klorofosfatom 7a

Tipičen eksperimentalni postopek pri optimizaciji reakcijskih pogojev fosforiliranja na modelnem sistemu: Benzilni alkohol **5a** (56 mg, 0,5 mmol) in amin sem raztopila v topilu (2,5 ml) ter po kapljicah dodala dietil klorofosfat **7a** pod Ar atmosfero. Reakcijsko zmes sem mešala nadaljnjih 15 min do 20 ur pri sobni temperaturi. Potek reakcije sem ustavila z dodatkom vode (2 ml) in ekstrahirala reakcijsko zmes z DCM (2 x 5 ml). Združene organske faze sem sušila z brezvodnim Na_2SO_4 in koncentrirala pod znižanim tlakom. V tako dobljeni surovi reakcijski zmesi sem pretvorbo v produkt **8** določevala s pomočjo ^{1}H NMR spektroskopije.

Dietil benzil fosfat (8) [140]



$C_{11}H_{17}O_4P$, M_r = 244,09

Priprava: Raztopini benzilnega alkohola **5a** (108 mg, 1 mmol), DIPEA (264 µl, 1,5 mmol) in DMAP (12 mg, 0,1 mmol) v 5 ml DCM sem med mešanjem po kapljicah dodala dietil klorofosfat **7a** (192 µl, 1.3 mmol) pod Ar atmosfero. Reakcijsko zmes sem nato mešala pri sobni temperaturi dodatni 2 uri. Potek reakcije sem ustavila z dodatkom vode (5 ml) in ekstrahirala reakcijsko zmes z DCM (3 x 10 ml). Združene organske faze sem sušila z brezvodnim Na_2SO_4 in koncentrirala pod znižanim tlakom.
Čiščenje: Kolonska kromatografija na silikagelu, mobilna faza: DCM-MeOH, 97:3.
Izkoristek: 195 mg (80 %); rumeno olje.
Rf = 0,20 (DCM-MeOH, 97:3.).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 1,30 (td, J = 1,0 Hz, J = 7,1 Hz, 6 H), 4,02–4,15 (m, 4 H), 5,07 (d, J = 8,1 Hz, 2 H), 7,30–7,42 (m, 5 H).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 16,13 (d, J = 6,8 Hz), 63,88 (d, J = 5,9 Hz), 69,10 (d, J = 5,5 Hz), 127,91, 128,51, 128,60, 136,10 (d, J = 6,9 Hz).

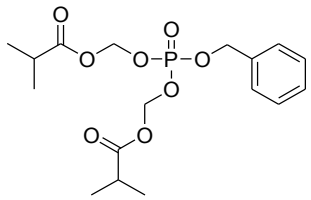
^{31}P NMR (120 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = -0,46 (s).

HR-MS ($M+H^+$) izračunano za $C_{11}H_{18}O_4P$: 245,0943; izmerjeno: 245,0946.

4.1.3.5 Eksperimentalni podatki za fosforiliranje alkoholov z bis(*i*-BOM) klorofosfatom 4b

Tipičen eksperimentalni postopek za fosforiliranje alkoholov (Eksperimentalni postopek A): Raztopini alkohola **5a**, **5b** ali **5c** (1 mmol), DIPEA (264 µL, 1,5 mmol) in DMAP (12 mg, 0,1 mmol) v DCM (10 ml) pri 0 °C sem med mešanjem po kapljicah dodala raztopino bis(*i*-BOM) klorofosfata **4b** (474 mg, 1,5 mmol) v DCM (5 ml) Ar atmosfero. Reakcijsko zmes sem pustila počasi ogreti se na sobno temperaturo in mešala dodatnih 12 ur. Potek reakcije sem ustavila z dodatkom vode (10 ml) in ekstrahirala reakcijsko zmes z DCM (2 x 20 ml). Združene organske faze sem sprala z nasičeno raztopino NH_4Cl (10 mL), sušila z brezvodnim Na_2SO_4 in koncentrirala pod znižanim tlakom. Produkte **6a**, **6b** in **6c** sem čistila s kolonsko kromatografijo na silikagelu.

Bis(izobutiriloksimetil) benzil fosfat (6a) [102]



$C_{17}H_{25}O_8P$, M_r = 388,13

Priprava: 6a je bil pripravljen po **Eksperimentalnem postopku A** iz benzilnega alkohola **5a** (108 mg, 1 mmol).
Čiščenje: Kolonska kromatografija na silikagelu, mobilna faza: DCM-MeOH, 97:3.
Izkoristek: 278 mg (72 %); belo olje.
Rf = 0,26 (DCM-MeOH, 97:3.).

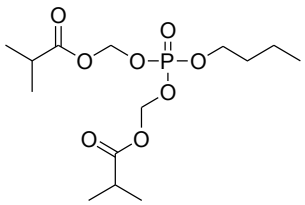
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 1,16 (d, J = 7,0 Hz, 6 H), 1,17 (d, J = 7,0 Hz, 6 H), 2,57 (hept, J = 7,0 Hz, 2 H), 5,12 (d, J = 7,7 Hz, 2 H), 5,60–5,68 (m, 4 H), 7,35 (m, 5 H).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 18,64, 33,83, 69,99 (d, J = 5,6 Hz), 82,69 (d, J = 5,2 Hz), 128,08, 128,72, 128,85, 135,23 (d, J = 7,4), 175,31.

^{31}P NMR (120 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = -3,60 (s).

HR-MS ($M+H^+$) izračunano za $C_{17}H_{26}O_8P$: 389,1365; izmerjeno: 389,1363.

Bis(izobutiriloksimetil) butil fosfat (6b)



$C_{14}H_{27}O_8P$, M_r = 354,14

Priprava: 6b je bil pripravljen po **Eksperimentalnem postopku A** iz butan-1-ola **5b** (74 mg, 1 mmol).
Čiščenje: Kolonska kromatografija na silikagelu, mobilna faza: EtOAc-heptan, 2:8.
Izkoristek: 271 mg (77 %); belo olje.
Rf = 0,26 (EtOAc-heptan, 2:8.).

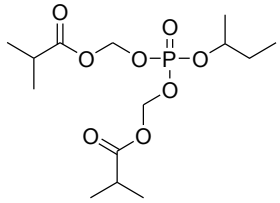
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 0,93 (t, J = 7,4 Hz, 3 H), 1,21 (d, J = 7,0 Hz, 12 H), 1,42 (m, 2 H), 1,67 (m, 2 H,), 2,62 (hept, J = 7,0 Hz, 2 H), 4,10 (app q, J = 6,7 Hz, 2 H), 5,65 (d, J = 13,4 Hz, 4 H).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 13,58, 18,63, 18,66, 32,14 (d, J = 7,1 Hz), 33,86, 68,57 (d, J = 6,2 Hz), 82,65 (d, J = 5,1 Hz), 175,32.

^{31}P NMR (120 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = -3,52 (s).

HR-MS ($M+H^+$) izračunano za $C_{14}H_{28}O_8P$: 355,1522; izmerjeno: 355,1526.

Bis(izobutiriloksimetil) 2-metilpropil fosfat (6c)



$C_{14}H_{27}O_8P$, M_r = 354,14

Priprava: 6c je bil pripravljen po **Eksperimentalnem postopku A** iz butan-2-ola **5c** (74 mg, 1 mmol).
Čiščenje: Kolonska kromatografija na silikagelu, mobilna faza: EtOAc-heptan, 2:8.
Izkoristek: 138 mg (39 %); belo olje.
Rf = 0,29 (EtOAc-heptan, 2:8.).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 0,95 (t, J = 7,5 Hz, 3 H), 1,21 (d, J = 7,0 Hz, 12 H), 1,34 (d, J = 6,3 Hz, 3 H,), 1,66 (m, 2 H), 2,62 (hept, J = 7,0 Hz, 2 H), 4,51 (m, 1 H), 5,65 (m, 4 H).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 9,35, 18,63, 20,88 (d, J = 3,5 Hz), 30,21 (d, J = 6,2 Hz), 33,82, 78,99 (d, J = 6,4 Hz), 82,62 (app d, J =1,2 Hz, J = 5,1 Hz), 175,29.

^{31}P NMR (120 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = -4,40 (s).

HR-MS ($M+H^+$) izračunano za $C_{14}H_{28}O_8P$: 355,1522; izmerjeno: 355,1530.

4.1.3.6 Eksperimentalni podatki za fosforiliranje benzil alkohola v manj strupenih topilih

Tipičen eksperimentalni postopek za fosforiliranje benzil alkohola 5a z dietil klorofosfatom 7a v različnih topilih: Raztopini benzilnega alkohola **5a** (54 mg, 0,5 mmol), DIPEA (132 µl, 0,75mmol) in DMAP (6 mg, 0.5 mmol) v 2,5 ml topila sem med mešanjem po kapljicah dodala dietil klorofosfat **7a** (96 µl, 0,65 mmol) pod Ar atmosfero. Reakcijsko zmes sem nato mešala pri sobni temperaturi dodatni 2 uri. Potek reakcije sem ustavila z dodatkom vode (2 ml) in ekstrahirala reakcijsko zmes z DCM (2 x 5 mL). Združene organske faze sem sušila z brezvodnim Na_2SO_4 in koncentrirala pod znižanim tlakom. V tako dobljeni surovi reakcijski zmesi sem pretvorbo v produkt **8** določevala s pomočjo ^{1}H NMR spektroskopije.

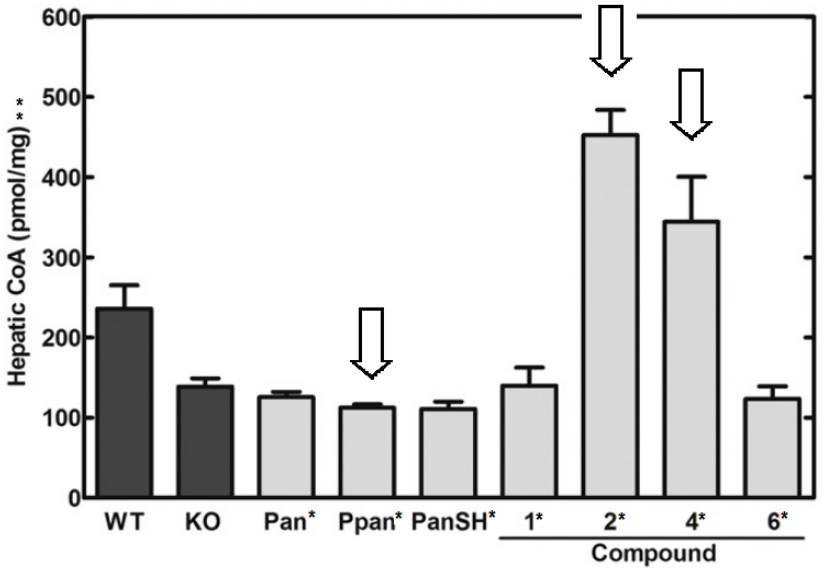
Tipičen eksperimentalni postopek za fosforiliranje benzil alkohola 5a z bis(i-BOM) klorofosfatom 4b v različnih topilih: Raztopini benzi alkohola **5a** (108 mg, 1 mmol), DIPEA (264 µL, 1,5 mmol) in DMAP (12 mg, 0,1 mmol) v topilu (6 ml) sem med mešanjem po kapljicah dodala raztopino bis(*i*-BOM) klorofosfata **4b** (474 mg, 1,5 mmol) v topilu (6 ml) pri 0 °C pod Ar atmosfero. Reakcijsko zmes sem pustila počasi ogreti se na sobno temperaturo in mešala dodatnih 12 ur. Potek reakcije sem ustavila z dodatkom vode (10 ml) in ekstrahirala reakcijsko zmes z DCM (2 x 20 ml). Združene organske faze sem sprala z nasičeno raztopino NH_4Cl (10 ml), sušila z brezvodnim Na_2SO_4 in koncentrirala pod znižanim tlakom. Produkte **6a** sem čistila s kolonsko kromatografijo na silikagelu (mobilna faza: DCM-MeOH, 97:3) ter izračunala izkoristek iz dobljene mase čistega produkta.

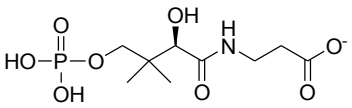
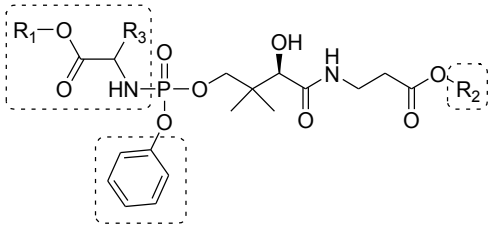
4.2 Sinteza fosforiliranih derivatov pantotenske kisline

V sledečem poglavju sem se osredotočila na pripravo različnih fosforiliranih derivatov pantotenske kisline s potencialno biološko aktivnostjo. Pred kratkim objavljene raziskave so pokazale, da imata tako fosfopantetein kot maskirani derivati fosfopantotenata zmožnost obnovitve znotrajceličnih količin CoA v celicah z okvarjeno biosintezo CoA [16,17]. Fosforilirani derivati pantotenske kisline imajo zato velik potencial za zdravljenje bolezni, povezanih z napakami v biosintezi CoA, kot je PKAN. Ker testiranja biološke aktivnosti ter potencialno uporabo fosforiliranih derivatov pantotenske kisline v medicini še vedno omejuje pomanjkanje učinkovitih metod za pripravo teh spojin, sem želela pripraviti več spojin, primernih za testiranja njihove zmožnosti dvigovanja ravni CoA ali druge biološke aktivnosti.

Ker je večino biološko aktivnih spojin, katerih strukturni element je tudi fosfatna skupina, potrebno pripraviti v obliki predzdravila, da lahko dosežemo želeno učinkovanje, sem se osredotočila na pripravo različnih maskiranih derivatov fosfopantotenata in fosfopanteteina. Poleg tega je bila nujnost maskiranja fosfatne skupine na fosforiliranem derivatu pantotenske kisline, zmožnem dvigovanja znotrajceličnih ravni CoA, pred kratkim že eksperimentalno dokazana *in vivo* [17]. V objavljeni študiji so raziskovalci testirali možnost uporabe več aril fosforoamidatnih derivatov fosfopantotenata za izognitev genetski pomanjkljivosti na ustreznem mišjem modelu (*Pank1−/−* mišji model [141]). Pokazali so, da posamezni predzdravilni derivati, ki so jih testirali, lahko dvignejo raven jetrnega CoA na *Pank1−/−* mišjem modelu ter da so bolj učinkoviti od nemodificiranega fosfopantotenata (Slika 4.2) [17].

Rezultati te študije so me še dodatno spodbudili k sintezi različnih maskiranih derivatov, ki bi potencialno lahko odigrali vlogo predzdravil fosfopantotenata in tako dosegli boljše delovanje od že dokazanega biološkega delovanja fosfopantotenata [17] in fosfopanteteina [16].



WT	*Pank1 +/+* miši (zdrave)
KO	*Pank1 -/-* miši
***Pank1 -/-* miši, tretirane s spojinami*:**	
Pan*	Pantotenska kislina
Ppan*	 Fosfopantotenat
PanSH*	Pantetetin
1* - 6*	 Aril fosforoamidatna predzdravila fosfopantotenata

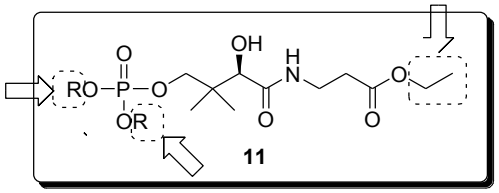
	R_1	R_2	R_3
1*	Et	Et	Me
2*	Me	Me	Me
4*	Ph	Et	Me
6*	Ph	Ph	Me

****Izmerjena količina jetrnega CoA**

Slika 4.2: Vpliv 4 različnih aril fosfororamidatnih predzdravil fosfopantotenata **1***, **2***, **4*** in **6*** v primerjavi s fosfopantotenatom za višanje jetrnega CoA na *Pank1 -/-* mišjem modelu. Graf prikazuje del rezultatov, objavljenih v članku "*Correction of a genetic deficiency in pantothenate kinase 1 using phosphopantothenate replacement therapy*", raziskovalca Zano s sodelavci, kjer je naveden tudi podroben opis eksperimentov [17].

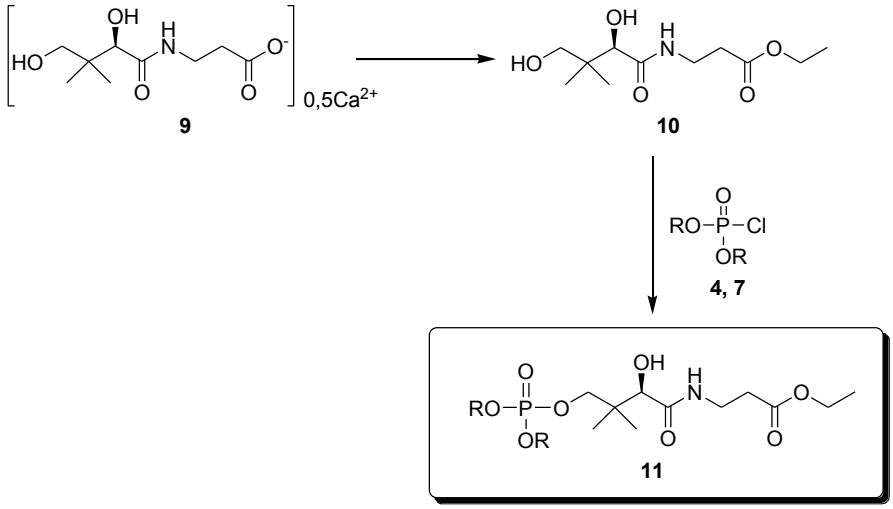
4.2.1 Sinteza maskiranih derivatov fosfopantotenata

Najprej sem se osredotočila na pripravo novih maskiranih derivatov fosfopantotenata. Spojine s splošno formulo **11** so maskirani derivati fosfopantotenata s tremi predzdravilnimi funkcionalnimi skupinami: etilnim estrom, ki maskira karboksilno skupino, ter dvema skupinama, ki maskirata naboj na fosfatu (Shema 4.7). Za maskiranje karboksilne skupine sem izbrala etilno skupino, saj se tovrsten predzdravilni pristop uspešno uporablja za izboljšanje lipofilnosti različnih učinkovin [25,74]. Za maskiranje fosfatne skupine sem si izbrala dve identični skupini, saj sem se želela izogniti sintezi asimetrično modificirane fosfatne skupine, ki je rezultat priprave mešanih predzdravil fosfatov, kot so aril fosforoamidatna predzdravila in aril SATE estri.



Shema 4.7: Struktura maskiranih derivatov fosfopantotenata.

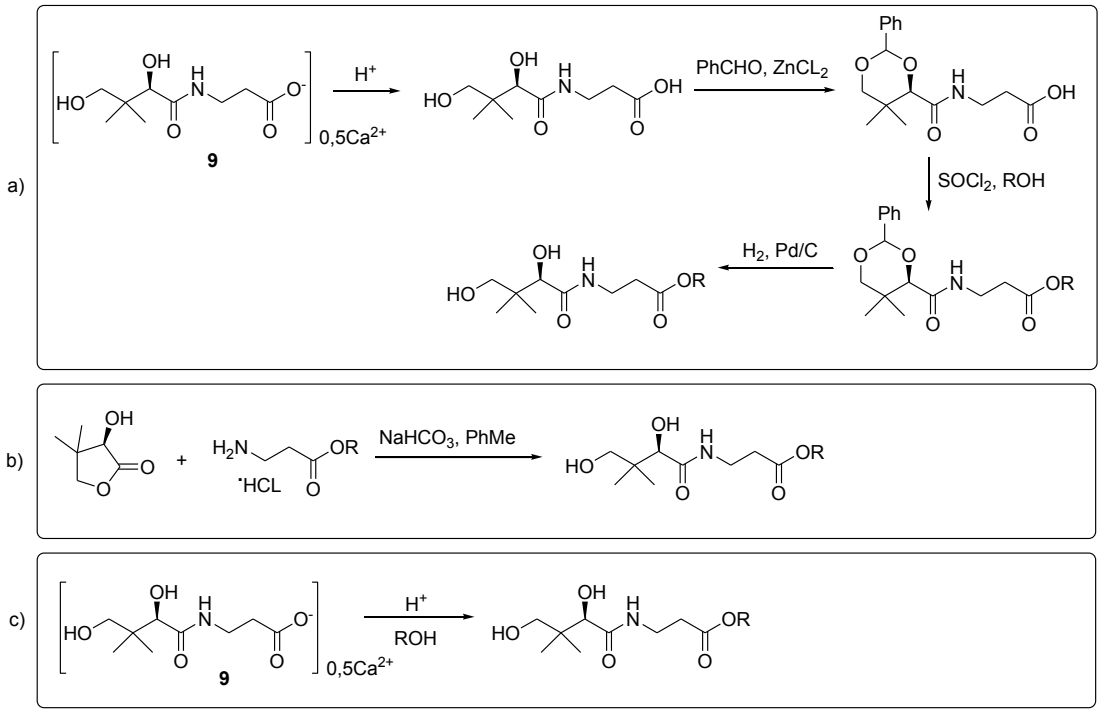
Sintezo derivatov **11** sem načrtovala glede na komercialno dostopnost spojin, zato sem za izhodno spojino izbrala kalcijev D-pantotenat **9**. Tega sem želela v enem koraku pretvoriti v intermediat etil D-pantotenat **10**, iz katerega bi lahko v naslednji stopnji s fosforiliranjem z različnimi klorofosfatnimi reagenti dobila vrsto derivatov fosfopantotenata z različno maskirano fosfatno skupino **11**. Predlagano sintezo prikazuje Shema 4.8.



Shema 4.8: Načrt sinteze novih maskiranih derivatov fosfopantotenata **11**.

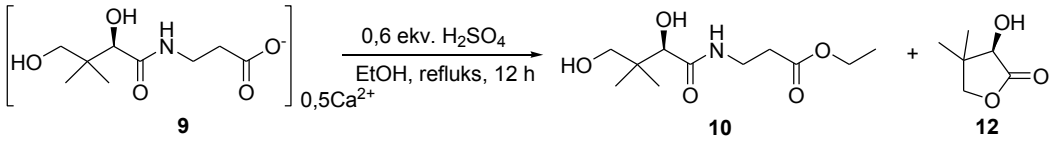
4.2.1.1 Sinteza etil D-pantotenata 10

Prvi korak v sintezi derivatov **11** je bila torej sinteza skupnega intermediata **10**, ki bi ga lahko fosforilirala v naslednjem koraku. V literaturi sem našla tri prevladujoče metode za pripravo estrov pantotenske kisline (Shema 4.9). Pri prvi sintezi a) gre za večstopenjski postopek, ki vključuje zaščito hidroksilnih skupin, sintezo estra ter odščito zaščitne skupine [100,142]. Drugi postopek b) temelji na reakciji D-pantolaktona z ustreznim β-alaninom [143-146]. Tretji postopek c) pa je Fischerjeva esterifikacija, ki poteka v prisotnosti kisline in v presežni količini ustreznega alkohola [61,147,148].



Shema 4.9: Tri različne metode priprave estrov pantotenske kisline.

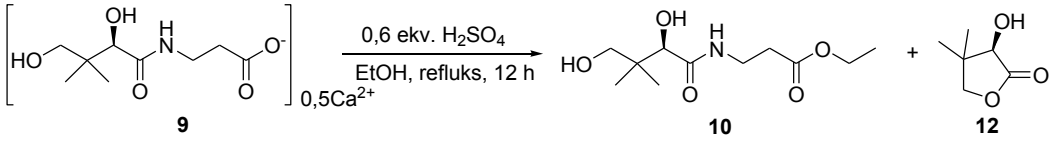
Ker sem želela etil D-pantotenat pripraviti na najenostavnejši in najcenejši način, sem izbrala sintezni postopek c), saj gre v tem primeru za razliko od postopka a) za enostopenjsko reakcijo, izhodne spojine pa so cenejše od tistih, uporabljenih v postopku b) (Shema 4.9). Zato sem poskusila ponoviti postopek za estrenje kalcijeve soli pantotenske kisline **9** v etanolu v prisotnosti katalitskih količin H_2SO_4, ki sem ga našla v literaturi [147], kljub temu, da je bil postopek nekoliko pomanjkljivo opisan. Že pri prvi ponovitvi sem ugotovila, da reakcija poteka slabše od poročanih visokih izkoristkov (69 %) ter da je v reakcijski zmesi prevladujoče nastajal produkt, ki ni želeni ester **10**, o čemer v opisanem postopku niso poročali. Neželen produkt sem uspela ločiti od etil D-pantotenata **10** in ga tudi identificirati. Izkazalo se je, da gre za D-pantolakton **12**, torej je med reakcijo prišlo do delnega razpada substrata **9** (Shema 4.10).



Shema 4.10: Sinteza etil D-pantotenata **10**.

Ker je bilo razmerje med produktoma pomaknjeno v prid D-pantolaktona **12** (Tabela 4.15, vnos 1), sem upala, da bom lahko s pomočjo optimizacije izboljšala izkoristek želenega estra **10**. Ker je Fischerjeva esterifikacija ravnotežna reakcija, sem poskusila ravnotežje premakniti v prid nastanka estra z dodatkom molekulskih sit (3 Å) v reakcijsko zmes, ki bi absorbirala nastalo vodo iz reakcijske zmesi. Vendar je pod takimi reakcijskimi pogoji reakcija potekla še slabše, saj je v reakcijski zmesi po reakciji prevladoval produkt **12** (Tabela 4.15, vnos 2).

Tabela 4.15: Vpliv dodatka molekulskih sit na potek estrenja kalcijeve soli pantotenske kisline **9**.[a]



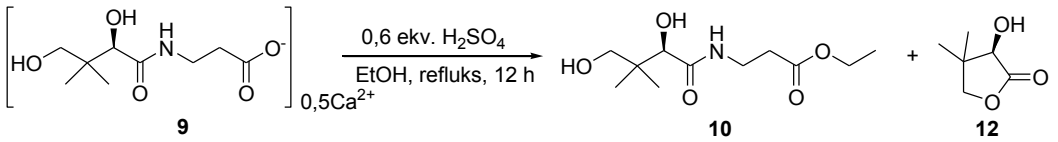
Vnos	Dodatek molekulskih sit	Porazdelitev med produktoma **10** in **12** [%][b]	
		10	**12**
1	ne	32	68
2	da	~2	~98

[a]Reagenti in reakcijski pogoji: suspenziji kalcijevega D-pantotenata **9** (0,5 mmol) v etanolu (4 ml) sem med mešanjem dodala H_2SO_4 (0,6 ekv.). V eksperimentu, ki ga prikazuje vos 2, sem v reakcijsko zmes dodala še 20 mg zdrobljenih aktiviranih molekulskih sit (3 Å). Reakcijsko zmes sem segrela na temperaturo refluksa (90 °C) in pustila mešati 16 ur. Reakcijsko zmes sem nato prenesla na kolono s silikagelom, sprala z etil acetatom in skoncentrirala pod znižanim tlakom. [b]Porazdelitev med produktoma **10** in **12** sem določila iz ^{1}H NMR spektra surove reakcijske zmesi.

Uporabo molekulskih sit sem zato opustila in v nadaljevanju optimizacije poskusila poiskati najoptimalnejši ekvivalent kisline (Tabela 4.16). Ugotovila sem, da najvišji delež estra **10** nastane pri uporabi 1 ekvivalenta H_2SO_4 (Tabela 4.16, vnos 4). Razmerje v prid laktona **12** pa je bilo še toliko večje tako pri uporabi podstehiometričnih količin kisline kot pri uporabi prebitka kisline (Tabela 4.16, vnos 1–3 in 5–7). Vse nadaljnje reakcije sem zato izvedla z uporabo 1 ekvivalenta H_2SO_4.

V zadnji stopnji optimizacije sem spremljala vpliv reakcijskega časa na potek estrenja (Tabela 4.17). Največji delež produkta 10 je bil v reakcijski zmesi prisoten po 16 h (Tabela 4.17, vnos 3).

Tabela 4.16: Vpliv količine žveplove (V) kisline na potek estrenja kalcijeve soli pantotenske kisline **9**.[a]

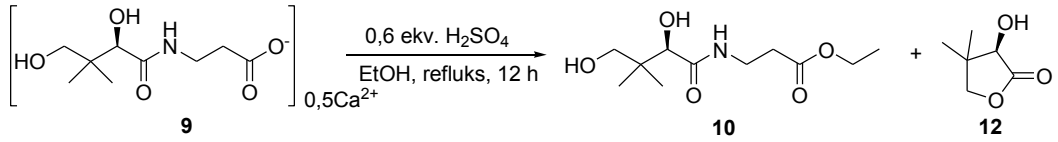


9 **10** **12**

Vnos	Ekv. H_2SO_4	Porazdelitev med produktoma **10** in **12** [%][b]	
		10	**12**
1	0,1	~3	~97
2	0,4	21	79
3	0,6	31	68
4	1	40	60
5	1,2	30	70
6	1,5	15	85
7	2	-	100

[a]Reagenti in reakcijski pogoji: suspenziji kalcijevega D-pantotenata **9** (0,5 mmol) v etanolu (4 ml) sem med mešanjem dodala H_2SO_4 (0,1–2 ekv.). Reakcijsko zmes sem segrela na temperaturo refluksa (90 °C) in pustila mešati 16 ur. Reakcijsko zmes sem nato prenesla na kolono s silikagelom, sprala z etil acetatom in skoncentrirala pod znižanim tlakom; [b]Porazdelitev med produktoma **10** in **12** sem določila iz ^{1}H NMR spektra surove reakcijske zmesi.

Tabela 4.17: Vpliv reakcijskega časa na potek estrenja kalcijeve soli pantotenske kisline **9**.[a]



9 **10** **12**

Vnos	Reakcijski čas [h]	Porazdelitev med produktoma **10** in **12** [%][b]	
		10	**12**
1	2	19	81
2	5	36	64
3	16	40 (35 %)[c]	60
4	72	23	77

[a]Reagenti in reakcijski pogoji: suspenziji kalcijevega D-pantotenata **9** (0,5 mmol) v etanolu (4 ml) sem med mešanjem dodala H_2SO_4 (1 ekv.). Reakcijsko zmes sem segrela na temperaturo refluksa (90 °C) in pustila mešati od 2 do 72 ur. Reakcijsko zmes sem nato prenesla na kolono s silikagelom, sprala z etil acetatom in skoncentrirala pod znižanim tlakom; [b]Porazdelitev med produktoma **10** in **12** sem določila iz ^{1}H NMR spektra surove reakcijske zmesi; [c]Eksperiment z 20 mmol kalcijevega D-pantotenata **9**, izkoristek izoliranega in čiščenega produkta **10**.

Kljub temu, da je bila pretvorba v produkt **10**, ki sem jo dosegla pod najoptimalnejšimi pogoji (40 %), relativno nizka, sem se zaradi enostavnosti odločila obdržati izbrani reakcijski sistem in ga uporabiti za pripravo svoje izhodne spojine. Optimizirane reakcijske pogoje sem zato prenesla na večjo skalo (20 mmol) in tudi v tem primeru dosegla enako pretvorbo ter čisti etil D-pantotenat **10** izolirala s 35 % izkoristkom (Tabela 4.17, vnos 3).

4.2.1.2 Priprava novih derivatov fosfopantotenata s komercialno dostopnimi klorofosfatnimi reagenti

V nadaljevanju študije sem želela pripravljeni etil D-pantotenat **10** selektivno fosforilirati z različnimi klorofosfatnimi reagenti in tako pripraviti več novih derivatov fosfopantotenata z maskirano fosfatno skupino in zaestreno karboksilno funkcionalno skupino **11** (Shema 4.8). Najprej sem za fosforiliranje uporabila komercialno dostopne klorofosfatne reagente **7**. Kot prvega sem uporabila dietil klorofosfat **7a** in za fosforiliranje uporabila reakcijske pogoje, ki sem jih poiskala na modelnem sistemu v poglavju Optimizacija reakcijskih pogojev za fosforiliranje.

Pri prenosu reakcijskih pogojev na etil D-pantotenat sprva nisem bila popolnoma uspešna, saj reakcija ni potekla selektivno. Pri izvedbi eksperimenta pod enakimi pogoji, kot sem jih uporabila za fosforiliranje benzilnega alkohola **5a**, sem v reakcijski zmesi poleg želenega monofosfatnega produkta **11a** s fosforilirano primarno hidroksilno skupino opazila tudi nastanek difosforiliranega estra pantotenske kisline **11a'**.

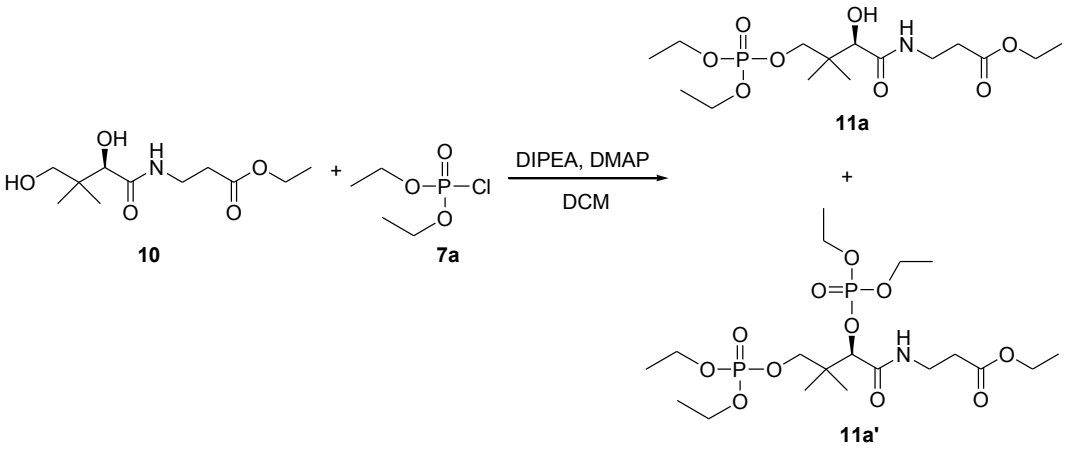
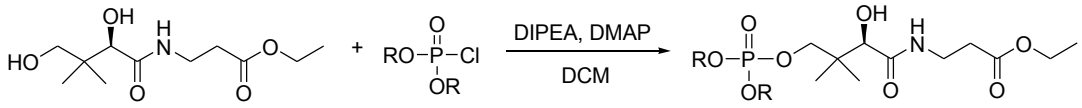
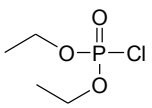
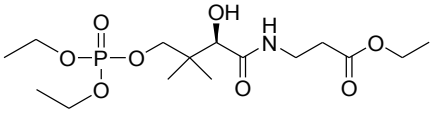
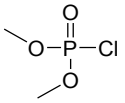
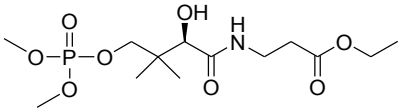
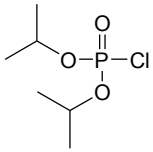
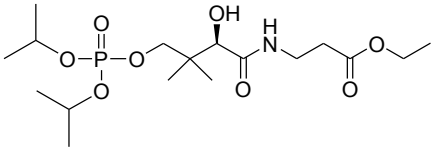
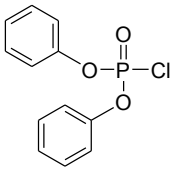
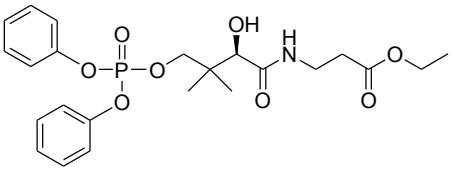
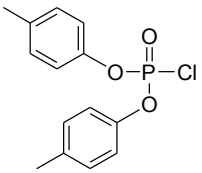
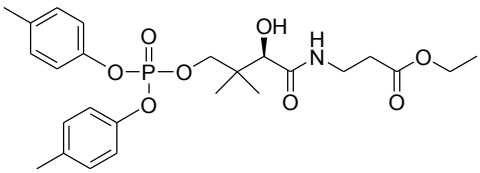
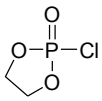
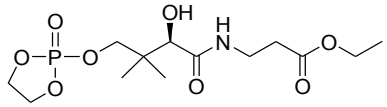
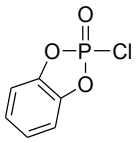
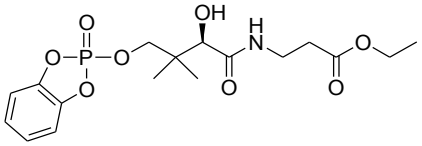

OH
H
N
O
HO
O
O
O
O
O
O
O
O
P
Cl
O
O
O
O
O
O
O
O

Tabela 4.18: Fosforiliranje etil D-pantotenata **10** z različnimi komercialno dostopnimi klorofosfatnimi reagenti.[a]



10 **7** **11**

Vnos	Reagent **7**	Produkt **11**, reakcijski čas, izkoristek
1	 **7a**	 **11a**, 2 h, 74 %
2	 **7b**	 **11b**, 2 h, 80 %
3	 **7c**	 **11c**, 2 h, 64 %
4	 **7d**	 **11d**, 12 h, 63 %
5	 **7e**	 **11e**, 12 h, 77 %
6	 **7f**	 **11f**, 2 h, sledovi[c]
7	 **7g**	 **11g**, 2 h, sledovi[c]

[a]Reagenti in reakcijski pogoji: Etil D-pantotenat **10** (1 mmol), DIPEA (1,5 mmol) in DMAP (0,1 mmol) sem raztopila v DCM (4 ml). Klorofosfatni reagent **7a** - **7g** (1,3 mmol) sem raztopila v DCM (2 ml) in ga pod Ar atmosfero po kapljicah dodala v reakcijsko zmes pri 0 °C. Reakcijsko zmes sem nato mešala še 2 ali 12 ur pri s. t. [b]Izkoristek izoliranih in čiščenih produktov. [c]Prisotnost produktov **11f** in **11g** sem opazila v sledovih v surovi reakcijski zmesi z LC-MS analizo in ju potrdila s HR-MS.

Sintetizirani derivati fosfopantotenata **11a** - **11e** so sicer zagotovo bolj lipofilni od nemaskiranega fosfopantotenata, kljub temu pa ne predstavljajo nujno njegovih predzdravil. Uspešnost predzdravilnega pristopa namreč ne temelji zgolj na izboljšanju fizikalno-kemijskih lastnosti, ampak je odvisna tudi od zmožnosti predzdravila za *in vivo* povrnitev v starševsko učinkovino, ki lahko doseže želen farmakološki učinek. Etilna skupina, izbrana za maskiranje karboksilne skupine pantotenata, je sodeč po primerih iz literature najverjetneje ustrezna izbira za pripravo predzdravila. Dokazano je namreč, da etilni ester karboksilnih kislin cepijo različne esteraze, prisotne v plazmi in tkivih, pri čemer se predzdravilo povrne v aktivno starševsko molekulo [89,149,150]. Uspešnost tega predzdravilnega pristopa dokazujejo tudi na tržišču prisotna zdravila, ki so po svoji strukturi etilni estri, predzdravila z maskiranimi karboksilnimi skupinami [151,152]. Preprosti alkilni estri fosfatov pa so za razliko od estrov karboksilnih kislin metabolno stabilni in zato večinoma neprimerni za uporabo kot predzdravila [79], zato je zmožnost derivatov, predstavljenih v tem poglavju, povrniti se v aktivno starševsko molekulo s prosto fosfatno skupino vprašljiva.

Glede na podatke o sorodnih predzdravilih v literaturi predpostavljam, da je najobetavnejši kandidat za potencialno predzdravilo derivat, maskiran s fenilnimi skupinami **7d** [79]. Zanimiv je tudi derivat **7e**, saj je v literaturi mogoče zaslediti maskiranje fosfatne in fosfonatne skupine tudi z različno substituiranimi arilnimi skupinami [153]. Možnost uporabe katerega od pripravljenih derivatov **7a** - **7e** kot predzdravilo fosfopantotenata bi bilo vsekakor potrebno preučiti in preveriti, če in pod kakšnimi pogoji so se te spojine zmožne hidrolizirati in povrniti v fosfopantotenat.

Kljub temu, da so derivati fosfopantotenata, katerih sintezo sem opisala v tem poglavju, najverjetneje preveč stabilni, da bi lahko odigrali vlogo predzdravil fosfopantotenata in zviševali znotrajcelične količine CoA, predstavljajo zanimivo zbirko novih spojin. Z njihovo pripravo sem doprinesla k dodatnemu znanju s področja fosforiliranja pantotenske kisline, optimizirala pogoje za selektivno fosforiliranje in razširila knjižnico znanih derivatov vitamina B5 z novimi spojinami in njihovimi spektroskopskimi podatki.

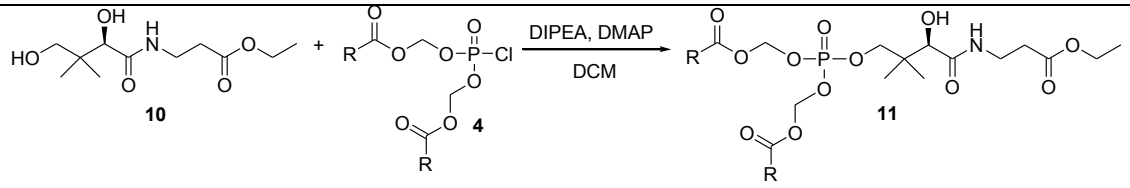
Poleg tega so spojine, ki lahko specifično inhibirajo biosintezo CoA, obetavni kandidati za zdravila z antibakterijskim in antimalarijskim učinkovanjem [2,154,155], zato bi bilo nemara smiselno raziskati tudi potencial fosforiliranih derivatov pantotenske kisline z ireverzibilno maskirano fosfatno skupino za tovrstno biološko delovanje. Nenazadnje so fosforilirani derivati pantotenske kisline in evaluacija njihove biološke aktivnosti šele nedavno ponovno obudili interes znanstvene stroke, zato verjamem, da so pred nami še številna nova odkritja, povezana z biološkim delovanjem tovrstnih spojin.

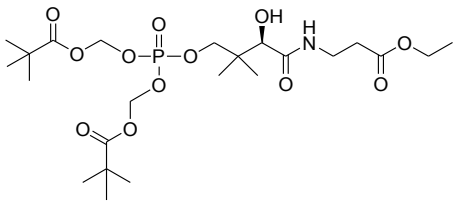
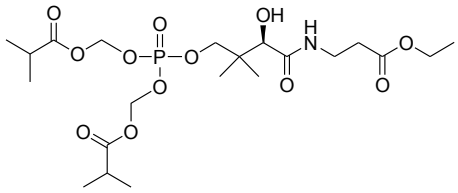
4.2.1.3 Priprava novega derivata fosfopantotenata, maskiranega s POM skupinami

V nadaljevanju raziskovanja možnosti priprave različnih novih derivatov fosfopantotenata s potencialno biološko aktivnostjo sem se osredotočila na pripravo derivatov, maskiranih z aciloksialkilnimi skupinami, saj je sinteza različnih aciloksialkilnih estrov najpogostejši način za pripravo predzdravil fosfatov in fosfonatov [79]. V nasprotju z metabolno stabilnimi preprostimi alkilnimi estri številne študije dokazujejo, da do hidrolize aciloksialkilnih fosfatnih estrov *in vivo* hitro pride s pomočjo encimov esteraz, prisotnih v najrazličnejših tkivih [78,79,86,89-91,94,97].

Med aciloksialkilnimi skupinami prevladuje uporaba POM skupin, zato sem želela najprej pripraviti derivat, maskiran s temi skupinami. V literaturi je mogoče zaslediti tri različne načine metode priprave POM predzdravil [91,98,99], ki sem jih povzela v poglavju Sinteza pivaloiloksimetilnih predzdravil fosfatov (Shema 1.22). Tako po mojih izkušnjah, pridobljenih pri pripravi POM predzdravil [101], kot po izkušnjah, ki jih v literaturi navajajo različni avtorji [71,96,99], je najobetavnejši način za sintezo POM predzdravila uporaba bis(POM) klorofosfatnega reagenta **4a** [99]. Poleg tega sem v prejšnjem poglavju ugotovila, da je uporaba klorofosfatnih reagentov zelo učinkovit način za pripravo različnih novih derivatov fosfopantotenata z maskirano fosfatno skupino. Zato sem se odločila, da bom tudi derivat, maskiran s POM skupinami, pripravila s pomočjo klorofosfatnega reagenta. Ustrezen bis(POM) klorofosfat **4a** sem pripravila po optimiziranem postopku, ki sta ga objavila raziskovalca Hwang in Cole [99], opisanem v poglavju Eksperimentalni podatki za sintezo bis(POM) klorofosfata **4a** (str. 47). Pripravljeni reagent **4a** sem direktno uporabila za fosforiliranje etil D-pantotenata **10**, in sicer pod eksperimentalnimi pogoji, ki sem jih poiskala in optimizirala tako na modelnem sistemu kot pri fosforiliranju etil D-pantotenata **10** s komercialno dostopnim reagentom **7a**. Na tak način sem uspešno pripravila nov derivat, maskiran s POM skupinami **11h** (Tabela 4.19, vnos 1), ki je nedvomno dober kandidat za potencialno predzdravilo fosfopantotenata.

Tabela 4.19: Sinteza derivatov fosfopantotenata, maskiranih z aciloksialkilnimi skupinami.[a]



Vnos	R	Reagent **4**	Produkt **11**, izkoristek[b]
1	tBu	Bis(POM) klorofosfat **4a** [99]	 **11h**, 35 %
2	iPr	Bis(*i*-BOM) klorofosfat **4b** (nov reagent)	 **11i**, 25 %

[a]Reagenti in reakcijski pogoji: Etil D-pantotenat **10** (1 mmol), DIPEA (1,5 mmol) in DMAP (0,1 mmol) sem raztopila v DCM. Klorofosfatni reagent **4a** ali **4b** (1,5 mmol) sem raztopila v DCM (2 ml) in ga pod Ar atmosfero po kapljicah dodala v reakcijsko zmes pri 0 °C. Reakcijsko zmes sem nato mešala še 2 uri pri s. t.
[b]Izkoristek izoliranih in čiščenih produktov.

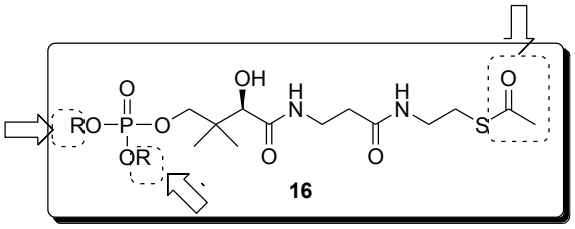
4.2.1.4 Priprava novega derivata fosfopantotenata, maskiranega z *i*-BOM skupinami, z uporabo novega reagenta bis(*i*-BOM) klorofosfata

V nadaljevanju študije pa sem želela uporabiti še na novo sintetizirani klorofosfatni reagent bis(*i*-BOM) klorofosfat **4b**, ki bi mi omogočil pripravo derivata, maskiranega z BOM skupinami. Pripravo reagenta sem opisala v poglavju Sinteza novega reagenta bis(*i-BOM*) klorofosfata **4b** (str. 33). Tudi **4b** sem direktno uporabila za fosforiliranje etil D-pantotenata pod enakimi pogoji, kot sem jih uporabila za fosforiliranje z bis(POM) klorofosfatom **4a** in bila uspešna pri pripravi še enega novega derivata fosfopantotenata, maskiranega z *i*-BOM skupinami **11i** (Tabela 4.19, vnos 2). Tudi za to spojino sklepam, da bi lahko bila uporabna kot predzdravilo, seveda pa bi bilo potrebno možnost takšne uporabe preveriti s študijo hidrolize uporabljenih maskirnih skupin ter preveriti zmožnost derivata **11i** za povečanje znotrajceličnih količin CoA na ustreznem modelu.

Kljub temu, da sta izkoristka sinteze spojin **11h** in **11i** relativno nizka (Tabela 4.19), sem bila s pripravo dveh novih zanimivih derivatov zadovoljna, saj je sinteza aciloksialkilnih predzdravil na splošno zapletena in na posameznih substratih nemalokrat poteka tudi z izkoristki, nižjimi od 10 % [71]. Za fosforiliranje sem uporabila ekonomične reakcijske pogoje in manjšo količino reagentov, kot so jih v literaturi navedli različni avtorji [96,99,109,114]. Poleg tega pa sem uspela tudi pokazati, da je možno novi reagent z aciloksialkilnimi skupinami **4b**, ki sem ga pripravila, uporabiti za fosforiliranje biološko aktivnih molekul in tako pripraviti potencialna predzdravila.

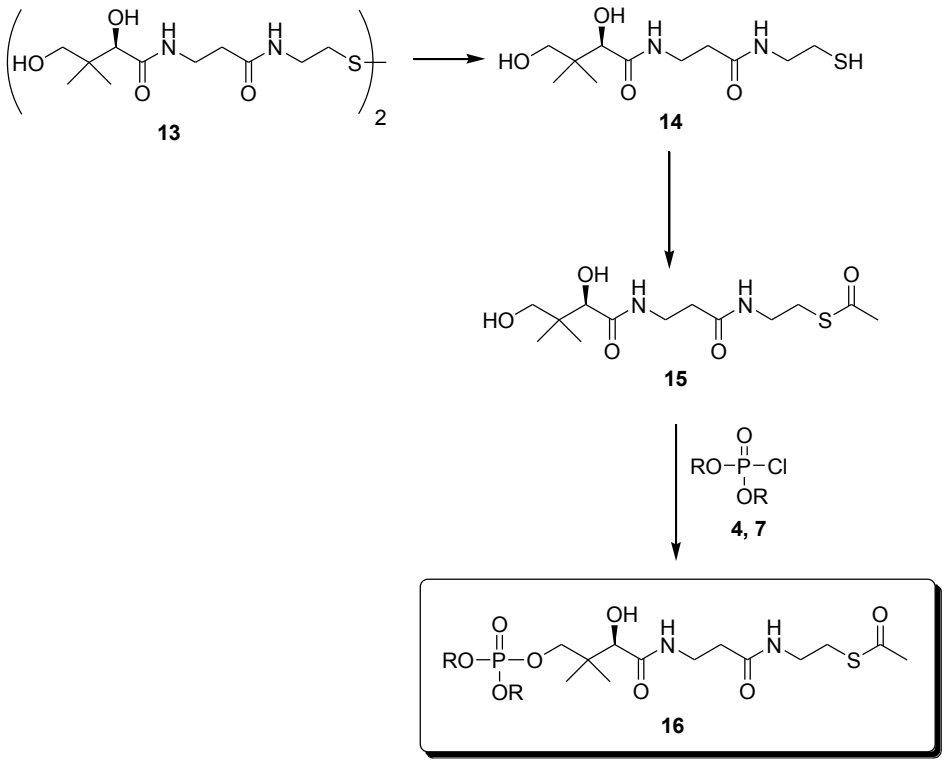
4.2.2 Sinteza maskiranih derivatov fosfopantoteina

Tekom raziskovanja priprave različnih fosforiliranih derivatov pantotenske kisline sem v sodelovanju z raziskovalci podjetja Acies Bio pripravljala tudi derivate fosfopanteteina z maskirano fosfatno skupino. Fosfopantetein je intermediat v biosintezi CoA (Shema 1.1) in je še bližje samemu CoA kot fosfopantotenat, zato bi ti derivati potencialno lahko bili še učinkovitejši pri obnavljanju znotrajcelične količine CoA, pri tem pa zaradi povečane lipofilnosti imeli večje biološko učinkovanje od dokazanega za fosfopantetein [16]. Derivate fosfopanteteina z maskirano fosfatno skupino in acetilirano tiolno skupino **16**, ki smo jih pripravljali, prikazuje Shema 4.12.



Shema 4.12: Struktura maskiranih derivatov fosfopanteteina.

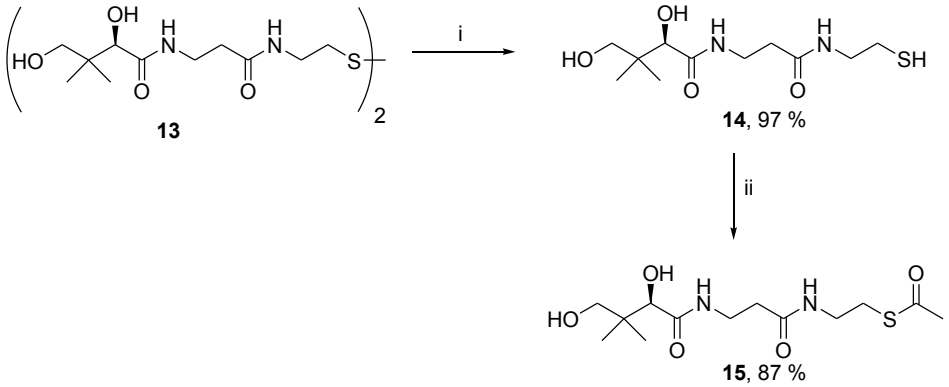
Tudi sintezo derivatov fosfopanteteina **16** smo tako tako kot sintezo derivatov fosfopantotenata **11** načrtovali glede na komercialno dostopnost spojin. Za izhodno spojino smo zato izbrali pantetin **13** in načrtovali sintezno pot do želenih derivatov **16** v 3 korakih, ki jih prikazuje Shema 4.13. Za ustrezen intermediat za fosforiliranje z različnimi klorofosfatnimi reagenti smo si v tem primeru izbrali S-acetilpantetein **15** in upali, da ga bomo lahko uspešno fosforilirali.



Shema 4.13: Načrt sinteze novih maskiranih derivatov fosfopanteteina **11.**

4.2.2.1 Sinteza S-acetilpanteteina 15

S-acetilpantetein **16** smo uspešno pripravili v dveh korakih s pomočjo že objavljenih sinteznih postopkov (Shema 4.14) [156,157]. V prvem koraku smo pri temperaturi 4 °C reducirali pantetin **13** z 1,4-ditiotreitolom (DTT) v mešanici topil vode in metanola [156]. Reagent DTT se pogosto uporablja za cepitev S-S vezi biološko aktivnih molekul, za uspešen potek reakcije pa je bilo tudi v našem primeru ključno, da smo topila pred reakcijo degazirali in z argonovo atmosfero preprečili dostop kisika v reakcijsko zmes. Dobljeni pantetein **14** smo uspešno izolirali in očistili z visokim izkoristkom (97 %) in ga uporabili v naslednji stopnji, reakciji s tioocetno kislino pri 40 °C v vodi, po znanem postopku [157]. Tudi S-acetilpantetein **15** smo uspešno izolirali in očistili s kolonsko kromatografijo z visokim izkoristkom (87 %).

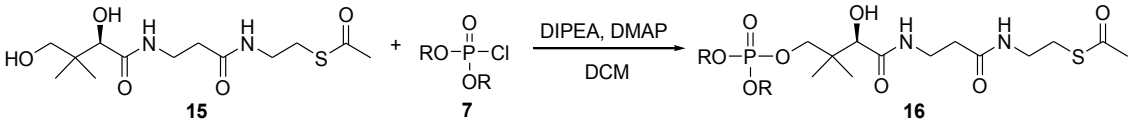


Shema 4.14: Sinteza S-acetilpanteteina **15**. Reagenti in reakcijski pogoji: (i) DTT, MeOH/H_2O, 4 °C, 48 h (97 %); (ii) CH_3COSH, H_2O, 40 °C, 24 h (87 %).

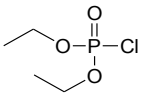
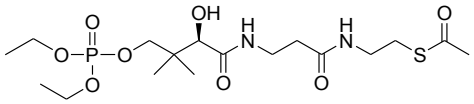
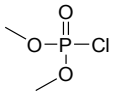
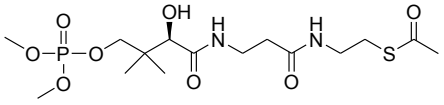
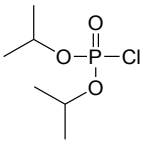
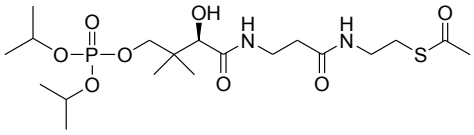
4.2.2.2 Priprava novih derivatov fosfopanteteina s komercialno dostopnimi klorofosfatnimi reagenti

V naslednjem koraku smo želeli uspešno pripravljeni S-acetilpantetein **15** selektivno fosforilirati z različnimi klorofosfatnimi reagenti. Začeli smo s komercialno dostopnimi klorofosfati **7** in tudi v tem primeru ugotovili, da je tako kot pri fosforiliranju etil D-pantotenata **10** za selektivnost reakcije ključno postopno dodajanje reagenta, raztopljenega v topilu pri 0 °C. Ugotovili smo tudi, da reakcija poteka bolj selektivno v diklorometanu, medtem ko pri uporabi acetonitrila opazimo večji delež neželenih difosforiliranih produktov v reakcijski zmesi. Substrat **15** smo uspešno fosforilirali s tremi klorofosfatnimi reagenti **7a** - **7c** in tako pripravili tri nove derivate fosfopanteteina z maskiranimi fosfatnimi skupinami **16a** - **16c** (Tabela 4.20).

Tabela 4.20: Fosforiliranje S-acetilpanteteina **15** z različnimi komercialno dostopnimi klorofosfatnimi reagenti.[a]



15 **7** **16**

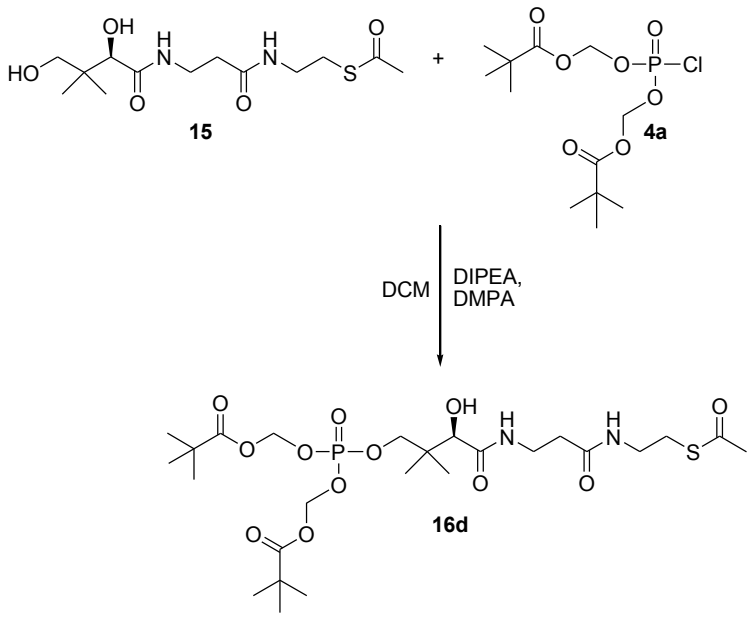
Vnos	Reagent **7**	Produkt **11**, izkoristek[b]
1	 **7a**	 **16a**, 74 %
2	 **7b**	 **16b**, 60 %
3	 **7c**	 **16c**, 48 %

[a]Reagenti in reakcijski pogoji: S-acetilpantetein **15** (1 mmol), DIPEA (1,5 mmol) in DMAP (0,1 mmol) sem raztopila v DCM (4 ml). Klorofosfatni reagent **7a** – **7c** (1,3 mmol) sem raztopila v DCM (4 ml) in ga pod Ar atmosfero po kapljicah dodala v reakcijsko zmes pri 0 °C. Reakcijsko zmes sem nato mešala še 2 uri pri s. t.
[b]Izkoristek izoliranih in čiščenih produktov.

Novi derivati **16a** - **16c** so tako kot analogni derivati fosfopantotenata **11a** - **11c** sicer bolj lipofilni od nemaskiranih spojin s prosto fosfatno skupino, vendar najverjetneje prestabilni, da bi lahko odigrali vlogo predzdravil fosfopanteteina. Kljub temu gre za zanimive nove spojine, z njihovo pripravo pa smo razširili znanje, potrebno za selektivno fosforiliranje S-acetilpanteteina **15** ter knjižnico obstoječih spojin dopolnili z novimi spojinami in njihovimi spektroskopskimi podatki.

4.2.2.3 Priprava novega derivata fosfopanteteina, maskiranega s POM skupinami

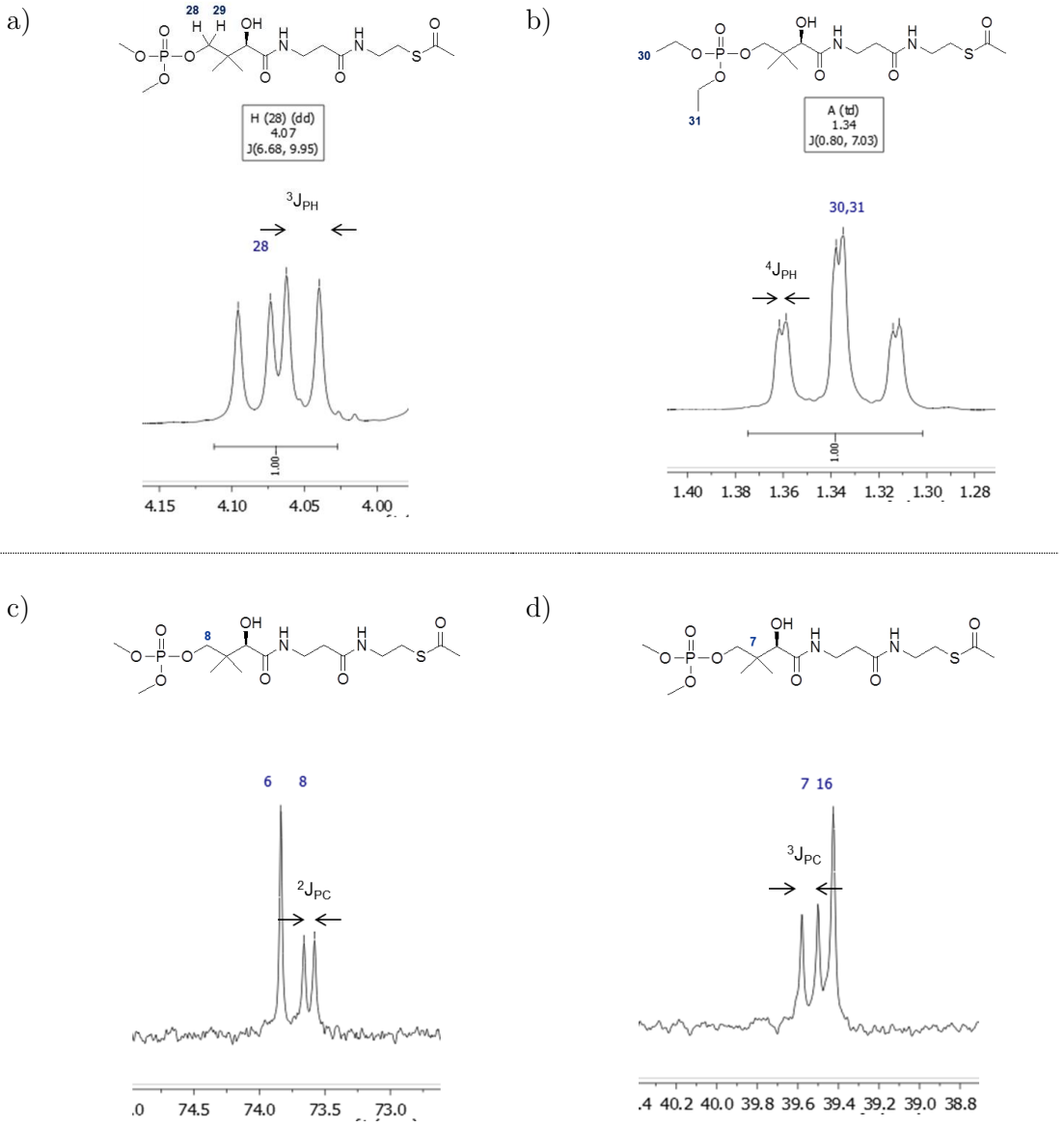
Na koncu raziskovanja možnosti priprave različnih derivatov fosfopanteteina z maskirano fosfatno skupino **16** smo želeli pripraviti tudi derivat, ki bi imel boljše lastnosti za potencialno predzdravilo. Zato smo se odločili za pripravo derivata, maskiranega s POM skupinami, saj se ta pristop uspešno uporablja za pripravo predzdravil fosfatov. Tudi v tem primeru smo želeni derivat **16d** pripravili s pomočjo bis(POM) klorofosfata **4a** [99]. Postopek priprave reagenta je opisan v poglavju Eksperimentalni podatki za sintezo bis(POM) klorofosfata **4a** (str. 47). Pripravljeni reagent **4a** smo direktno uporabili za fosforiliranje S-acetilpanteteina **15** (Shema 4.15). Z uporabo predhodno optimiziranih in zelo ekonomičnih reakcijskih pogojev smo uspešno pripravili nov derivat **16d**, ki je dober kandidat za potencialno predzdravilo fosfopanteteina.



Shema 4.15: Sinteza derivata fosfopanteteina, maskiranega s POM skupinami. Reagenti in reakcijski pogoji: S-acetilpantetein **15**, DIPEA (1,5 ekv.) in DMAP (0,1 ekv.), raztopljeni v DCM. Bis(POM) klorofosfat **4a** (1,5 ekv.), raztopljen v DCM in pod Ar atmosfero po kapljicah dodan v reakcijsko zmes pri 0 °C. Reakcijsko zmes smo mešali dodatnih 12 ur pri s. t., (44 %).

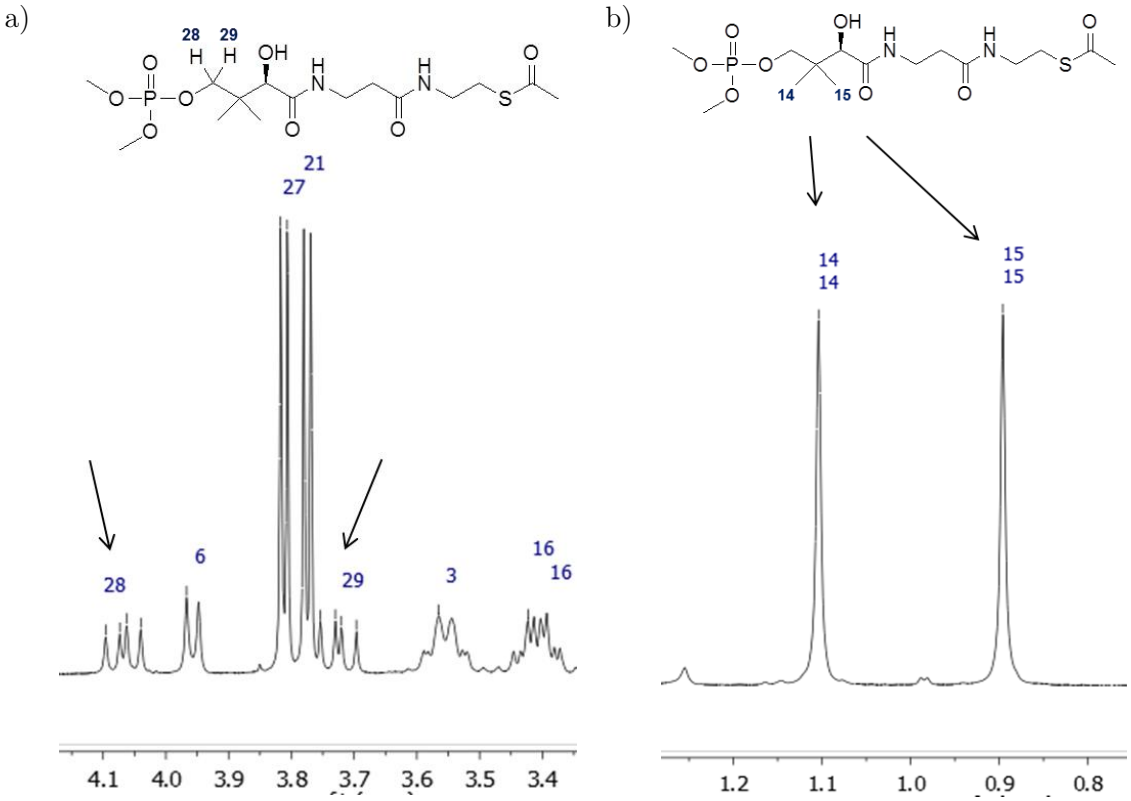
4.2.2.4 Karakterizacija derivatov fosfopanteteina s pomočjo sodobnih NMR pristopov

Pri identifikaciji in karakterizaciji sintetiziranih novih fosforiliranih derivatov pantotenske kisline **11a - 11i** ter **16a - 16c** sem se srečala z zelo zanimivimi ^{1}H in ^{13}C NMR spektri, saj v ^{1}H in ^{13}C NMR spektrih organofosforjevih spojin lahko opazimo sklapljanje s fosforjem ^{31}P. To doseže svoj vpliv tudi preko 3 do 4 vezi. V ^{1}H NMR spektrih sem zato opazila dodatne sklopitve v signalih posameznih jeder in lahko v posameznih primerih določila sklopitvene konstante $^{3}J_{PH}$ in $^{4}J_{PH}$, v ^{13}C NMR spektrih pa sklopitvene konstante $^{2}J_{PC}$ in $^{3}J_{PC}$ (Slika 4.3).



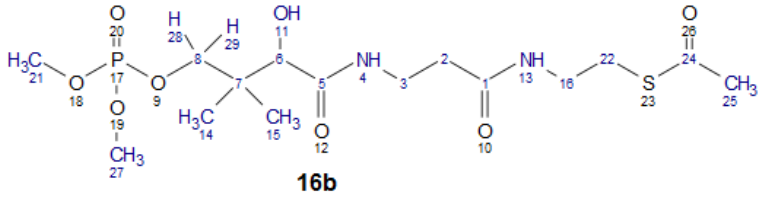
Slika 4.3: Izseki NMR spektrov, ki prikazujejo vpliv ^{31}P na sklopitve z drugimi jedri (^{1}H in ^{13}C): a) sklopitev in pripadajoča $^{3}J_{PH}$ v ^{1}H NMR spektru, b) sklopitev in pripadajoča $^{4}J_{PH}$ v ^{1}H NMR spektru, c) sklopitev in pripadajoča $^{2}J_{PC}$ v ^{13}C NMR spektru ter d) sklopitev in pripadajoča $^{3}J_{PC}$ v ^{13}C NMR spektru.

Poleg tega so bili NMR spektri kompleksni tudi zaradi kiralnega C* atoma (6), zaradi katerega sem v ^{1}H NMR spektrih spojin med drugim opazila dobro ločene signale za vodika H-28 in H-29 ter za vodike z metilnih skupin H-14 in H-15 (Slika 4.4). Vpliv različnega elektronskega okolja pa sem opazila tudi pri vodikovih in ogljikovih jedrih, ki so od kiralnega centra precej oddaljeni.



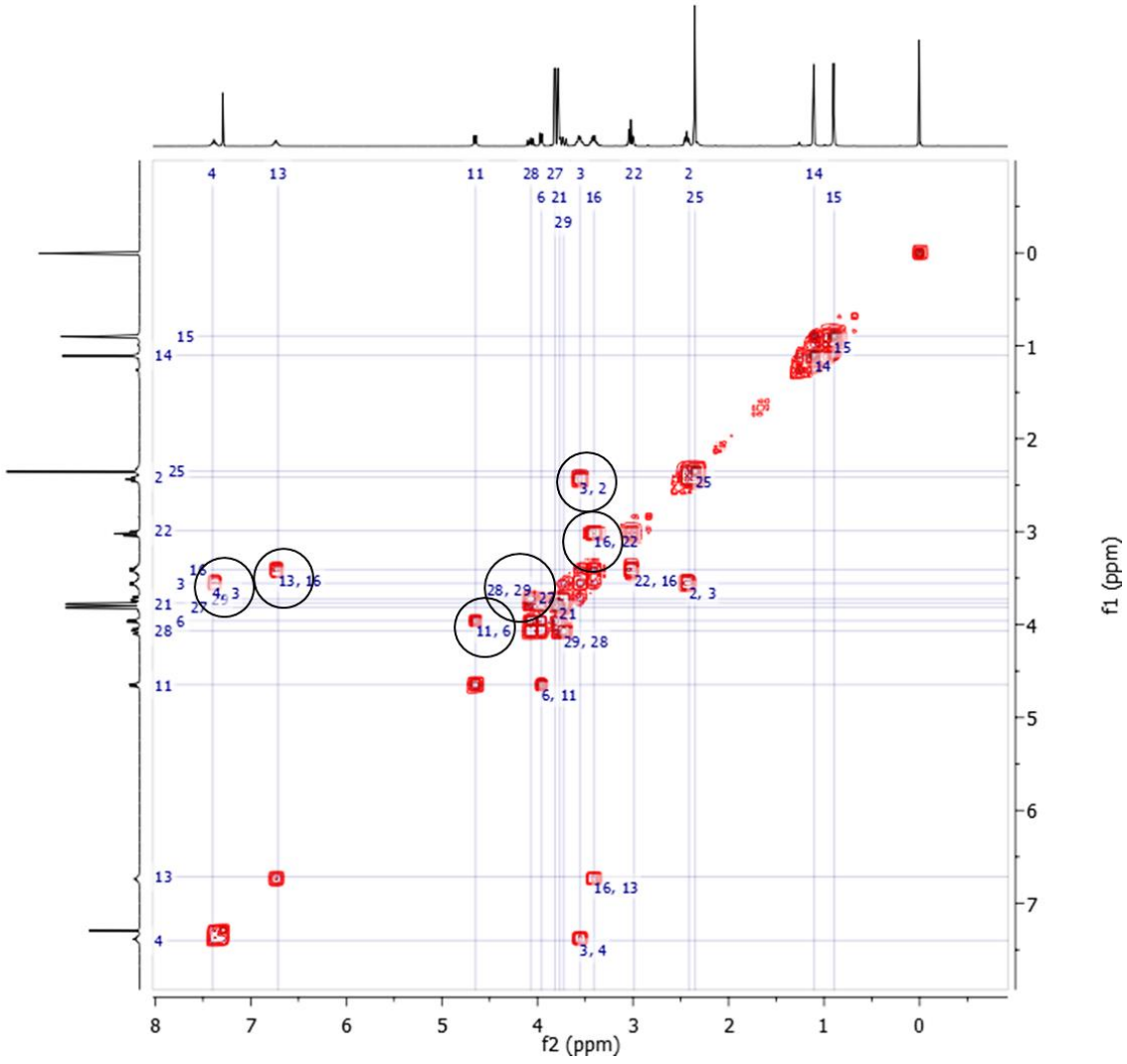
Slika 4.4: Ločitev signalov v ^{1}H NMR spektru kot posledica neekvivalentnosti jeder zaradi različnega okolja, v katerem se nahajajo: a) protona (28) in (29) imata signal pri različnih premikih in sta sklopljena med sabo, b) dva ločena signala za protone z metilnih skupin (14) in (15).

Zaradi zanimivosti NMR spektrov sem se odločila, da bom nekaj izbranih derivatov poskusila podrobneje okarakterizirati in asignirati posamezne signale v ^{1}H in ^{13}C NMR spektrih s pomočjo sodobnih NMR pristopov. V nadaljevanju bom predstavila rezultate, ki sem jih dobila pri spektroskopskem preučevanju derivata fosfopanteteina, maskiranega z metilnimi skupinami **16b** (Slika 4.5). Poleg ^{1}H, ^{13}C in ^{31}P NMR spektrov sem se zato poslužila tudi dvodimenzijskih tehnik in za to spojino posnela še COSY, HSQC in HMBC spektre.



Slika 4.5: Derivat fosfopanteteina, maskiran z metilnimi skupinami **16b**, z oštevilčenimi atomi.

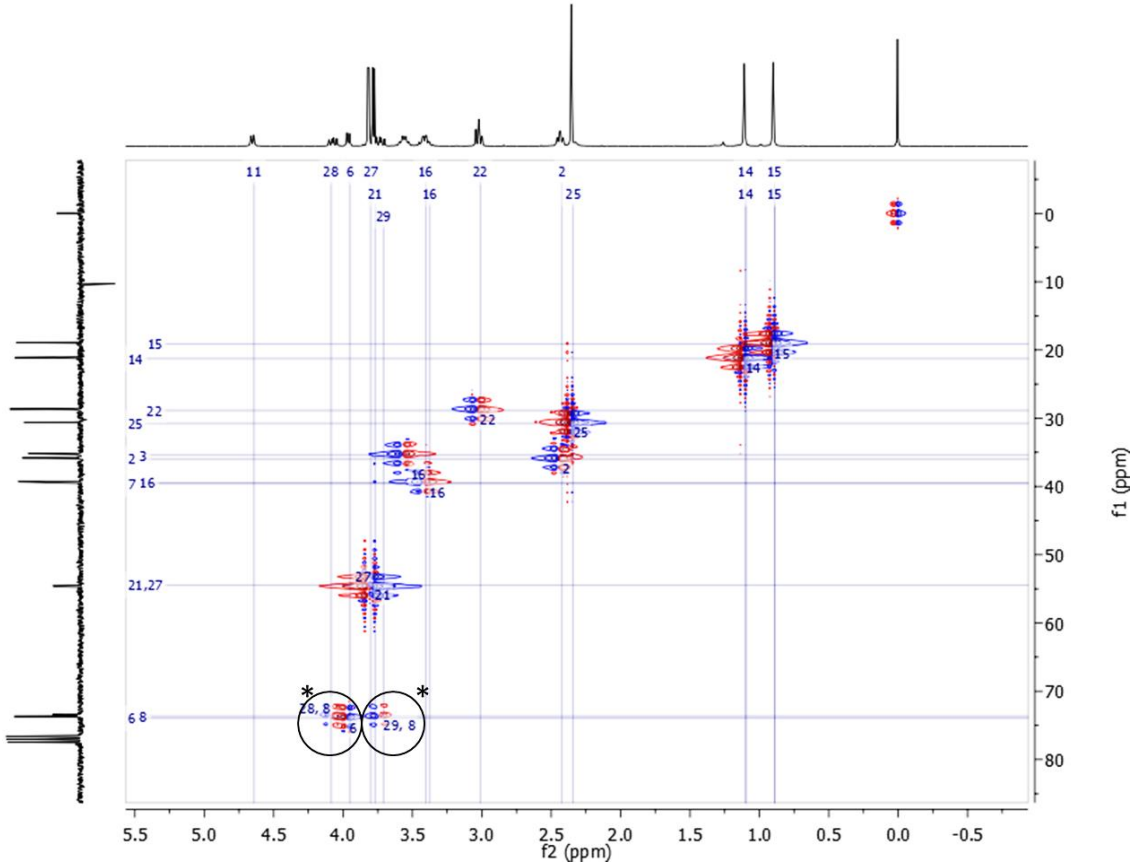
Najprej sem posnela spekter COSY (Slika 4.6). Gre za homonuklearen 2D-NMR eksperiment, ki pokaže, kateri protoni so sklopljeni med sabo.



Slika 4.6: COSY spekter derivata **16b**.

S pomočjo signalov izven diagonale (*cross peaks*) sem ugotovila, kateri pari vodikovih jeder derivata **16b** so sklopljeni preko dveh do treh vezi. Kot prikazuje Slika 4.6, se med sabo sklapljajo protoni H-3 in H-2, H-16 in H-22, proton H-6 in proton H-11, protona H-16 in proton H-13, protona C-3 in proton, vezan na dušik H-4, ter protona H-28 in H-29, katerih neekvivalentnost sem že omenila.

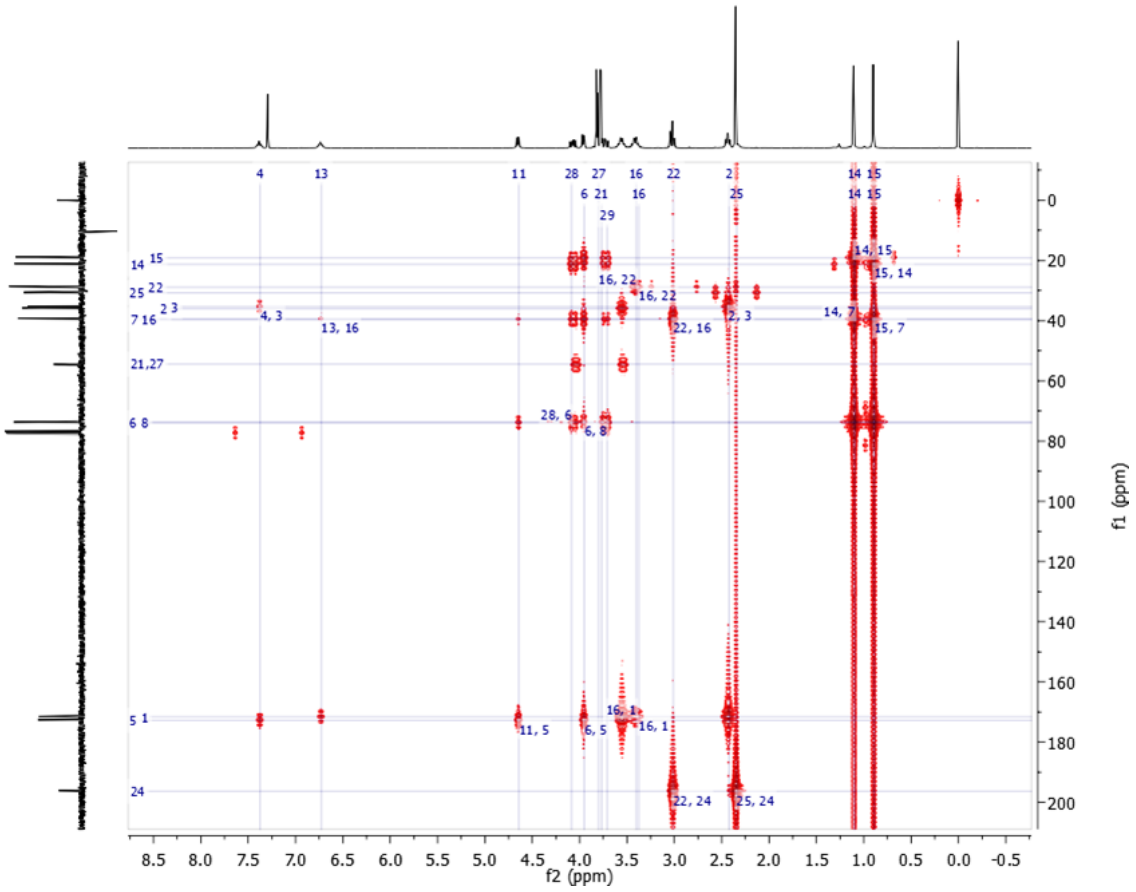
Naslednji posnet spekter je bil HSQC (Slika 4.7). HSQC je heteronuklearen 2D-eksperiment, ki pokaže sklopitev dveh različnih jeder med sabo preko ene vezi.



Slika 4.7: HSQC spekter derivata **16b**.

Iz spektra je bilo razvidno, da se med sabo preko ene vezi sklapljajo protoni in ogljikova jedra, na katere so vodikovi atomi vezani na metilnih skupinah H-14, H-15 in H-25 ter vsi ostali pari. S pomočjo HSQC spektra sem tudi potrdila, da sta protona H-28 in H-29 res vezana na isti ogljik C-8 (Slika 4.7, pika označena z *).

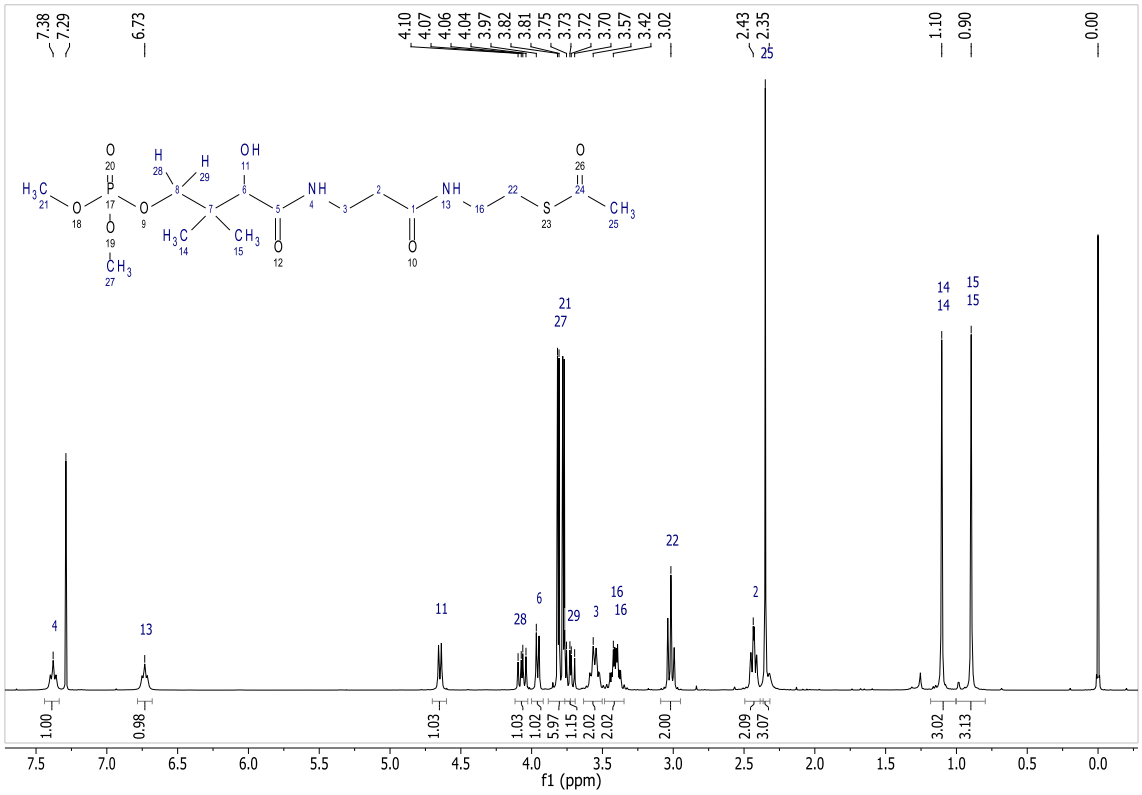
Zadnji 2D-spekter, ki sem ga posnela, pa je bil HMBC. Tudi HMBC je heteronuklearni NMR eksperiment, ki pa za razliko od HSQC pokaže sklopitve preko 2 do 4 vezi. S pomočjo spektra, ki ga prikazuje Slika 4.8, sem asignirala še preostanek signalov v ^{1}H in ^{13}C NMR spektru.



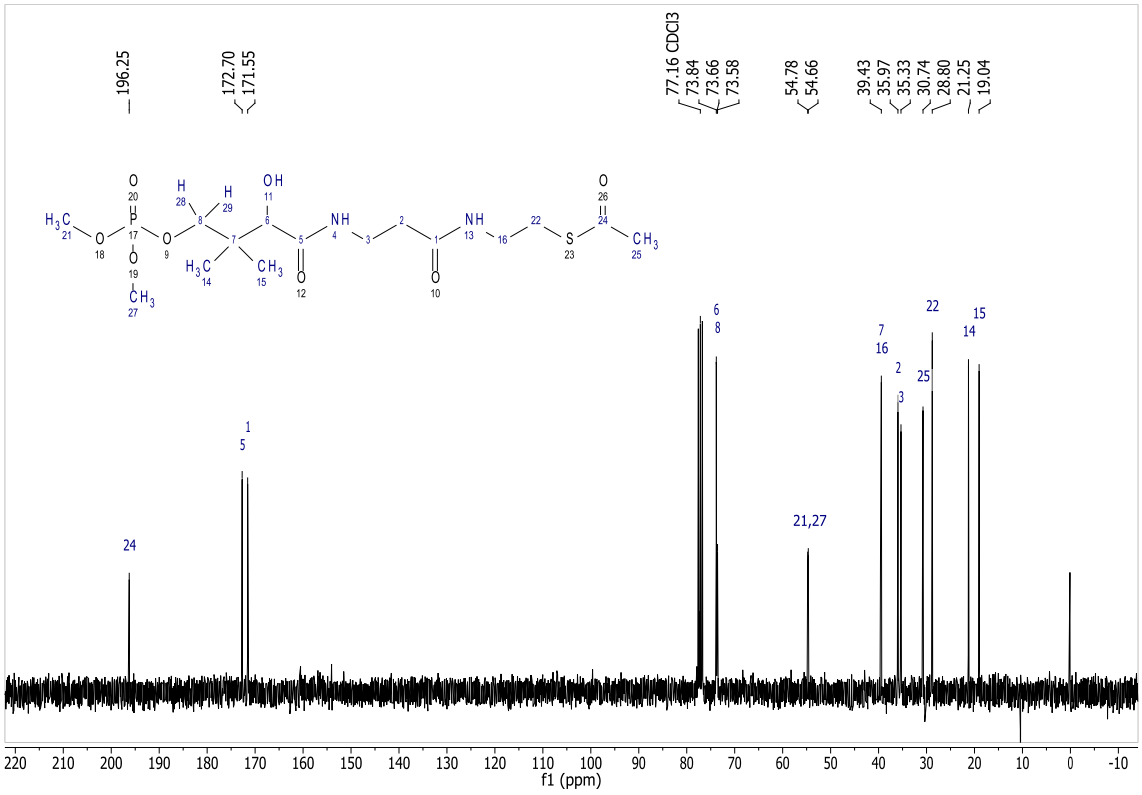
Slika 4.8: HMBC spekter derivata **16b**.

^{1}H in ^{13}C NMR spektra derivata **16b** s popolnoma asigniranimi signali prikazujeta Slika 4.9 in Slika 4.10. S pomočjo natančne NMR analize derivata **16b**, ki so mi jo omogočili 2D-eksperimenti, sem zelo enostavno karakterizirala tudi druge derivate, saj so bili njihovi spektri podobni, in prepoznala tudi vrhove z bolj kompleksnimi multiplicitetami. Priprava novih fosforiliranih derivatov pantotenske kisline pa je bila zato nedvomno zanimiva tudi z vidika NMR spektroskopije.

.



Slika 4.9: ^{1}H NMR spekter derivata **16b** z asigniranimi signali.



Slika 4.10: ^{13}C NMR spekter derivata **16b** z asigniranimi signali.

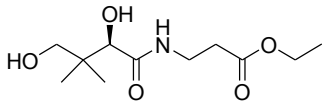
4.2.3 Eksperimentalno delo

4.2.3.1 Eksperimentalni podatki za sintezo etil D-pantotenata 10

Tipičen eksperimentalni postopek pri optimizaciji sinteze etil D-pantotenata 10: Suspenziji kalcijevega D-pantotenata **9** (154,88, 0,5 mmol) v etanolu (4 ml) sem med mešanjem dodala od 0,1 do 2 ekvivalenta žveplove(V) kisline (2,8–56,4 µL). Reakcijsko zmes sem nato v zaprti stekleni cevki (*glass pressure tube*) segrela na temperaturo refluksa (90 °C) in pustila mešati od 2 do 72 ur. Reakcijsko zmes sem nato prenesla na kolono s silikagelom, sprala z etil acetatom in skoncentrirala pod znižanim tlakom. V tako dobljeni surovi reakcijski zmesi sem porazdelitev med produktoma **10** in **12** določevala s pomočjo ^{1}H NMR spektroskopije.

Eksperimentalni postopek za sintezo etil D-pantotenata 10: Suspenziji kalcijevega D-pantotenata **9** (4,765 g, 20 mmol) v etanolu (120 mL) sem med mešanjem dodala žveplovo(V) kislino (1,13 ml, 20 mmol). Bučko sem opremila s hladilnikom in reakcijsko zmes sem segrela na temperaturo refluksa (90 °C) in pustila mešati čez noč. Reakcijsko zmes sem nato prenesla na kolono s silikagelom, sprala z etil acetatom in skoncentrirala pod znižanim tlakom. Po čiščenju s kolonsko kromatografijo na silikagelu z mobilno fazo EtOAc-hexane 95:5 sem izolirala čisti etil D-pantotenat **10** 1,826g (35 %, rumeno olje) ter D-pantolakton 12 1,378g, (53 %, beli kristali).

(R)-etil 3-(2,4-dihidroksi-3,3-dimetilbutanamido)propanoat (10)[147]



$C_{11}H_{21}NO_5$, M_r = 247,14

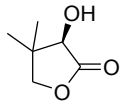
Priprava: 10 je bil pripravljen po zgoraj opisanem eksperimentalnem postopku.
Čiščenje: Kolonska kromatografija na silikagelu, mobilna faza: hexane-EtOAc, 95:5.
Izkoristek: 1,826 g (35 %); bledo rumeno olje.
Rf = 0,23 (hexane-EtOAc, 95:5)

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 0,91 (s, 3 H), 0,99 (s, 3H), 1,27 (t, J = 7,1 Hz, 3 H), 2,56 (t, J = 6,2 Hz, 2 H), 3,46–3,63 (m, 4 H), 3,77 (br s, 1 H), 4,01 (s, 1 H), 4,16 (q, J = 7,1 Hz, 2 H), 4,32 (br s, 1 H), 7,32 (app br t, J = 5,7 Hz, 1 H, NH).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 14,27, 20,34, 21,28, 34,20, 34,76, 39,38, 60,99, 71,27, 77,57, 172,46, 173,46.

HR-MS ($M+H^+$) izračunano za $C_{11}H_{22}NO_5$: 248,1498; izmerjeno: 248,1493.

D-pantolakton (12) [158]



$C_6H_{10}O_3$, M_r = 130,06

Priprava: 12 je bil pripravljen po zgoraj opisanem eksperimentalnem postopku.
Čiščenje: Kolonska kromatografija na silikagelu, mobilna faza: hexane-EtOAc, 95:5.
Izkoristek: 1,378 g, (53 %); beli kristali.
Rf = 0,65 (hexane-EtOAc, 95:5)
$\mathbf{T}_{\text{tališča}}$ = 87–90 °C (lit.[159] = 88–90 °C).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 1,09 (s, 3 H,), 1,23 (s, 3 H), 3,30 (br s, 1 H), 3,95 (d, J = 8,9 Hz, 1 H), 4,03 (d, J = 8,9 Hz, 1 H,), 4,15 (s, 1H).

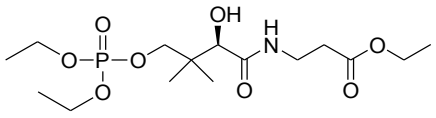
^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 18,94, 23,06, 41,03, 75,90, 76,52, 177,60.

HR-MS ($M+H^+$) izračunano za $C_6H_{11}O_3$: 131,0708; izmerjeno: 131,0710.

4.2.3.2 Eksperimentalni podatki za sintezo maskiranih derivatov fosfopantotenata z uporabo komercialno dostopnih klorofosfatnih reagentov 7

Tipičen eksperimentalni postopek za fosforiliranje etilpantotenata 10 s komercialno dostopnimi klorofosfatnimi reagenti 7 (Eksperimentalni postopek B): Raztopini etil D-pantotenata **10** (247 mg, 1 mmol), DIPEA (264 µL, 1,5 mmol) in DMAP (12 mg, 0,1 mmol) v DCM (4 ml) sem pri 0 °C pod Ar atmosfero po kapljicah dodala raztopino ustreznega klorofosfatnega reagenta 7a - 7g (1,3 mmol), raztopljenega v DCM (ml). Reakcijsko zmes sem nato pustila ogreti se na sobno temperaturo in mešala nadaljnjih 2 do 12 ur. Potek reakcije sem ustavila z dodatkom vode (10 mL) in ekstrahirala z DCM (2 x 20 ml). Združene organske faze sem sprala z nasičeno raztopino NH_4Cl, sušila z brezvodnim Na_2SO_4 in koncentrirala pod znižanim tlakom. Produkte **11a - 11e** sem čistila s kolonsko kromatografijo na silikagelu.

(R)-etil 3-(4-(dietoksifosforiloksi)-2-hidroksi-3,3-dimetilbutanamido)propanoat) (11a)



$C_{15}H_{30}NO_8P$, M_r = 383,17

Priprava: 11a je bil pripravljen po **Eksperimentalnem postopku B** z 1,3 ekv. dietil klorofosfata **7a** (193 µl, 1,3 mmol). Reakcijsko zmes sem mešala 2 uri pri sobni temperaturi.
Čiščenje: Kolonska kromatografija na silikagelu, mobilna faza: DCM-MeOH, 95:5.
Izkoristek: 299 mg (78 %); rahlo rumeno olje.
Rf = 0,25 (DCM-MeOH, 95:5).

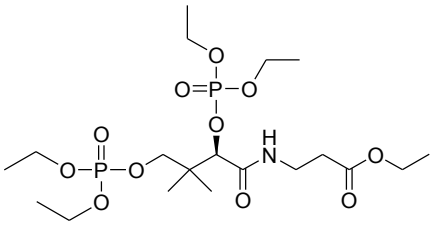
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 0,86 (s, 3 H), 1,12 (s, 3 H), 1,26 (t, J = 7,1 Hz, 3 H), 1,35 (td, J = 0,9 Hz, J = 7,1 Hz, 6 H), 2,55 (t, J = 6,4 Hz, 2 H), 3,54 (m, 2 H), 3,6 (dd, J = 7,5 Hz, J = 10,0 Hz, 1 H), 3,98 (s, 1 H), 4,18–4,07 (m, 7 H), 7,44 (app br t, J = 6,0 Hz, 1 H, NH).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 14,09, 16,03 (d, J = 6,6 Hz), 18,53, 20,92, 34,13, 34,51, 39,36 (d, J = 4,9 Hz), 60,55, 64,13 (app t, J = 5,9 Hz), 73,43, 73,49 (d, J = 6,0 Hz), 171,97, 172,36.

^{31}P NMR (120 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 0,59 (s).

HR-MS ($M+H^+$) izračunano za $C_{15}H_{31}NO_8P$: 384,1787; izmerjeno: 384,1798.

(R)-etil 3-(2,4-bis(dietoksifosforiloksi)-3,3-dimetilbutanamido)propanoat (11a')



$C_{19}H_{39}NO_{11}P_2$, M_r = 519,20

Priprava: Raztopini etil D-pantotenata **10** (247 mg, 1 mmol), DIPEA (528 µl, 3 mmol) in DMAP (25 mg, 0,2 mmol) v DCM (5 ml) sem pri 0 °C pod Ar atmosfero po kapljicah dodala dietil klorofosfat **7a** (386 µl, 2,6 mmol). Reakcijsko zmes sem nato pustila ogreti se na sobno temperaturo in mešala nadaljnjih 2 do 12 ur. Potek reakcije sem ustavila z dodatkom vode (10 ml) in ekstrahirala z DCM (2 x 20 ml). Združene organske faze sem sprala z nasičeno raztopino NH_4Cl, sušila z brezvodnim Na_2SO_4 in koncentrirala pod znižanim tlakom.
Čiščenje: Kolonska kromatografija na silikagelu, mobilna faza: EtOAc-MeOH, 98:2.
Izkoristek: 227 mg (44 %); brezbarvno olje.
Rf = 0,18 (EtOAc-MeOH, 98:2).

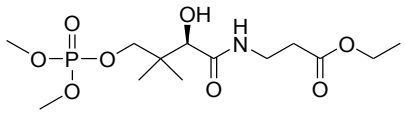
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 1,03 (s, 3 H), 1,08 (s, 3 H), 1,27 (t, J = 7,1 Hz, 3 H), 1,35 (m, 12 H), 2,56 (t, J = 6,4 Hz, 2 H), 3,56 (m, 2 H), 3,88 (dd, J = 4,5, Hz, J = 9,9 Hz, 1 H), 3,97 (dd, J = 4,9, Hz, J = 9,9 Hz, 1 H), 4,14 (m, 8 H), 4,56 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 6,95 (app br t, J = 6,0 Hz, 1 H, NH).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 14,16, 16,12 (m), 20,39, 20,59, 33,91, 34,75, 39,10 (dd, J = 6,3 Hz, J = 2,2 Hz), 60,71, 63,81–64,44 (m), 71,97 (d, J = 5,7 Hz), 80,54 (d, J = 6,6 Hz), 167,82, 172,00.

^{31}P NMR (120 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = -1,32 (s, 1 P), -0,73 (s, 1 P).

HR-MS (M+H$^+$) izračunano za $C_{19}H_{40}NO_{11}P_2$: 520,2077; izmerjeno: 520,2075.

(R)-etil 3-(4-(dimetoksifosforiloksi)-2-hidroksi-3,3-dimetilbutanamido)propanoat (11b)



$C_{13}H_{26}NO_8P$, M_r = 355,14

Priprava: 11b je bil pripravljen po **Eksperimentalnem postopku B** z 1,3 ekv. dimetil klorofosfata **7b** (146 µl, 1,3 mmol). Reakcijsko zmes sem mešala 2 uri pri sobni temperaturi.
Čiščenje: Kolonska kromatografija na silikagelu, mobilna faza: EtOAc.
Izkoristek: 284 mg (80 %); brezbarvno olje.
Rf = 0,29 (EtOAc).

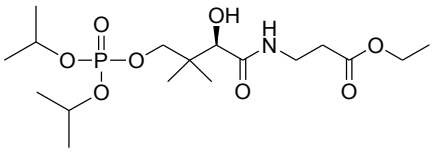
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 0,86 (s, 3 H), 1,13 (s, 3 H), 1,26 (t, J = 7,2 Hz, 3 H), 2,55 (t, J = 6,3 Hz, 2 H), 3,55 (m, 2 H), 3,68 (dd, J = 7,6 Hz, J = 10,0 Hz, 1 H), 3,79 (d, J = 11,2 Hz, 3 H), 3,80 (d, J = 11,1 Hz, 3 H), 3,99 (br s, 1 H), 4,19–4,10 (m, 3 H), 4,67 (br s, 1 H), 7,39 (app br t, J = 5,9 Hz, 1 H, NH).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 914,22, 18,58, 21,01, 34,24, 34,67, 39,55 (d, J = 5,5 Hz), 54,69 (m), 60,74, 73,46, 73,86 (d, J = 5,9 Hz), 172,15, 172,34.

^{31}P NMR (120 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 2,64 (s).

HR-MS ($M+H^+$) izračunano za $C_{13}H_{27}NO_8P$: 356,1474; izmerjeno: 356,1475.

(R)-etil 3-(4-(diizopropoksifosforiloksi)-2-hidroksi-3,3-dimetilbutanamido)propanoat (11c)



$C_{17}H_{34}NO_8P$, M_r = 411,20

Priprava: 11c je bil pripravljen po **Eksperimentalnem postopku B** z 1,3 ekv. diizopropil klorofosfata **7c** (198 µl, 1,3 mmol). Reakcijsko zmes sem mešala 2 uri pri sobni temperaturi.
Čiščenje: Kolonska kromatografija na silikagelu, mobilna faza: CH_2Cl_2-MeOH, 98:2.
Izkoristek: 263 mg (64 %); rahlo rumeno olje.
Rf = 0,23 (CH_2Cl_2–MeOH, 98:2).

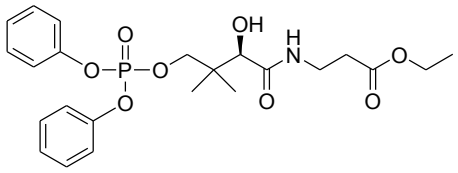
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 0,83 (s, 3 H), 1,17 (s, 3 H), 1,26 (t, J = 7,1 Hz, 3 H), 1,35 (m, 12 H), 2,55 (t, J = 6,4 Hz, 2 H,), 3,55 (m, 2 H), 3,99 (br s, 1 H), 4,19–4,07 (m, 3 H), 4,63 (m, 2 H), 4,95 (br s, 1 H), 7,45 (app br t, J = 5,9 Hz, 1 H, NH).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 14,26, 18,25, 21,30, 23,70 (m), 34,33, 34,64, 39,70 (d, J = 4,7 Hz), 60,69, 73,17 (d, J = 6,4 Hz), 73,42 (d, J = 11,9 Hz), 73,42, 172,08, 172,23.

^{31}P NMR (120 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = -0,31 (s).

HR-MS ($M+H^+$) izračunano za $C_{17}H_{35}NO_8P$: 412,2100; izračunano: 412,2107.

(R)-etil 3-(4-(difenoksifosforiloksi)-2-hidroksi-3,3-dimetilbutanamido)propanoat (11d)



$C_{23}H_{30}NO_8P$, M_r = 479,17

Priprava: 11d je bil pripravljen po **Eksperimentalnem postopku B** z 1,3 ekv. difenil klorofosfata **7d** (272 µl, 1,3 mmol). Reakcijsko zmes sem mešala 12 ur pri sobni temperaturi.
Čiščenje: Kolonska kromatografija na silikagelu, mobilna faza: EtoAc-Heptane, 6:4.
Izkoristek: 303 mg (63 %); belo olje.
Rf = 0,29 (EtOAc–heptane, 6:4).

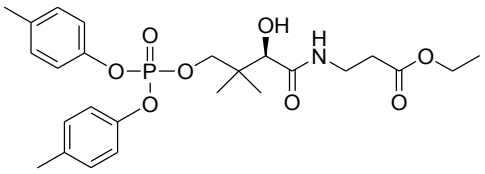
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 0,84 (s, 3 H), 1,09 (s, 3 H), 1,24 (t, J = 7,1 Hz, 3 H), 2,51 (t, J = 6,3 Hz, 2 H), 3,51 (m, 2 H), 3,86 (m, 2 H), 4,13 (q, J = 7,1 Hz, 2 H), 4,33 (dd, J = 7,4 Hz, J = 9,8 Hz, 1 H), 7,17–7,28 (m, 7 H, 6xCH + NH), 7,31–7,38 (m, 4 H).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 14,25, 18,52, 21,05, 34,23, 34,70, 39,69 (d, J = 5,5 Hz), 60,77, 73,49, 75,17 (d, J = 6,4 Hz), 120,16 (m), 125,69, 125,79, 129,98, 150,42 (app t, J = 7,1 Hz), 171,99, 172,16.

^{31}P NMR (120 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = -10,17 (s).

HR-MS ($M+H^+$) izračunano za $C_{23}H_{31}NO_8P$: 480,1787; izračunano: 480,1785.

(R)-etil 3-(4-(bis(p-toliloksi)fosforiloksi)-2-hidroksi-3,3-dimetilbutanamido)propanoat (11e)



$C_{25}H_{34}NO_8P$, M_r = 507,20

Priprava: 11e je bil pripravljen po **Eksperimentalnem postopku B** z 1,3 ekv. Di-p-tolil klorofosfata **7e** (386 mg, 1,3 mmol). Reakcijsko zmes sem mešala 12 ur pri sobni temperaturi.
Čiščenje: Kolonska kromatografija na silikagelu, mobilna faza: EtOAc-heptan, 55:45.
Izkoristek: 391 mg (77 %); belo olje.
Rf = 0,24 (EtOAc-heptan, 55:45.).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 0,83 (s, 3 H), 1,10 (s, 3 H), 1,24 (t, J = 7,1 Hz, 3 H), 2,32 (br s, 6 H), 2,51 (t, J = 6,3 Hz, 2 H), 3,51 (ddt, J = 2,8 Hz, J = 6,5 Hz, J = 8,9 Hz, 2 H), 3,81 (dd, J = 8,6 Hz, J = 10,0 Hz, 1 H), 3,87 (s, 1 H), 4,13 (q, J = 7,2 Hz, 2 H), 4,31 (dd, J = 7,7 Hz, J = 10,1 Hz, 1 H), 7,11 (m, 8 H), 7,28 (app br t, J = 5,9 Hz, 1 H, NH).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 14,26, 18,45, 20,82, 21,09, 34,25, 34,69, 39,72 (d, J = 5,1 Hz), 60,75, 73,41, 75,05 (d, J = 6,4 Hz), 119,86 (app dd, J = 4,6 Hz, J = 7,0 Hz), 130,39, 135,29, 135,40, 148,27 (app t, J = 7,0 Hz), 171,99, 172,13.

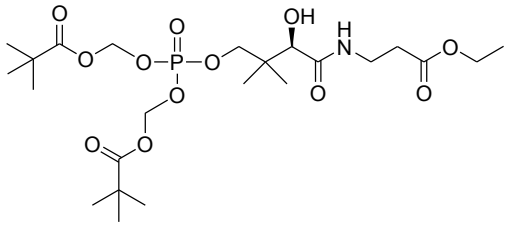
^{31}P NMR (120 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = -9,52 (s).

HR-MS ($M+H^+$) izračunano za $C_{25}H_{35}NO_8P$: 508,2100; izračunano: 508,2114.

4.2.3.3 Eksperimentalni podatki za sintezo derivata fosfopantotenata, maskiranega s POM skupinami 11h

Bis(POM) klorofosfat **4a** sem pripravila po postopku, opisanem v poglavju **Eksperimentalni podatki za sintezo bis(POM) klorofosfata 4a** na strani 47. Derivat **11h** sem pripravila po opisanem postopku:

(R)-etil 3-(4-(bis(pivaloiloksimetil)fosforiloksi)-2-hidroksi-3,3-dimetilbutanamido)propanoat (11h)



$C_{23}H_{42}NO_{12}P$, M_r = 555,24

Priprava: Raztopini etil D-pantotenata **10** (247 mg, 1 mmol), DIPEA (264 µL, 1,5 mmol) in DMAP (12 mg, 0,1 mmol) v DCM (6,5 ml) sem med mešanjem pri t 0 °C pod Ar atmosfero po kapljicah dodala raztopino bis(pivaloiloksimetil) klorofosfata **4a** (516 mg, 1,5 mmol) v DCM (6,5 ml) CH_2Cl_2. Reakcijsko zmes sem nato pustila ogreti se na sobno temperaturo in mešala nadaljnji 2 uri. Potek reakcije sem ustavila z dodatkom vode (10 mL) in ekstrahirala z DCM (2 x 20 ml). Združene organske faze sem sprala z nasičeno raztopino NH_4Cl, sušila z brezvodnim Na_2SO_4 in koncentrirala pod znižanim tlakom.
Čiščenje: Kolonska kromatografija na silikagelu, mobilna faza: DCM-MeOH, 98:2.
Izkoristek: 194 mg (35 %); rumeno olje.
Rf = 0,26 (DCM-MeOH, 98:2)

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 0,86 (s, 3 H), 1,12 (s, 3 H), 1,28–1,24 (m, 21 H), 2,55 (t, J = 6,2 Hz, 2 H), 3,56 (m, 2 H), 3,72 (dd, J = 7,4 Hz, J = 9,9 Hz, 1 H), 4,00 (d, J = 5,0 Hz, 1 H), 4,15 (m, 3 H), 4,25 (d, J = 5,8 Hz, 1 H), 5,61–5,70 (m, 4 H), 7,31 (app br t, J = 5,9 Hz, 1 H, NH).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 14,25, 18,44, 21,08, 26,88, 34,24, 34,69, 38,81, 39,46 (d, J = 5,9 Hz), 60,73, 73,41, 74,53 (d, J = 5,9 Hz), 82,98 (app t, J = 4,2 Hz) 172,03, 172,16, 176,83, 176,92.

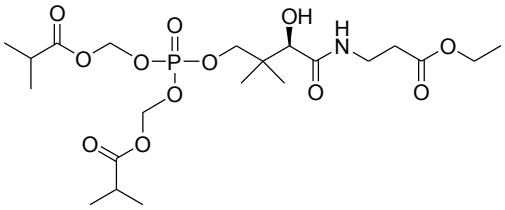
^{31}P NMR (120 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = -2,22 (s).

HR-MS ($M+H^+$) izračunano za $C_{23}H_{43}NO_{12}P$: 556,2523; izmerjeno: 556,2536.

4.2.3.4 Eksperimentalni podatki za sintezo derivatov fosfopantotenata, maskiranega z *i*-BOM skupinami 11i

Bis(*i*-BOM) klorofosfat **4b** sem pripravila po postopku, opisanem v poglavju **Eksperimentalni** podatki za sintezo bis(*i-BOM*) klorofosfata 4b na strani 50. Derivat **11i** sem pripravila po opisanem postopku:

(R)-etil 3-(4-(bis(izobutiriloksimetil)fosforiloksi)-2-hidroksi-3,3-dimetilbutanamido)propanoat (11i)



$C_{21}H_{38}NO_{12}P$, M_r = 527,21

Priprava: Raztopini etil D-pantotenata **10** (247 mg, 1 mmol), DIPEA (264 µL, 1,5 mmol) in DMAP (12 mg, 0,1 mmol) v DCM (9 ml) sem med mešanjem pri t 0 °C pod Ar atmosfero po kapljicah dodala raztopino bis(izobutirilmetil) klorofosfata **4b** (474 mg, 1,5 mmol) v DCM (9 ml) CH_2Cl_2. Reakcijsko zmes sem nato pustila ogreti se na sobno temperaturo in mešala nadaljnji 2 uri. Potek reakcije sem ustavila z dodatkom vode (10 mL) in ekstrahirala z DCM (2 x 20 ml). Združene organske faze sem sprala z nasičeno raztopino NH_4Cl, sušila z brezvodnim Na_2SO_4 in koncentrirala pod znižanim tlakom.
Čiščenje: Kolonska kromatografija na silikagelu, mobilna faza: DCM-MeOH, 97:3.
Izkoristek: 133 mg (25 %); svetlo rumeno olje.
Rf = 0,22 (DCM-MeOH, 97:3).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 0,85 (s, 3 H), 1,13 (s, 3 H), 1,21 (app dd, J = 1,5 Hz, J = 7,0 Hz, 12 H), 1,26 (t, J = 7,1 Hz, 3 H), 2,55 (t, J = 6,2 Hz, 2 H), 2,63 (m, 2 H), 3,56 (m, 2 H), 3,71 (dd, J = 7,7 Hz, J = 10,0 Hz, 1 H), 4,00 (d, J = 6,2 Hz, 1 H), 4,15 (m, 4 H), 5,65 (m, 4 H), 7,28 (app br t, J = 6,0 Hz, 1 H, NH).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 14,28, 18,39, 18,67 (br s), 21,10, 33,83, 34,27, 34,73, 39,53 (d, J = 6,1 Hz), 60,77, 73,41, 74,58 (d, J = 5,9 Hz), 82,83 (app dd, J = 2,5 Hz, J = 5,0 Hz), 171,97, 172,19, 175,41, 175,50.

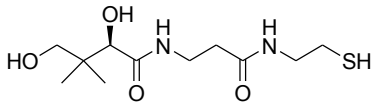
^{31}P NMR (120 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = -2,43 (s).

HR-MS ($M+H^+$) izračunano za $C_{21}H_{39}NO_{12}P$: 528,2210; izmerjeno: 528,2223.

4.2.3.5 Eksperimentalni podatki za sintezo S-acetil-panteteina 15

S-acetilpantetein **15** je bil pripravljen v 2 korakih, opisanih pri posameznih produktih:

(R)-2,4-dihidroksi-N-(3-(2-mercaptoetilamino)-3-oxopropyl)-3,3-dimetilbutanamide (14) [156]

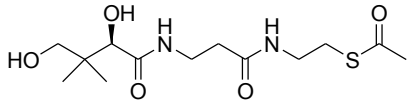


$C_{11}H_{22}N_2O_4S$, M_r = 278,13

Priprava: D-pantetin **13** (5,06 g, 9,12 mmol) smo pod argonovo atmosfero raztopili v mešanici H_2O (61 ml) in MeOH (61 ml), ki smo ju predhodno 1 uro degazirali v bučki, potopljeni v ultrasonično kopel, opremljeni z argonovim balonom in oljno pastjo. Reakcijsko zmes smo ohladili na 4 °C, dodali ditiotreitol (2,27 g, 14,59 mmol), jo mešali pri 4 °C še 48 ur in spremljali potek reakcije s pomočjo TLC. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes ogreli na sobno temperaturo in koncentrirali pod znižanim tlakom.
Čiščenje: Kolonska kromatografija na silikagelu, mobilna faza: DCM-MeOH, gradientno od 97:3 do 90:10.
Izkoristek: 4,92 g (97 %); zelo viskozno brezbarvno olje.
Rf = 0,54 (DCM-MeOH, 8:2).

^{1}H NMR (300 MHz, D_2O) δ [ppm] = 0,94 (s, 6 H), 2,47 (t, J = 6,8 Hz, 2 H), 2,63 (t, J = 6,8 Hz, 2 H), 3,43–3,52 (m, 6 H), 3,91 (s, 1 H).

(R)-2,4-dihidroksi-N-(3-(2-mercaptoetilamino)-3-oxopropyl)-3,3-dimetilbutanamide (15) [160]



$C_{13}H_{24}N_2O_5S$, M_r = 320,14

Priprava: D-pantetein **14** (4,91 g, 17,63 mmol) smo s pomočjo ultrasonične kopeli raztopili v H_2O (30 ml) in dodali tioocetno kislino (10,5 mL, 141 mmol). Reakcijsko zmes smo ogreli na 40 °C ter jo mešali 24 ur. Reakcijsko zmes smo nato ohladili na sobno temperaturo in koncentrirali pod znižanim tlakom.
Čiščenje: Kolonska kromatografija na silikagelu, mobilna faza: DCM-MeOH, 97:3.
Izkoristek: 4,91 g (87 %); zelo viskozno rumeno olje.
Rf = 0,29 (DCM-MeOH, 97:3).

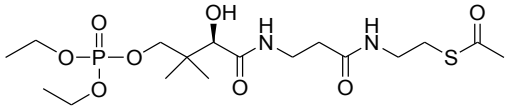
^{1}H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ [ppm] = 0,94 (s, 6 H), 2,35 (s, 3 H), 2,44 (t, J = 6,7 Hz, 2 H), 3,02 (t, J = 6,7 Hz, 2 H), 3,33–3,53 (m, 6 H), 3,91 (s, 1 H).

^{13}C NMR (76 MHz, CD_3OD) δ [ppm] = 20,90, 21,32, 29,44, 30,50, 36,31, 36,38, 40,00, 70,33, 77,24, 173,86, 175,99, 197,04.

4.2.3.6 Eksperimentalni podatki za sintezo maskiranih derivatov fosfopanteteina z uporabo komercialno dostopnih klorofosfatnih reagentov 7

Tipičen eksperimentalni postopek za fosforiliranje S-acetilpanteteina 15 s komercialno dostopnimi klorofosfatnimi reagenti 7 (Eksperimentalni postopek C): Raztopini S-acetilpanteteina **15** (320 mg, 1 mmol), DIPEA (264 µL, 1,5 mmol) in DMAP (12 mg, 0,1 mmol) v DCM (4 ml) sem pri 0 °C pod Ar atmosfero po kapljicah dodala raztopino ustreznega klorofosfatnega reagenta **7a** – **7c** (1,3 mmol), raztopljenega v DCM (4 ml). Reakcijsko zmes sem nato pustila ogreti se na sobno temperaturo in mešala nadaljnji 2 uri. Potek reakcije sem ustavila z dodatkom vode (10 mL) in ekstrahirala z DCM (2 x 20 ml). Združene organske faze sem sprala z nasičeno raztopino NH_4Cl, sušila z brezvodnim Na_2SO_4 in koncentrirala pod znižanim tlakom. Produkte **16a** - **16c** sem čistila s kolonsko kromatografijo na silikagelu.

(R)-S-2-(3-(4-(dietoksifosforiloksi)-2-hidroksi-3,3-dimetilbutanamido)propanamido)etil etanetioat (16a)



$C_{17}H_{33}N_2O_8PS$, M_r = 456,17

Priprava: 16a je bil pripravljen po **Eksperimentalnem postopku C** z 1,3 ekv. dietil klorofosfata **7a** (193 µl, 1,3 mmol).
Čiščenje: Kolonska kromatografija na silikagelu, mobilna faza: DCM-MeOH, 97:3.
Izkoristek: 338 mg (74 %); svetlo rumeno olje.
Rf = 0,33 (DCM-MeOH, 97:3).

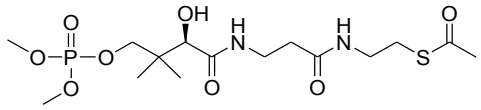
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 0,89 (s, 3 H), 1,10 (s, 3 H), 1,34 (td, J = 0,8 Hz, J = 7,0, 6 H), 2,33 (s, 3 H), 2,44 (m, 2 H), 3,01 (t, J = 6,5 Hz, 2 H), 3,40 (app qd, J = 1,9 Hz, J = 6,6 Hz, 2 H), 3,54 (m, 2 H), 2,69 (dd, J = 6,8 Hz, J = 9,9 Hz, 1 H), 3,96 (s, 1 H), 4,03–4,20 (m, 5 H), 6,97 (m, 1 H, NH), 7,46 (app br t, J = 6,1 Hz, 1 H, NH).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 16,14, 16,23, 18,99, 21,27, 28,72, 30,69, 35,37, 35,98, 39,33, 39,44 (d, J = 6,3 Hz), 64,24 (app t, J = 5,9 Hz), 73,36 (d, J = 6,2 Hz), 73,85, 171,69, 172,92, 196,26.

^{31}P NMR (120 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 0,24 (s).

HR-MS ($M+H^+$) izračunano za $C_{17}H_{34}N_2O_8PS$: 457,1774; izmerjeno: 457,1777.

(R)-S-2-(3-(4-(dimetoksifosforiloksi)-2-hidroksi-3,3-dimetilbutanamido)propanamido)etil etanetioat (16b)



$C_{15}H_{29}N_2O_8PS$, M_r = 428,14

Priprava: 16b je bil pripravljen po **Eksperimentalnem postopku C** z 1,3 ekv. dimetil klorofosfata **7b** (146 µl, 1,3 mmol).
Čiščenje: Kolonska kromatografija na silikagelu, mobilna faza: DCM-MeOH, 97:3.
Izkoristek: 257 mg (60 %); svetlo rumeno olje.

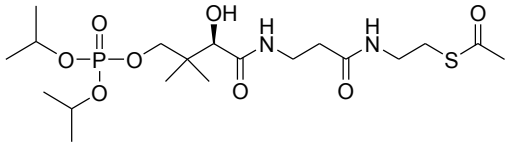
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 0,90 (s, 3 H), 1,10 (s, 3 H), 2,35 (s, 3 H), 2,43 (m, 2 H), 3,02 (t, J = 6,8 Hz, 2 H), 3,40 (app qd, J = 3,0 Hz, J = 6,5 Hz, 2 H), 3,72 (dd, J = 7,1 Hz, J = 10,0 Hz, 1 H), 3,81 (m, 6 H), 3,98 (d, J = 5,7 Hz, 1 H), 4,07 (dd, J = 3,0 Hz, J = 10,0 Hz, 1 H), 4,65 (d, J = 5,8 Hz, 1 H) 4,03–4,20 (m, 5 H), 6,73 (app br t, J = 5,5 Hz, 1 H, NH), 7,38 (app br t, J = 6,0 Hz, 1 H, NH).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 19,04, 21,25, 28,80, 30,74, 35,33, 35,97, 39,43, 39,54 (d, J = 6,1 Hz), 54,57 (m), 54,86, 73,62 (d, J = 6,1 Hz), 73,84, 171,55, 172,70, 196,25.

^{31}P NMR (120 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 2,54 (s).

HR-MS ($M+H^+$) izračunano za $C_{15}H_{30}N_2O_8PS$: 429,1461; izmerjeno: 429,1463.

(R)-S-2-(3-(4-(diizopropoksifosforiloksi)-2-hidroksi-3,3-dimetilbutanamido)propanamido)etil etanetioat (16c)



$C_{19}H_{37}N_2O_8PS$, M_r = 484,20

Priprava: 16c je bil pripravljen po **Eksperimentalnem postopku C** z 1,3 ekv. dietil klorofosfata **7c** (198 µl, 1,3 mmol).
Čiščenje: Kolonska kromatografija na silikagelu, mobilna faza: DCM-MeOH, 97:3.
Izkoristek: 223 mg (46 %); svetlo rumeno olje.
Rf = 0,35 (DCM-MeOH, 9:1).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 0,86 (s, 3 H), 1,14 (s, 3 H), 1,34 (m, 12 H), 2,35 (s, 3 H), 2,43 (m, 2 H), 3,02 (t, J = 6,4 Hz, 2 H), 3,41 (app qd, J = 2,0 Hz, J = 6,6 Hz, 2 H), 3,52–3,63 (m, 3 H), 3,96 (d, J = 5,3 Hz, 1 H), 4,05 (dd, J = 7,9 Hz, J = 10,2 Hz, 2 H) 4,63 (m, 2 H), 4,87 (d, J = 5,7 Hz, 1 H), 6,70 (app br t, J = 5,7 Hz, 1 H, NH), 7,44 (app br t, J = 6,0 Hz, 1 H, NH).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 18,68, 21,47, 23,72 (m), 28,83, 30,72, 35,28, 36,11, 39,40, 39,61 (d, J = 5,4 Hz), 73,06 (m), 73,46, 171,45, 172,71, 196,15.

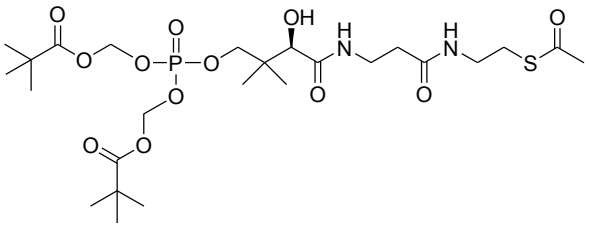
^{31}P NMR (120 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = -0,78 (s).

HR-MS (M+H$^+$) izračunano za $C_{19}H_{38}N_2O_8PS$: 485,2087; izmerjeno: 458,2074.

4.2.3.7 Eksperimentalni podatki za sintezo derivata fosfopanteteina, maskiranega s POM skupinami 16d

Bis(POM) klorofosfat **4a** sem pripravila po postopku, opisanem v poglavju **Eksperimentalni podatki za sintezo bis(POM) klorofosfata 4a** na strani 47. Derivat **16d** smo pripravili po opisanem postopku:

(R)-S-2-(3-(4-(di(pivaloiloksimetoksi)fosforiloksi)-2-hidroksi-3,3-dimetilbutanamido)propanamido)etil etanetioat (16b) (16d)



$C_{25}H_{45}N_2O_{12}PS$, M_r = 628,24

Priprava: Raztopini S-acetilpanteteina **15** (320 mg, 1 mmol), DIPEA (264 µl, 1,5 mmol) in DMAP (12 mg, 0,1 mmol) v DCM (10 ml) sem med mešanjem pri 0 °C pod Ar atmosfero po kapljicah dodala raztopino bis(pivaloiloksimetil) klorofosfata **4a** (516 mg, 1,5 mmol) v DCM (10 ml) DCM. Reakcijsko zmes sem nato pustila ogreti se na sobno temperaturo in mešala nadaljnjih 12 ur. Potek reakcije sem ustavila z dodatkom vode (10 ml) in ekstrahirala z DCM (2 x 20 ml). Združene organske faze sem sprala z nasičeno raztopino NH_4Cl, sušila z brezvodnim Na_2SO_4 in koncentrirala pod znižanim tlakom.
Čiščenje: Kolonska kromatografija na silikagelu, mobilna faza: DCM-MeOH, 92:8.
Izkoristek: 276 mg (44 %); rumeno olje.
Rf = 0,57 (DCM-MeOH, 9:1).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 0,88 (s, 3H), 1,12 (s, 3 H), 1,24 (s, 9 H), 1,24 (s, 9 H), 2,35 (s, 3 H), 2,39–2,47 (m, 2 H), 2,95–3,09 (m, 2 H), 3,34–3,50 (m, 2 H), 3,51–3,63 (m, 2 H), 3,75 (dd, J = 10,0, 7,2 Hz, 1 H), 3,97 (d, J = 5,8 Hz, 1 H), 4,08 (d, J = 6,3 Hz, 1 H), 4,13 (dd, J = 10,0, 6,9 Hz, 1 H), 5,61–5,71 (m, 4 H), 6,39 (app t, J = 5,3 Hz, 1 H), 7,25 (app t, J = 6,2 Hz, 1H).

^{13}C NMR (76 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 18,94, 21,29, 26,95, 28,83, 30,74, 35,36, 35,95, 38,87, 39,47 (m), 73,81, 74,29 (d, J = 6,2 Hz), 83,01 (m), 171,51, 172,48, 176,93, 196,25.

^{31}P NMR (120 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = -2,64 (s).

Poglavje 5

Zaključki

V okviru doktorske disertacije sem raziskovala možnost priprave novih fosforiliranih derivatov pantotenske kisline s potencialno biološko aktivnostjo. Za ta namen sem študirala možnost uporabe različnih klorofosfatnih reagentov za selektivno in učinkovito pripravo derivatov z različno maskiranimi fosfatnimi skupinami. Poleg tega pa sem želela razširiti možnost uporabe klorofosfatnih reagentov za pripravo tistih aciloksialkilnih predzdravilnih derivatov, ki jih do sedaj ni bilo mogoče pripravljati na tak način. Rezultate svojih raziskav sem razdelila in opisala v dveh poglavjih.

V prvem poglavju z naslovom Razvoj novih metod za pripravo predzdravil fosfatov sem predstavila rezultate študije razvoja novih metod za pripravo aciloksialkilnih in alkiloksikarboniloksialkilnih predzdravil fosfatov. V tem delu svojih raziskav sem želela preveriti, ali je mogoče znan postopek priprave bis(POM) klorofosfata razširiti in uporabiti tudi za pripravo drugih sorodnih predzdravil fosfatov. Zato sem preizkusila, ali je mogoče predlagani koncept izkoristiti za pripravo več novih klorofosfatnih reagentov z zamenjavo pivaloilmetilklorida v prvi stopnji sinteze reagenta z drugimi ustreznimi kloridi. Ugotovila sem, da je predlagana ideja sicer izvedljiva, ampak le za pripravo reagentov s skupinami, ki so po svoji strukturi in stabilnosti dovolj podobne POM skupini. Tako sem uspešno pripravila nov klorofosfatni reagent z *i*-BOM skupinami. Preizkusila sem tudi možnost priprave reagentov z AM skupino ter z eno alkiloksikarboniloksialkilno skupino, vendar sem bila zaradi preobčutljivosti skupin na reakcijske pogoje priprave reagenta v teh dveh primerih neuspešna.

V nadaljevanju sem novi reagent bis(*i*-BOM) klorofosfat želela preizkusiti najprej za fosforiliranje različnih enostavnih alkoholov. Ker pa so bili reakcijski pogoji, ki so jih za fosforiliranje s sorodnim reagentom v literaturi uporabili različni avtorji, zelo neekonomični, sem najprej poiskala ustreznejše reakcijske pogoje na izbranem modelnem sistemu. Optimizirane pogoje sem nato uspešno uporabila tudi za fosforiliranje treh enostavnih alkoholov z novim reagentom. Z dobrima izkoristkoma sem fosforilirala dva primarna alkohola: benzil alkohol in butan-1-ol. Nekoliko slabši izkoristek pa sem dobila pri fosforiliranju sekundarnega alkohola, butan-2-ola. Tako sem pokazala, da je s pripravljenim novim reagentom bis(*i*-BOM) klorofosfatom mogoče uspešno fosforilirati več različnih alkoholov. Dosegla sem le nekoliko nižje izkoristke od tistih, ki so jih na enakih substratih dosegli v literaturi pri uporabi sorodnega reagenta bis(POM) klorofosfata, vendar pa sem pri tem uporabila neprimerljivo bolj ekonomične pogoje. Uspešno fosforiliranje sem dosegla zgolj z uporabo 1,5 ekvivalenta klorofosfatnega reagenta ter s kombinacijo 1,5 in 0,1 ekvivalenta dveh aminov, medtem ko so avtorji v literaturi za podobno transformacijo potrebovali kar 5,1 ekvivalentov klorofosfatnega reagenta ter 7,7 ekvivalentov amina.

V zadnjem delu študije razvoja novih metod za pripravo predzdravil fosfatov sem želela preveriti še možnost uporabe pripravljenega reagenta v manj nevarnih in strupenih topilih. Na modelnem sistemu sem preizkusila več topil, katerih ostanki se po predpisih v farmacevtski industriji uvrščajo v tretji, manj nevaren razred. Nato pa sem najoptimalnejše topilo uporabila še pri reakciji alkohola bis(*i*-BOM) s klorofosfatom in tudi v tem primeru dosegla fosforiliranje substrata.

V drugem poglavju z naslovom Sinteza fosforiliranih derivatov pantotenske kisline pa sem se osredotočila na načrtovanje in sintezo različnih novih fosforiliranih derivatov pantotenske kisline s potencialno biološko aktivnostjo. Ker biološko aktivne molekule s prosto fosfatno skupino pogosto ne dosežejo želenega učinka zaradi omejene biološke uporabnosti, nestabilnosti in slabe absorpcije, sem pripravljala derivate z maskiranimi fosfatnimi skupinami. V prvem delu zbranih rezultatov sem predstavila pripravo derivatov fosfopantotenata. Skladno z načrtovano sintezno potjo sem najprej pripravila ustrezen substrat za fosforiliranje, eti-D-pantotenat. V naslednjem koraku pa sem ga fosforilirala z različnimi klorofosfatnimi reagenti. Pri tem sem uporabila reakcijske pogoje, ki sem jih poiskala na modelnem reakcijskem sistemu v prvem poglavju. Za selektivno fosforiliranje primarne hidroksilne skupine izbranega substrata sem pogoje morala še nekoliko dodatno optimizirati. Etil D-pantotenat sem nato uspešno in selektivno fosforilirala najprej z različnimi komercialno dostopnimi klorofosfatnimi reagenti, v nadaljevanju pa še z bis(POM) klorofosfatom ter s svojim novim reagentom bis(*i*-BOM) klorofosfatom. Tako sem uspešno sintetizirala 7 novih derivatov fosfopantotenata, ki so primerni za evalvacijo potencialne biološke aktivnosti bodisi kot potencialna predzdravila fosfopantotenata bodisi kot druge aktivnosti. Poleg tega sem pokazala, da je mogoče na novo pripravljeni klorofosfatni reagent uporabiti tudi za fosforiliranje biološko aktivnih molekul.

V nadaljevanju pa sem predstavila rezultate, ki so bili doseženi v sodelovanju z zunanjimi sodelavci, in sicer na področju priprave novih derivatov fosfopanteteina z maskiranimi fosfatnimi skupinami. Tudi pripravo teh spojin smo začeli s sintezo ustreznega substrata za fosforiliranje. Za ta namen smo si izbrali S-acetilpantetein, ki smo ga uspešno in z visokim izkoristkom sintetizirali v dveh korakih s pomočjo že objavljenih receptur. V nadaljevanju smo poiskali pogoje za selektivno fosforiliranje in pripravljeni S-acetilpantetein selektivno in učinkovito fosforilirali s 3 različnimi komercialno dostopnimi klorofosfatnimi reagenti ter z bis(POM) klorofosfatom. Uspešno smo pripravili 4 nove derivate fosfopanteteina s potencialno biološko aktivnostjo in tako dopolnili seznam znanih spojin z novimi derivati ter z njihovimi spektroskopskimi podatki. Ker so se mi ti zdeli še posebno zanimivi, sem za konec poskusila izbran derivat še dodatno okarakterizirati in asignirati njegove signale v ^{1}H in ^{13}C NMR spektrih s pomočjo sodobnih NMR pristopov.

Tekom svojih raziskav, katerih del je objavljen v doktorski disertaciji, sem hipotezo, ki sem jo postavila na začetku dela, dobro preverila. Dokazala sem, da je uporaba klorofosfatnih reagentov najprimernejši način za pripravo fosforiliranih derivatov pantotenske kisline. Dosegla sem učinkovito in selektivno fosforiliranje izbranih substratov pod ekonomičnimi in milimi reakcijskimi pogoji, ki so primerni tudi za fosforiliranje biološko aktivnih molekul. Pripravljene nove derivate pantotenske kisline sem uspešno izolirala, očistila ter okarakterizirala z ustreznimi analitskimi metodami. Uspela sem izolirati in okarakterizirati tudi večino stranskih produktov reakcij, ki niso potekale selektivno, s čimer sem še dodatno prispevala k še vedno pomanjkljivemu znanju s področja fosforiliranja pantotenske kisline in njenih derivatov.

Preverila in ovrednotila sem tudi drugi del postavljene hipoteze, da je mogoče metodo priprave bis(POM) klorofosfatnega reagenta razširiti in uporabiti za pripravo reagentov z

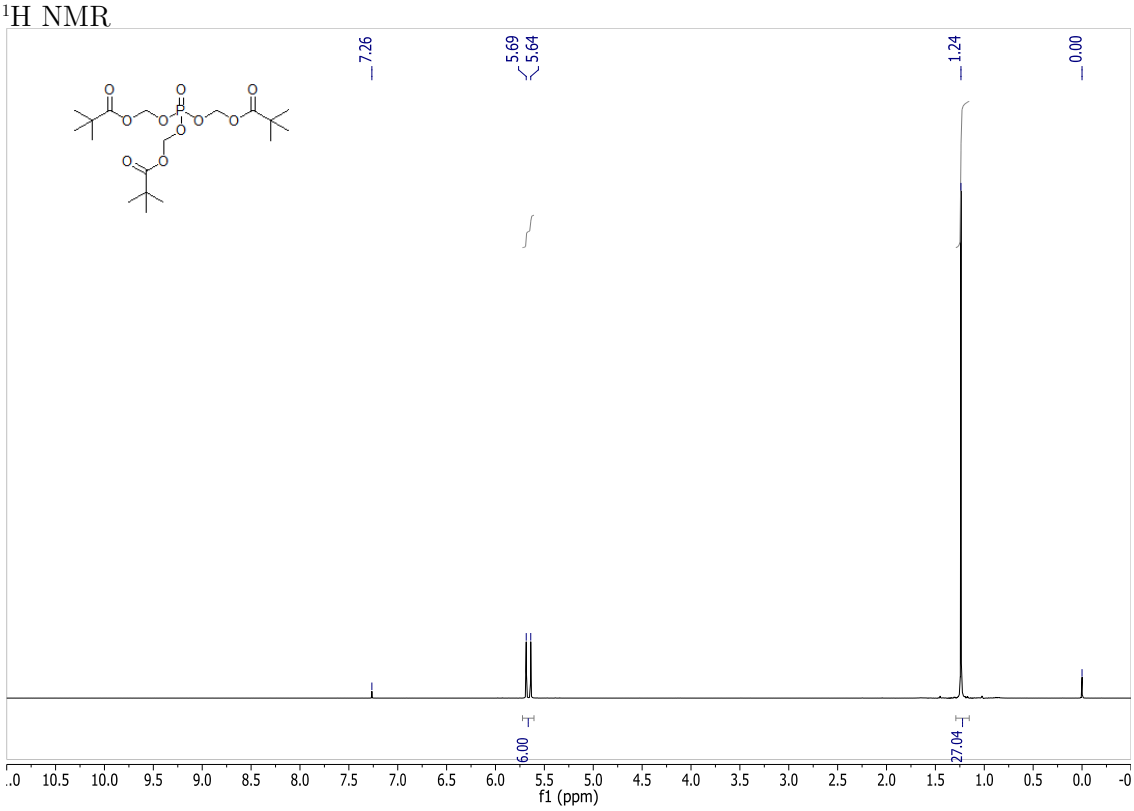
drugimi aciloksialkilnimi skupinami, in pripravila nov reagent, ki omogoča pripravo predzdravil fosfatov z *i*-BOM skupinami.

Dodatek

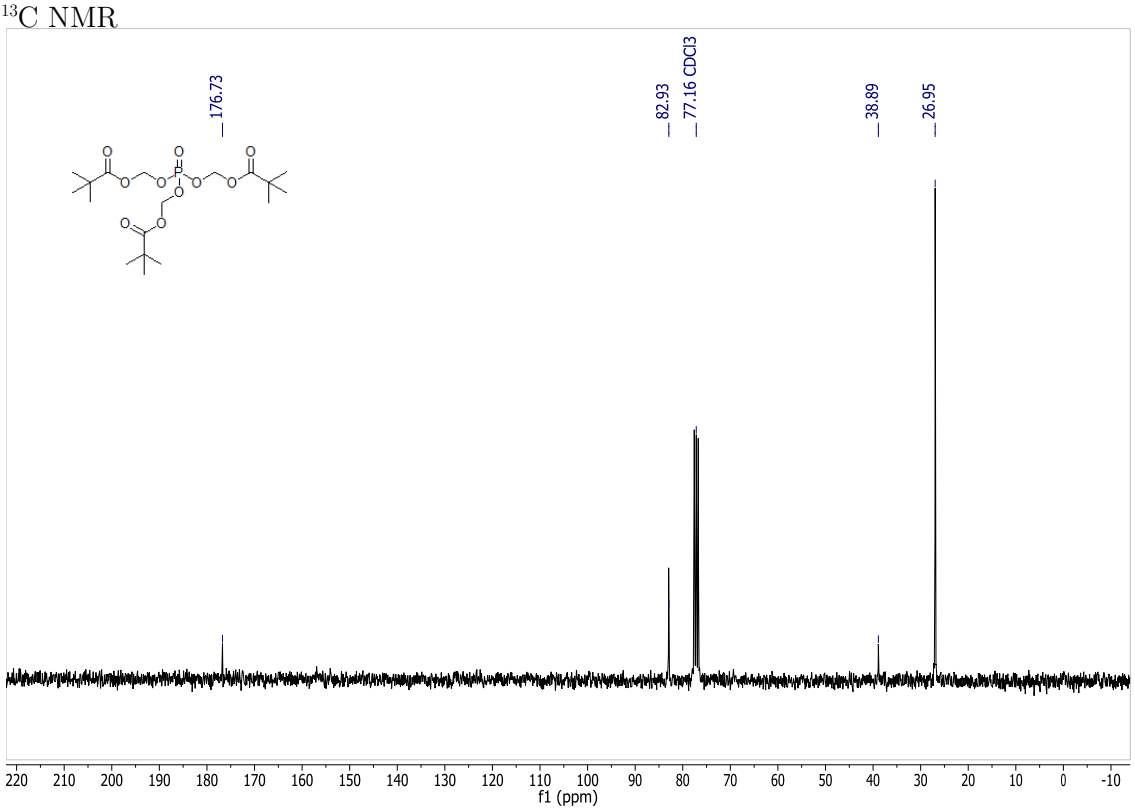
^{1}H, ^{13}C in ^{31}P NMR spektri spojin

Tris(pivaloiloksimetil) fosfat (2a)

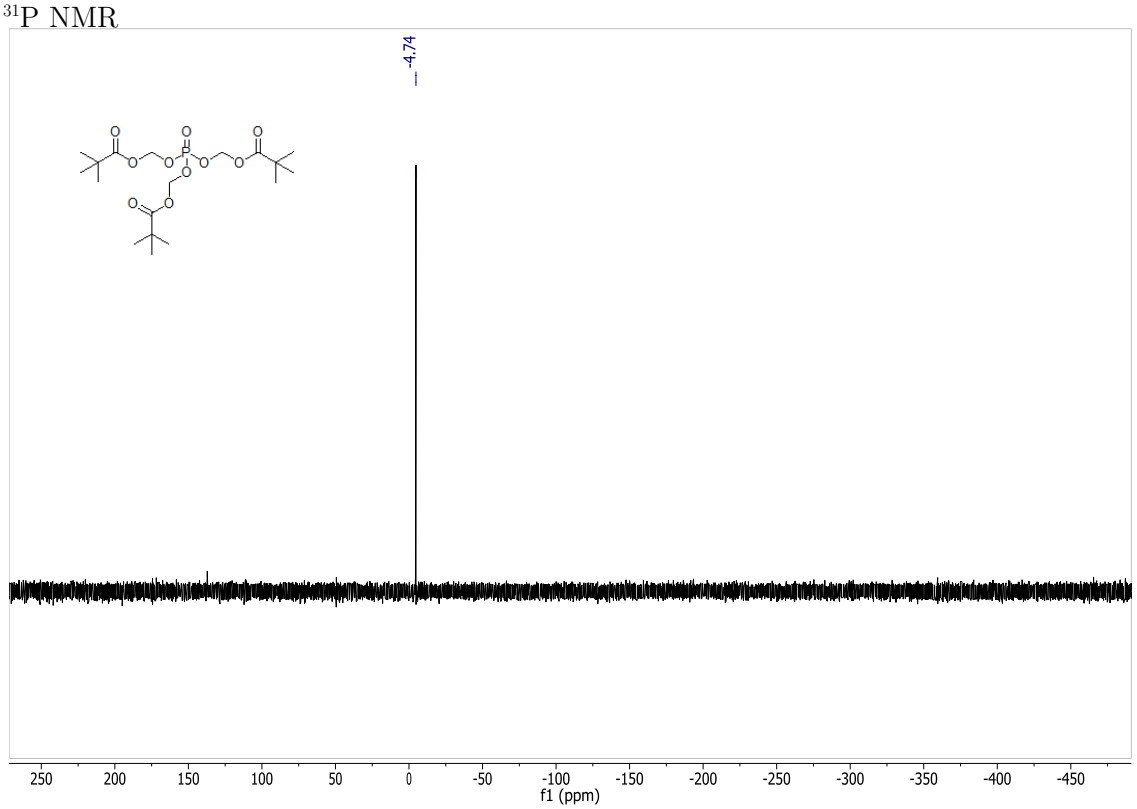
^{1}H NMR



^{13}C NMR

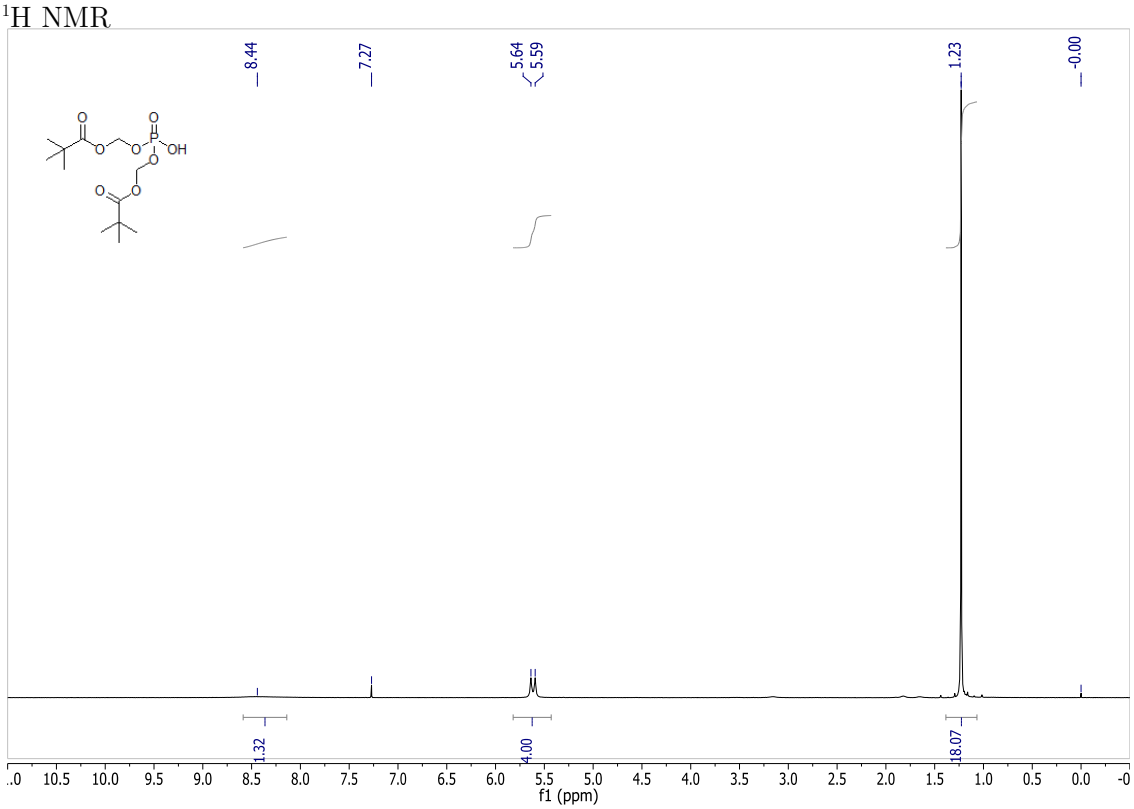


^{31}P NMR

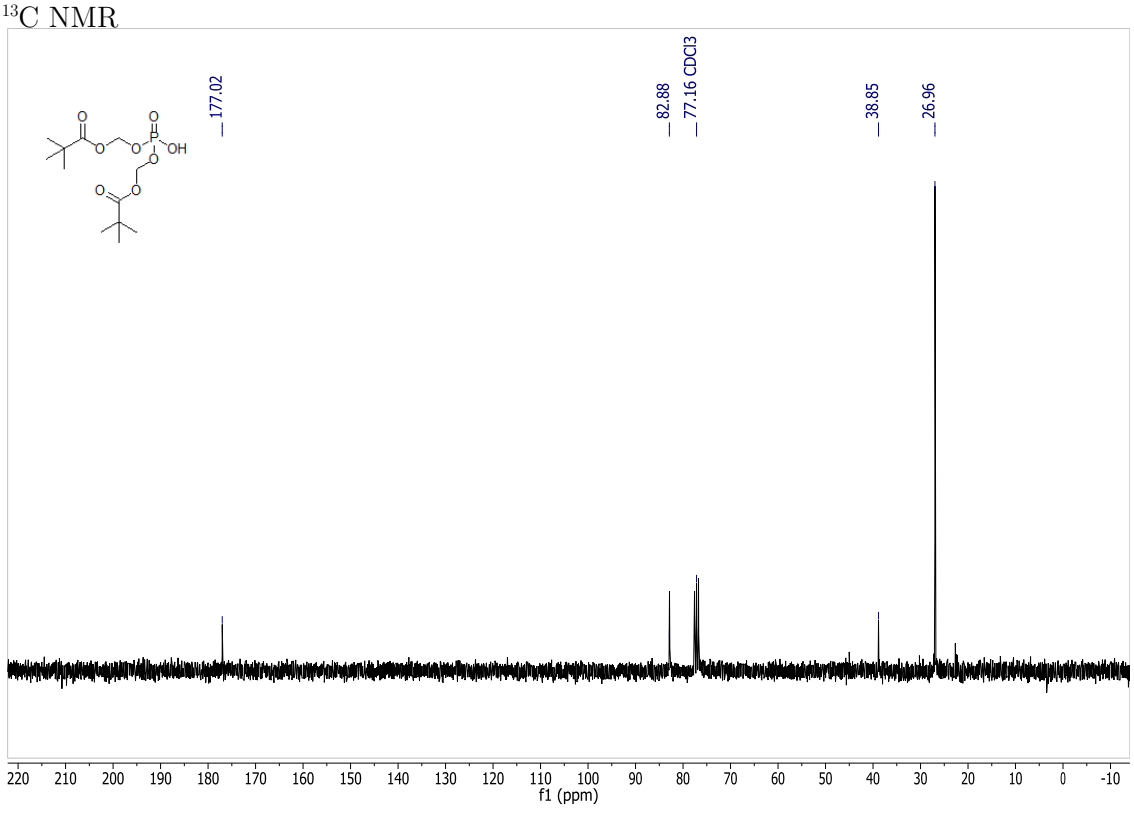


Bis(pivaloiloksimetil) hidrogen fosfat (3a)

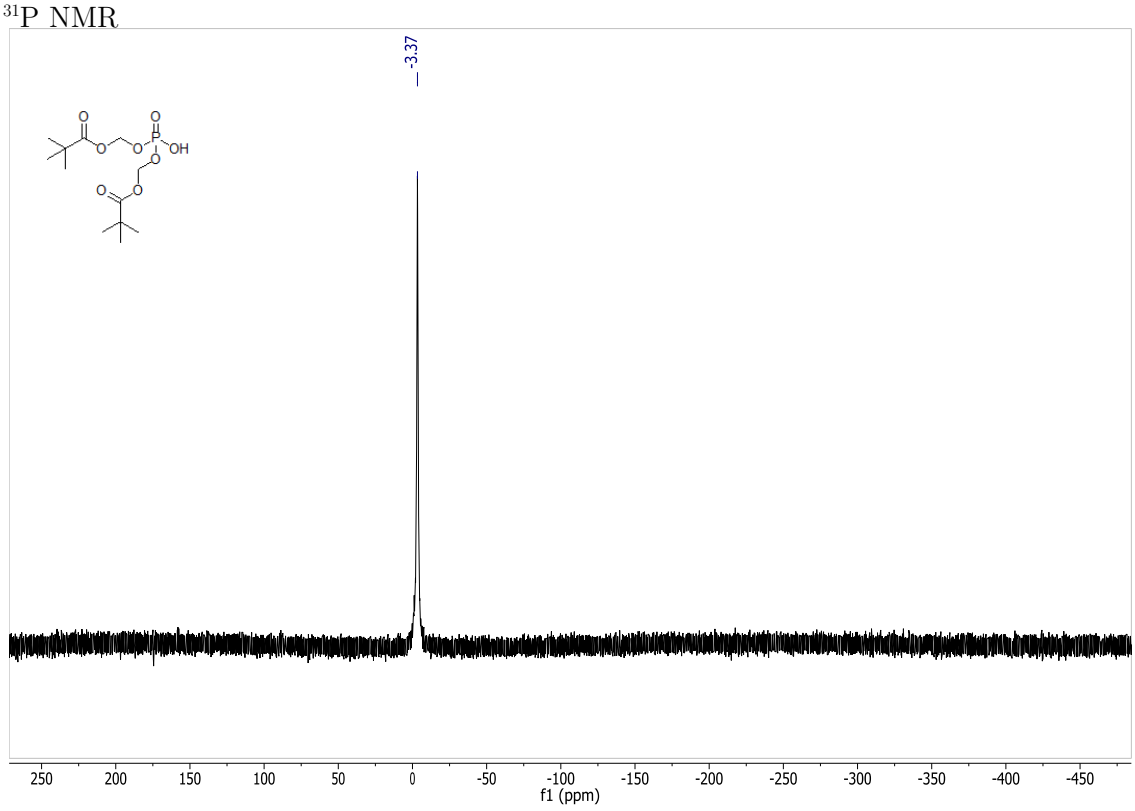
^{1}H NMR



^{13}C NMR

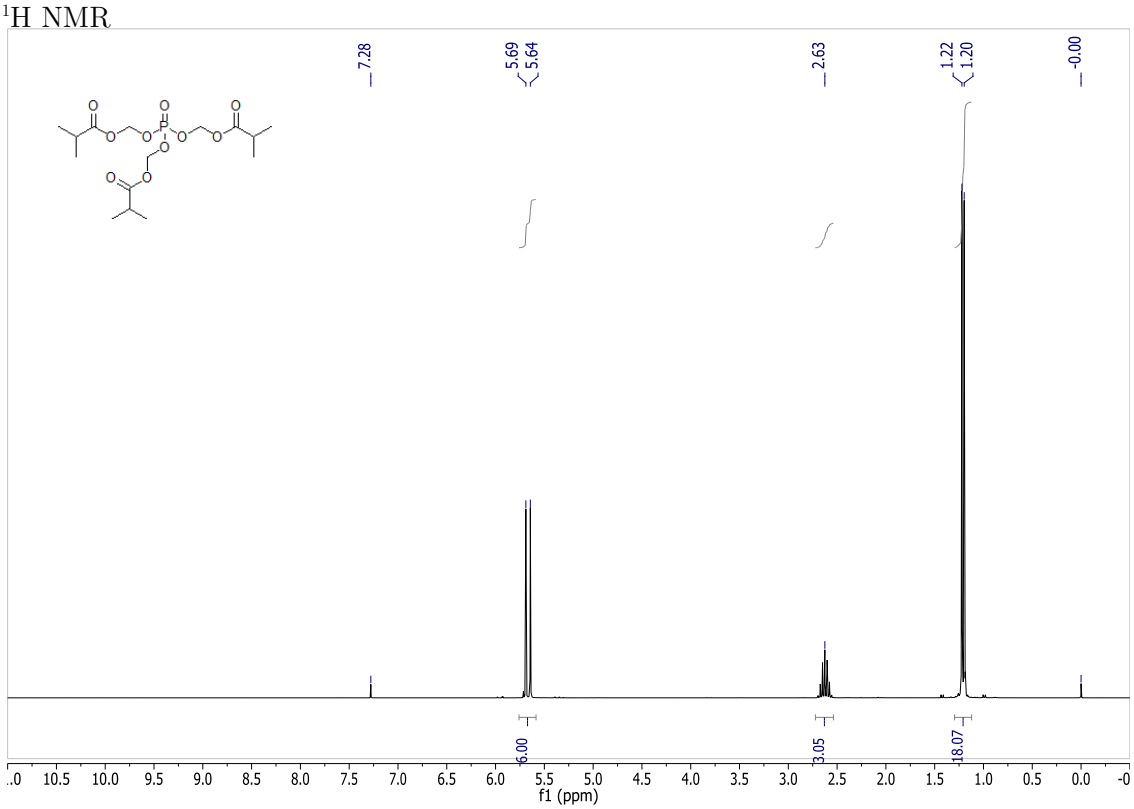


^{31}P NMR

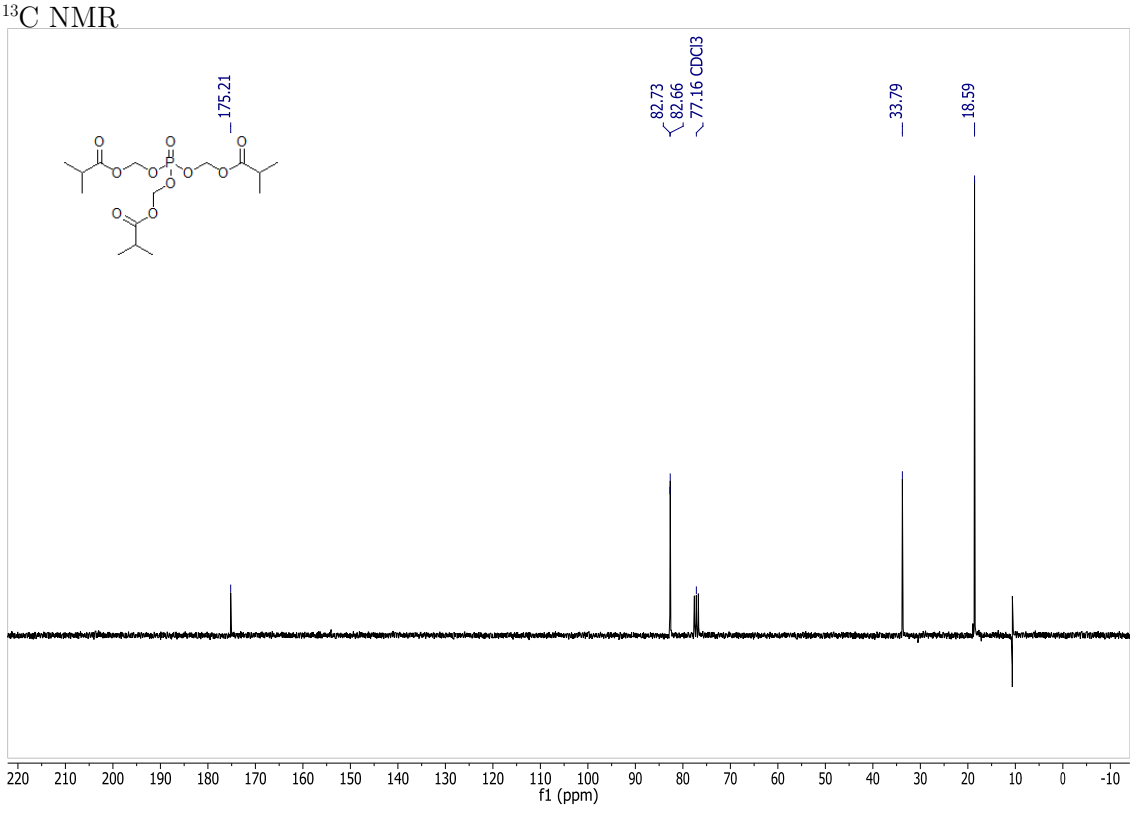


Tris(izobutiriloksimetil) fosfat (2b)

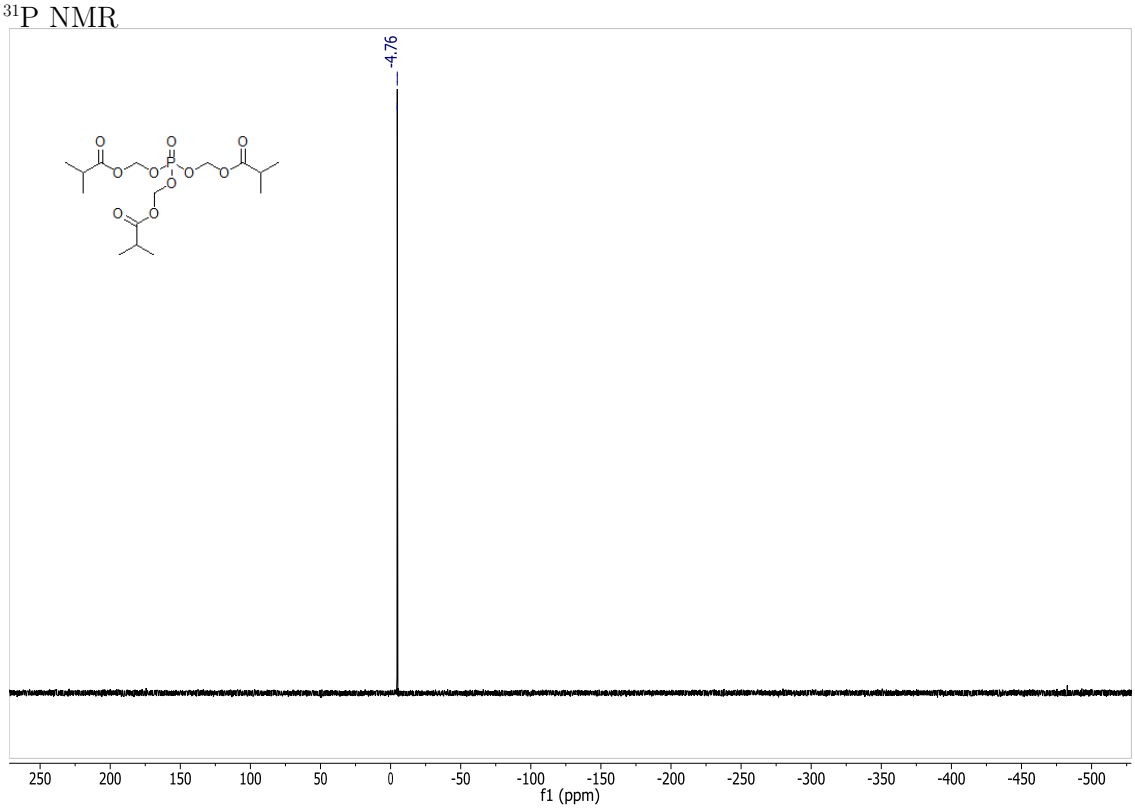
^{1}H NMR



^{13}C NMR

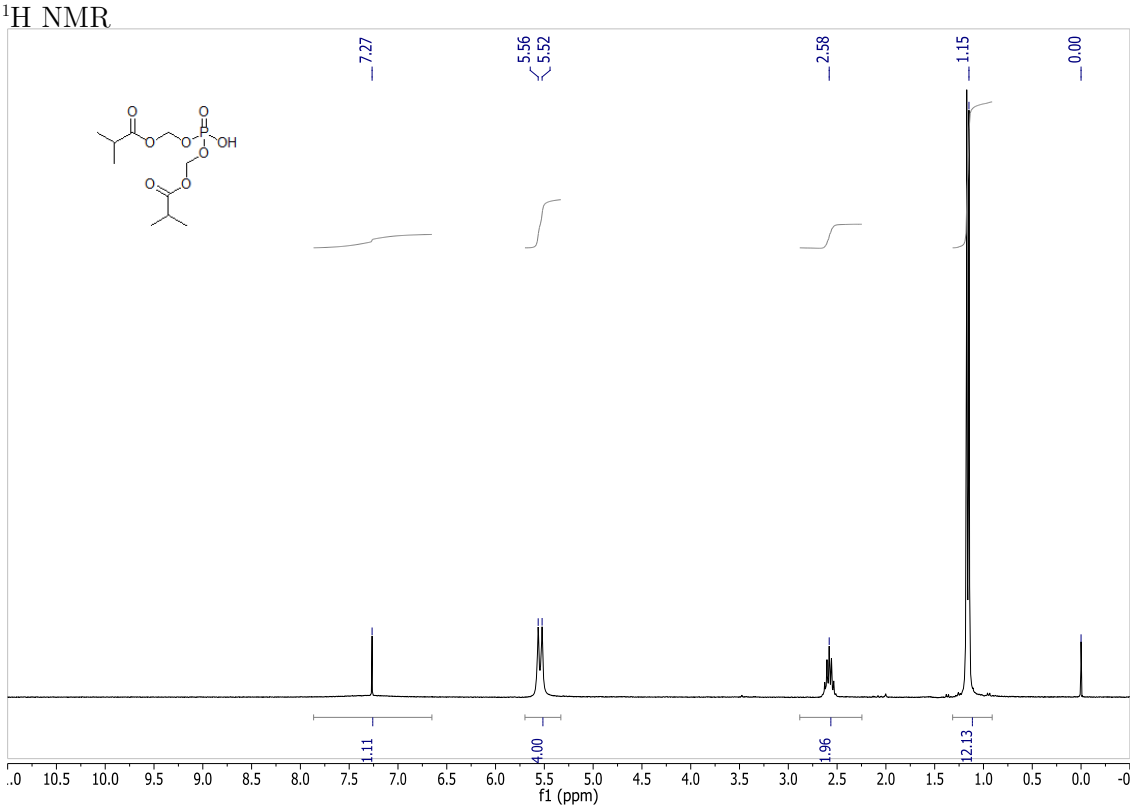


^{31}P NMR

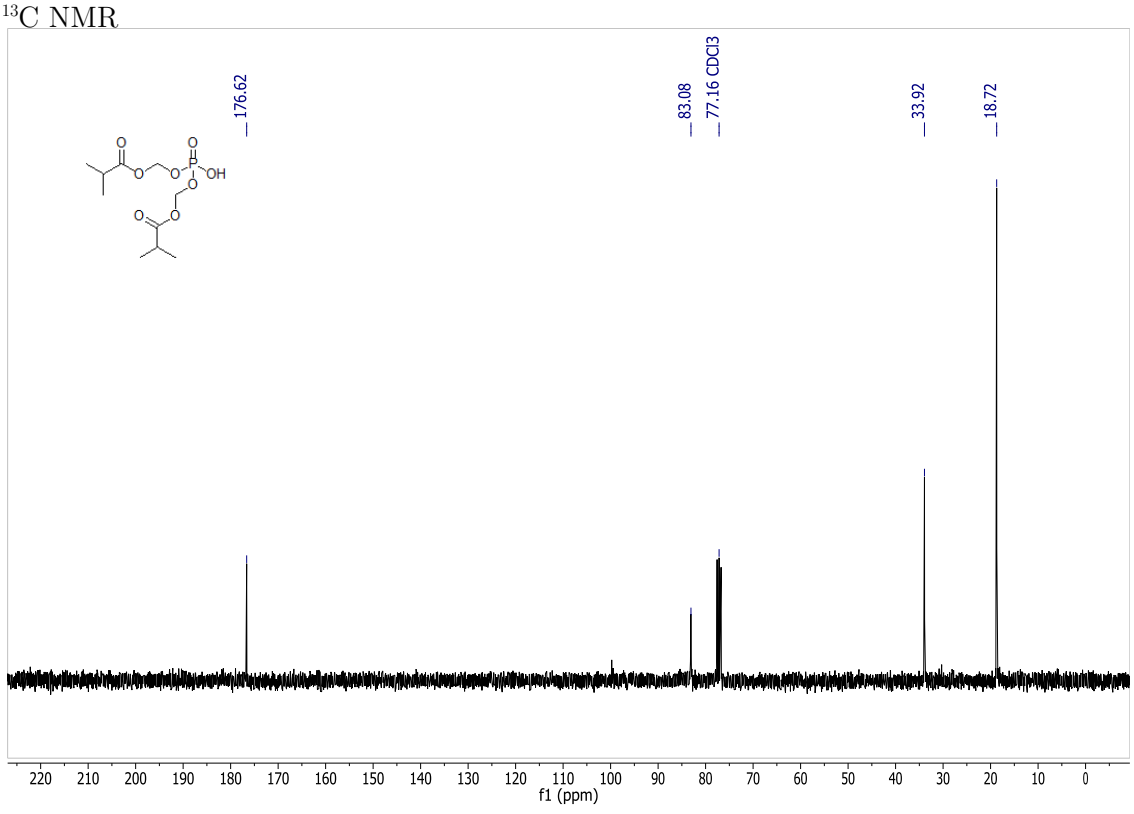

-4.76
250
200
150
100
50
0
-50
-100
-150
-200
-250
-300
-350
-400
-450
-500
f1 (ppm)

Bis(izobutiriloksimetil) hidrogen fosfat (3b)

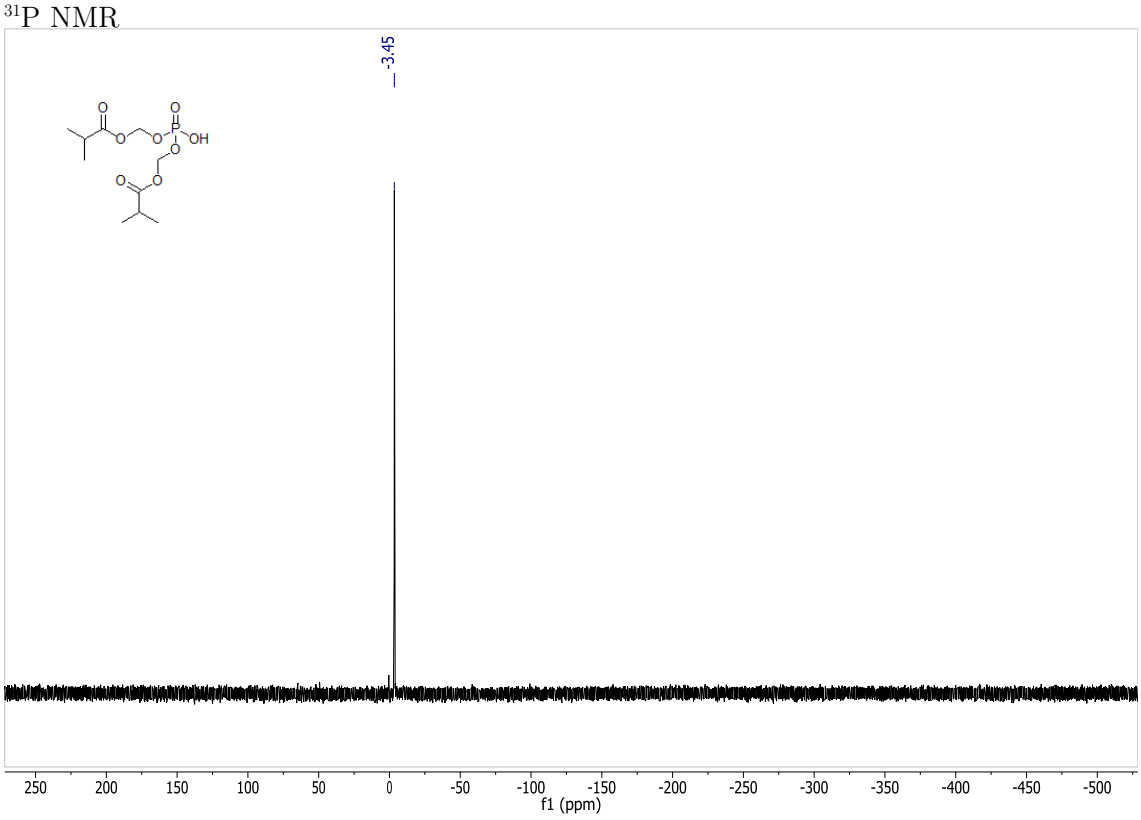
^{1}H NMR



^{13}C NMR

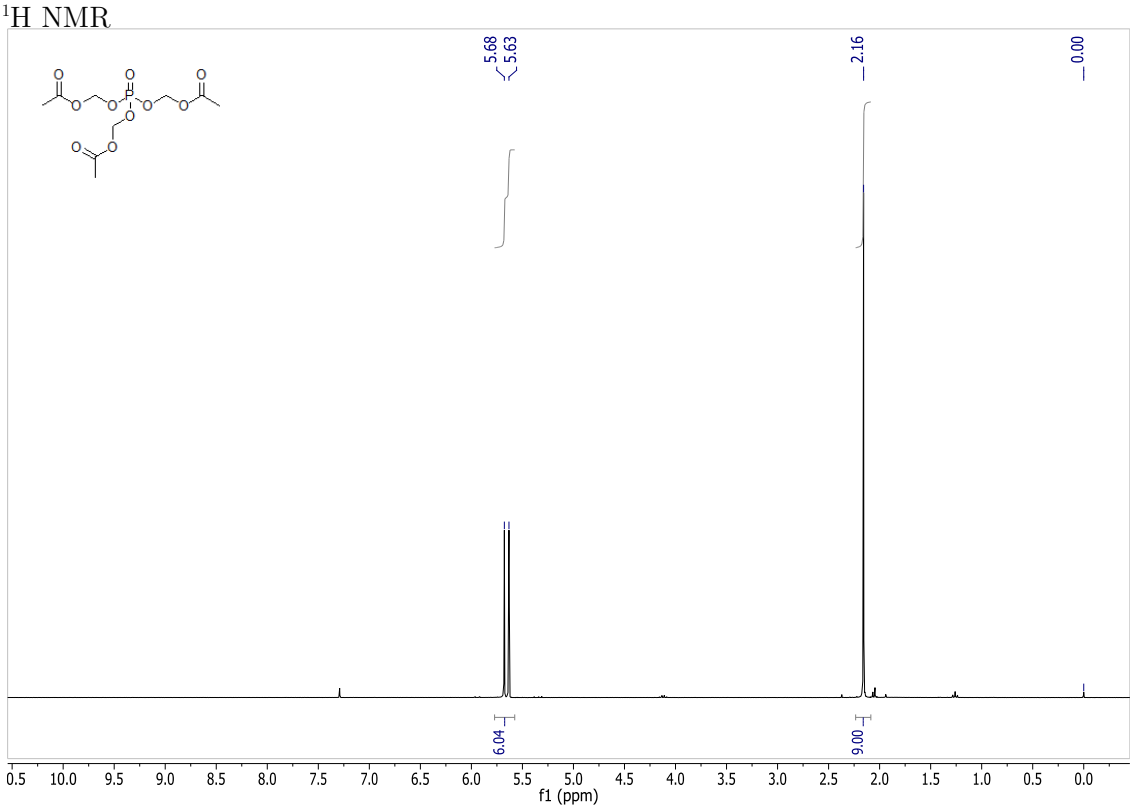


^{31}P NMR

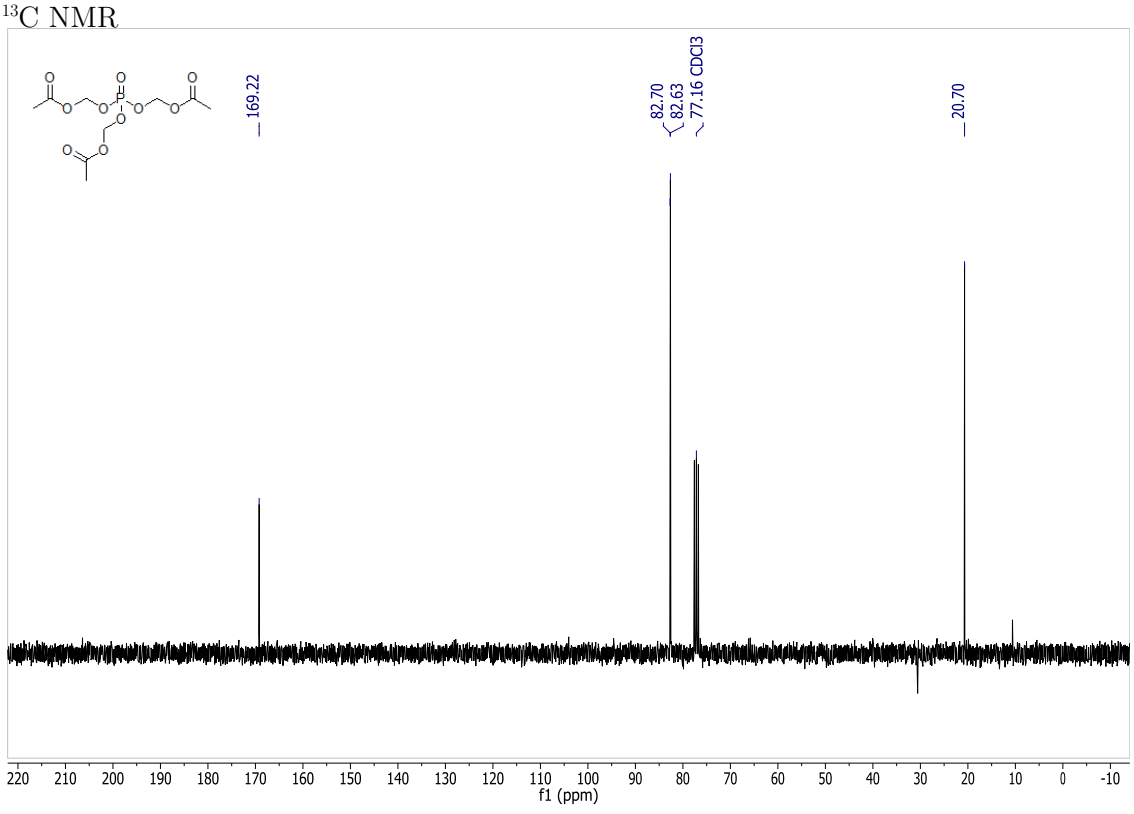

-3.45
250
200
150
100
50
0
-50
-100
-150
-200
-250
-300
-350
-400
-450
-500
f1 (ppm)

Tris(acetiloksimetil) fosfat (2c)

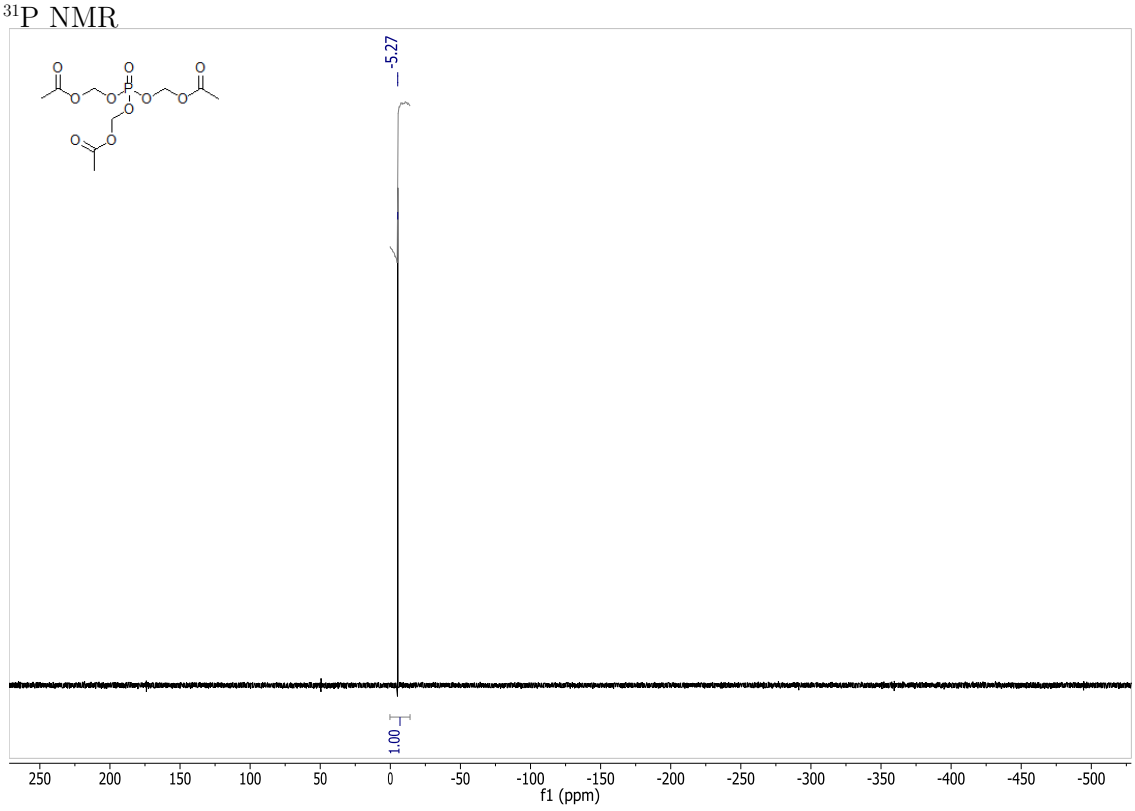
^{1}H NMR



^{13}C NMR

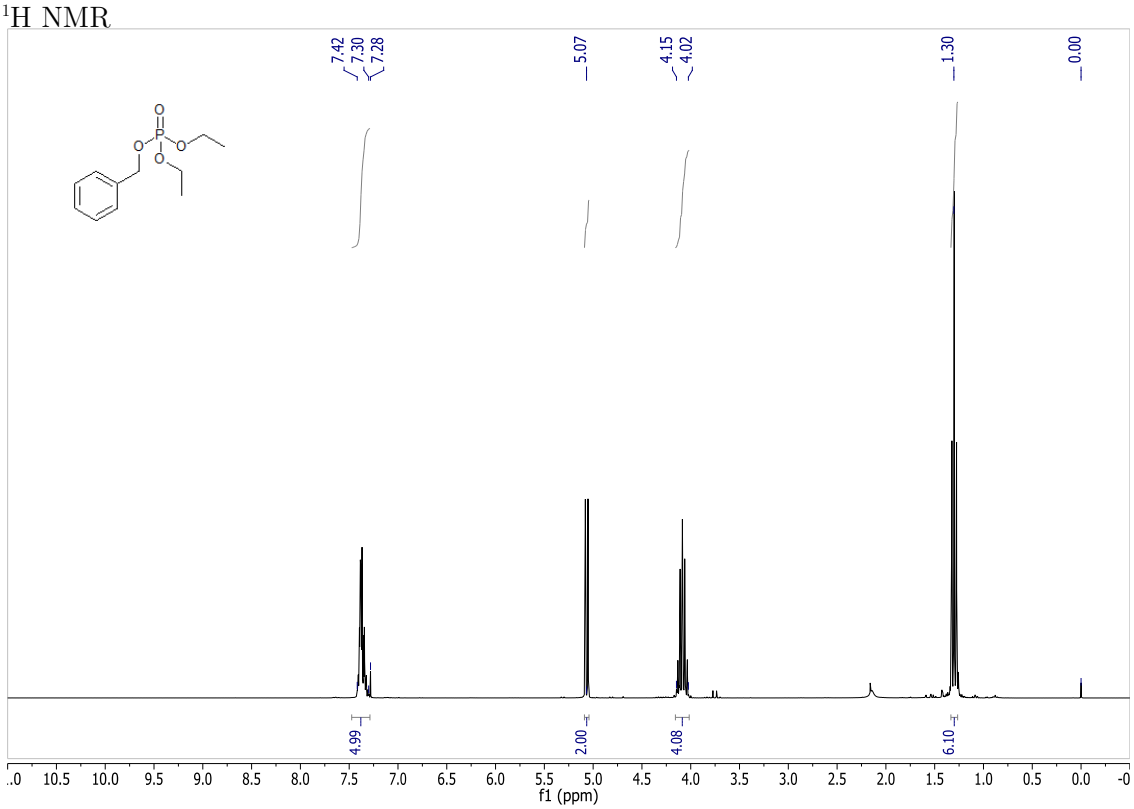


^{31}P NMR

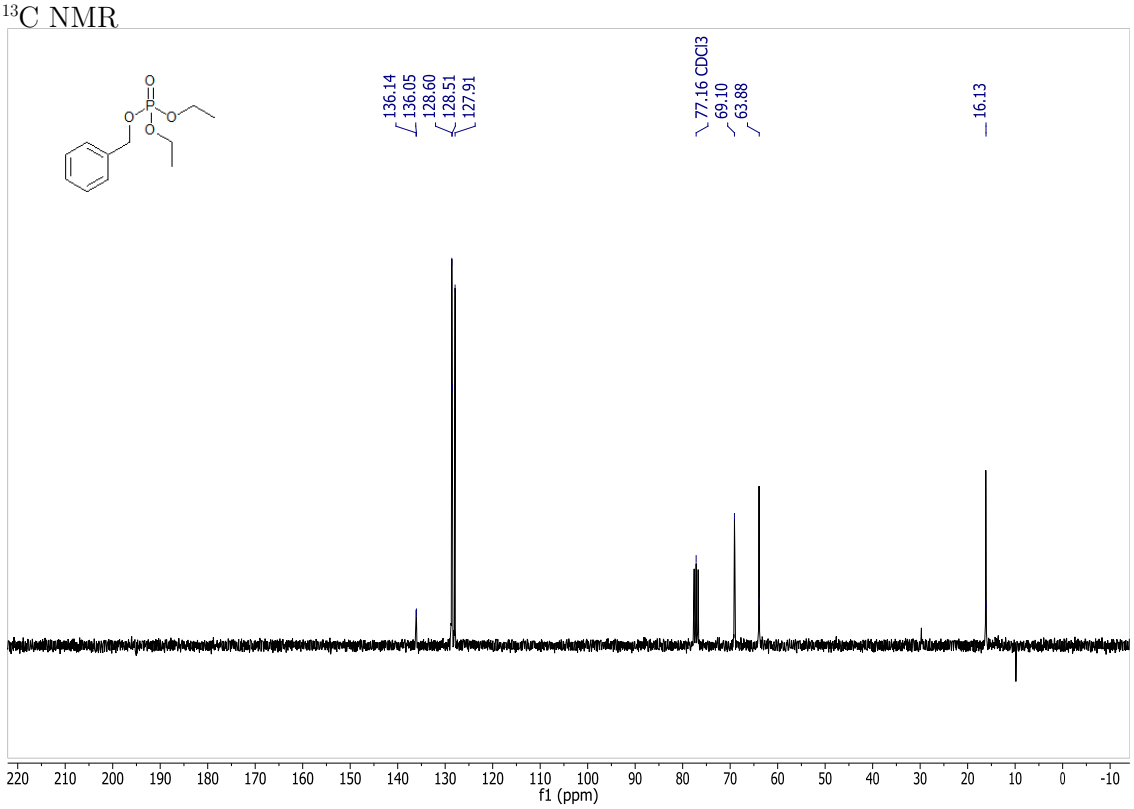

-5.27
1.00
250
200
150
100
50
0
-50
-100
-150
-200
-250
-300
-350
-400
-450
-500
f1 (ppm)

Dietil benzil fosfat (8)

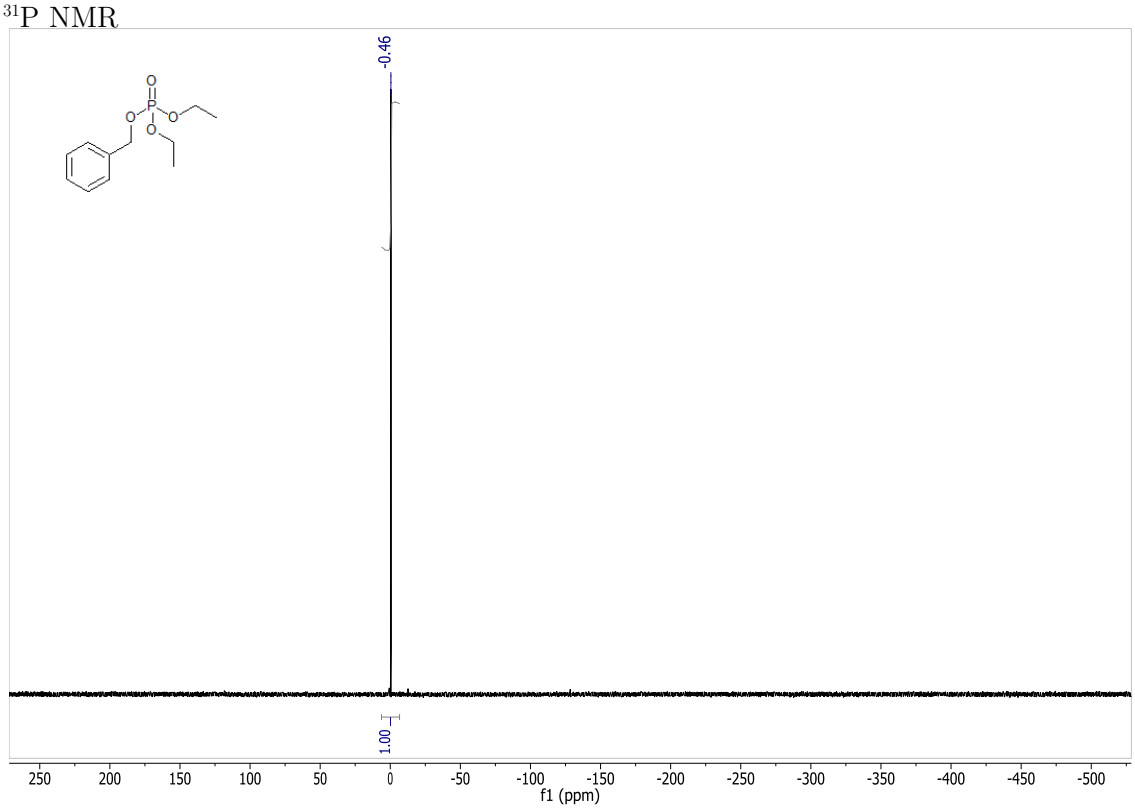
^{1}H NMR



^{13}C NMR

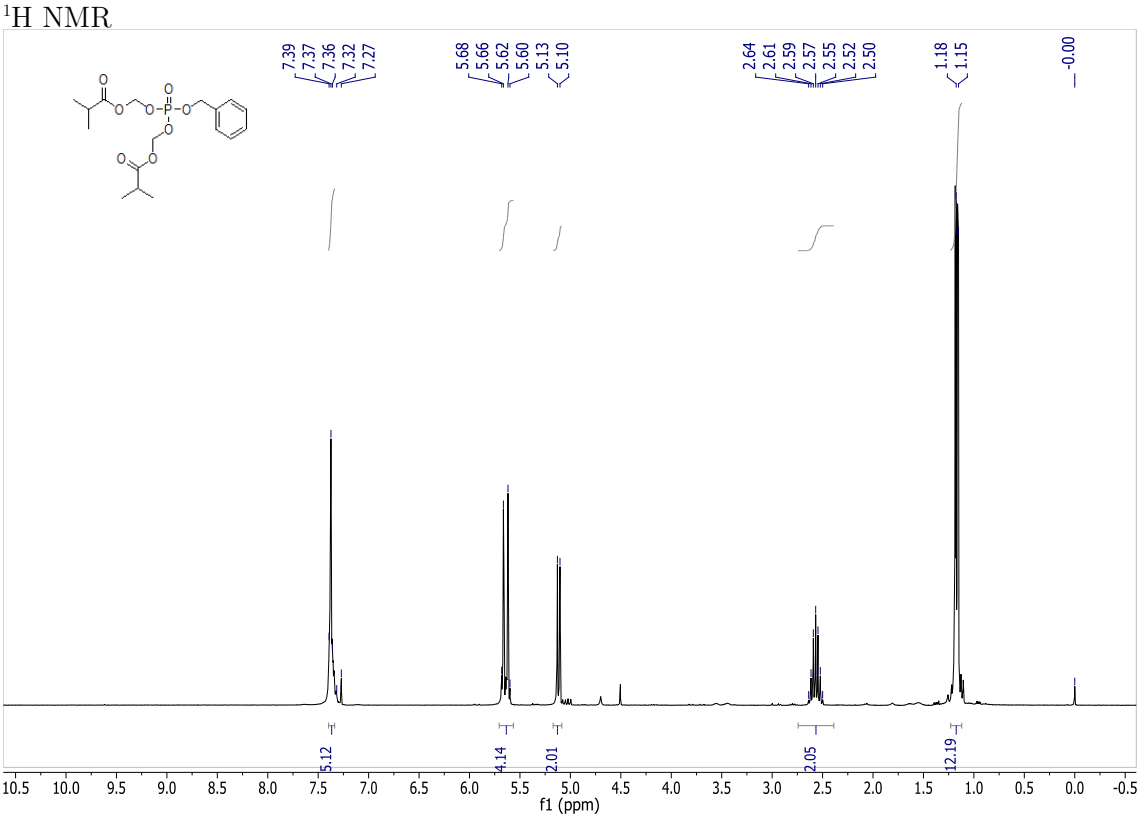


^{31}P NMR

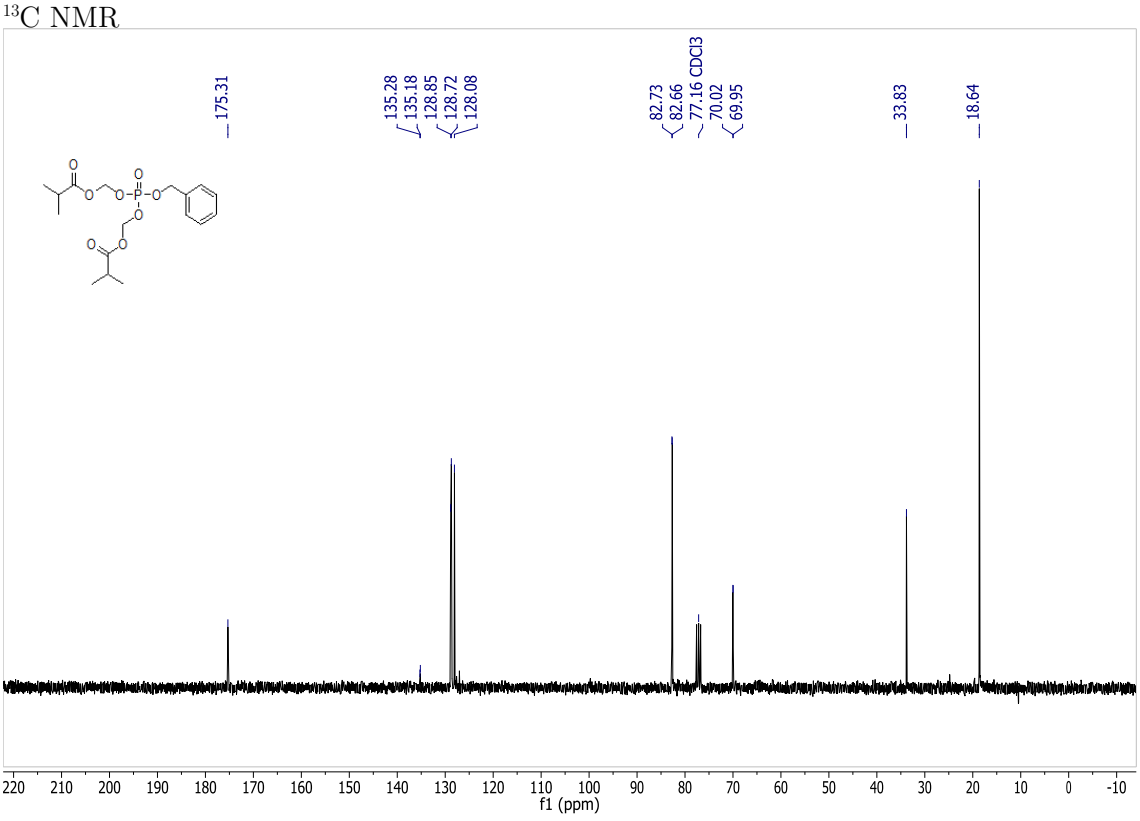

-0.46
1.00
250
200
150
100
50
0
-50
-100
-150
-200
-250
-300
-350
-400
-450
-500
f1 (ppm)

Bis(izobutiriloksimetil) benzil fosfat (6a)

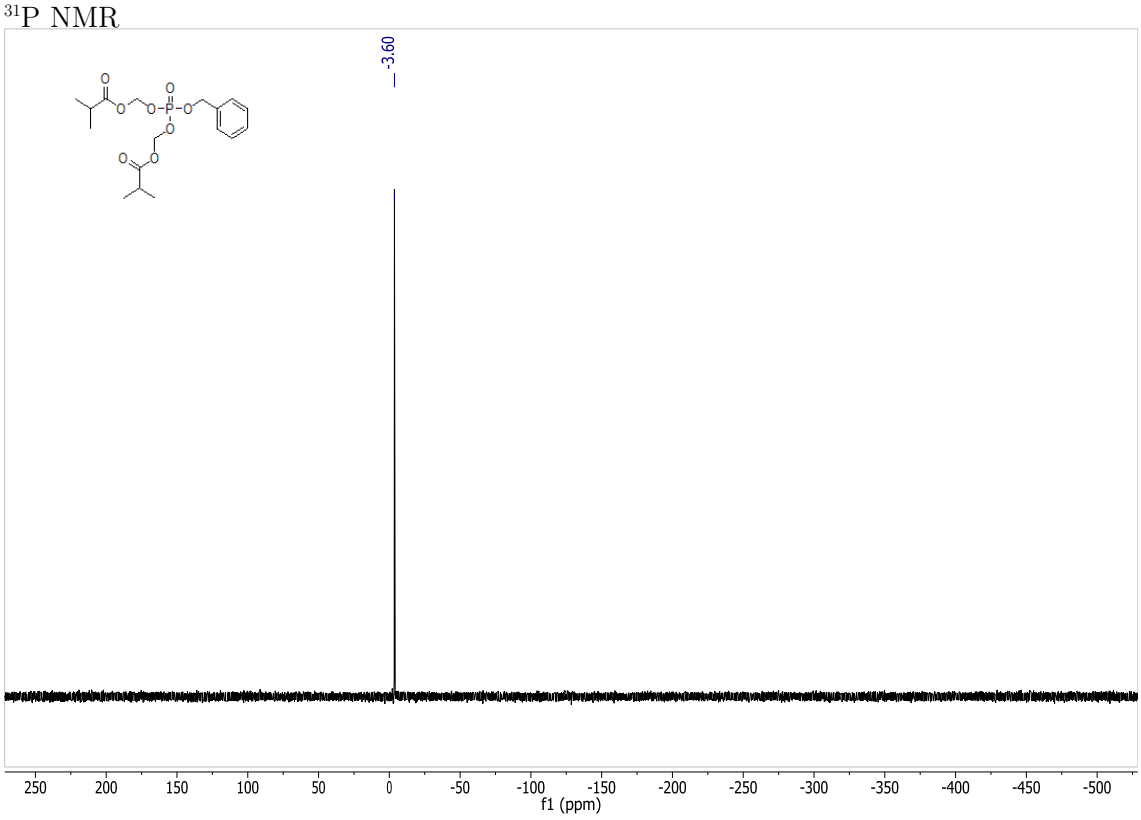
^{1}H NMR



^{13}C NMR

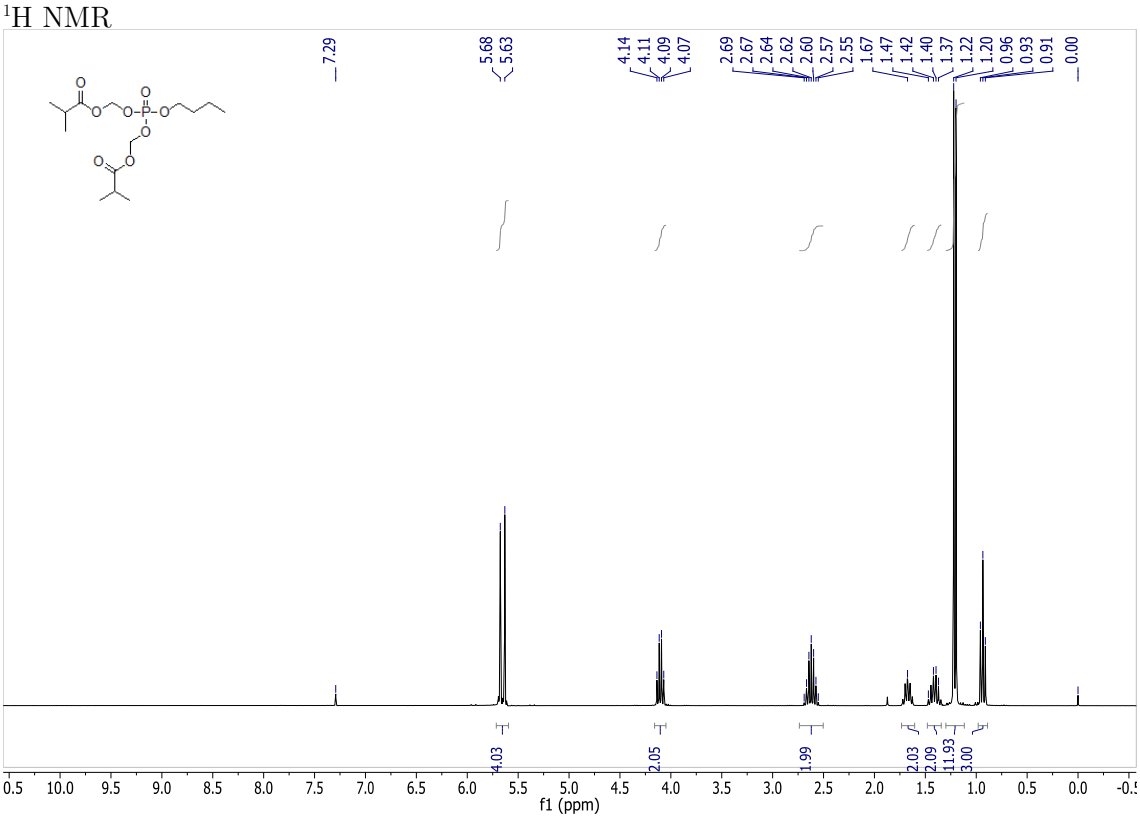


^{31}P NMR

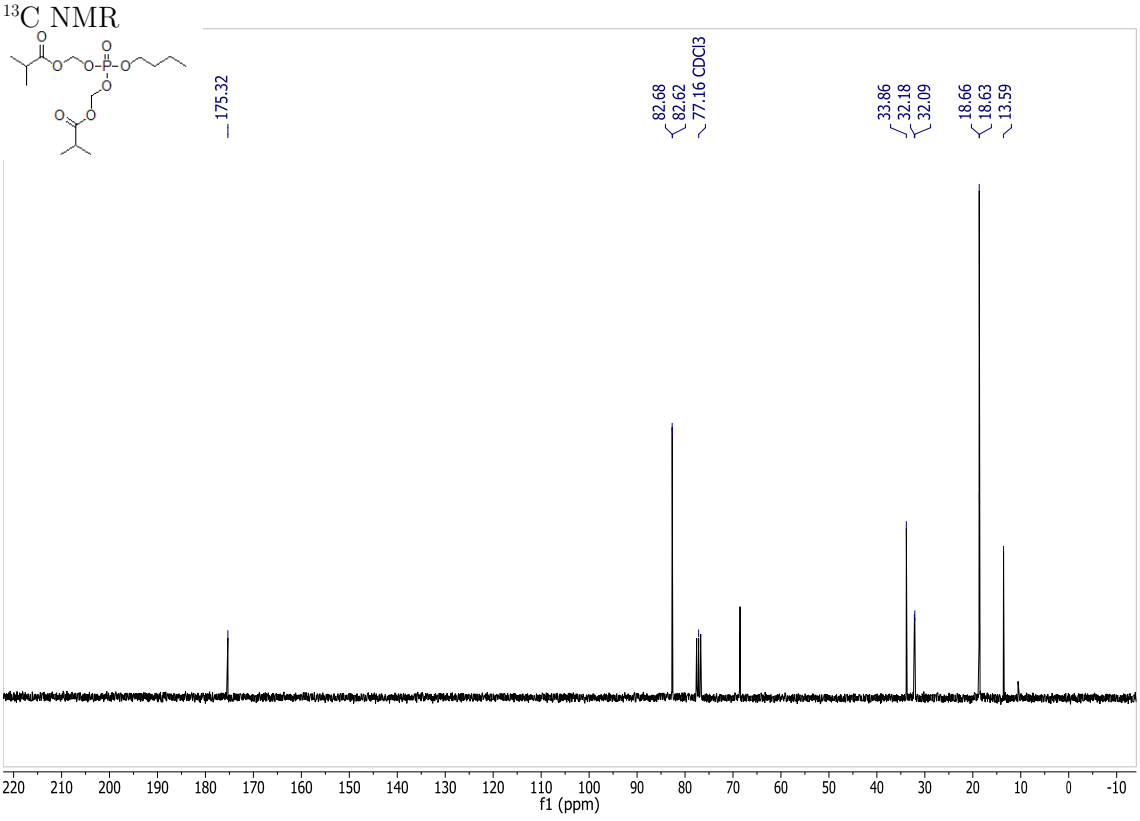

-3.60
250
200
150
100
50
0
-50
-100
-150
-200
-250
-300
-350
-400
-450
-500
f1 (ppm)

Bis(izobutiriloksimetil) butil fosfat (6b)

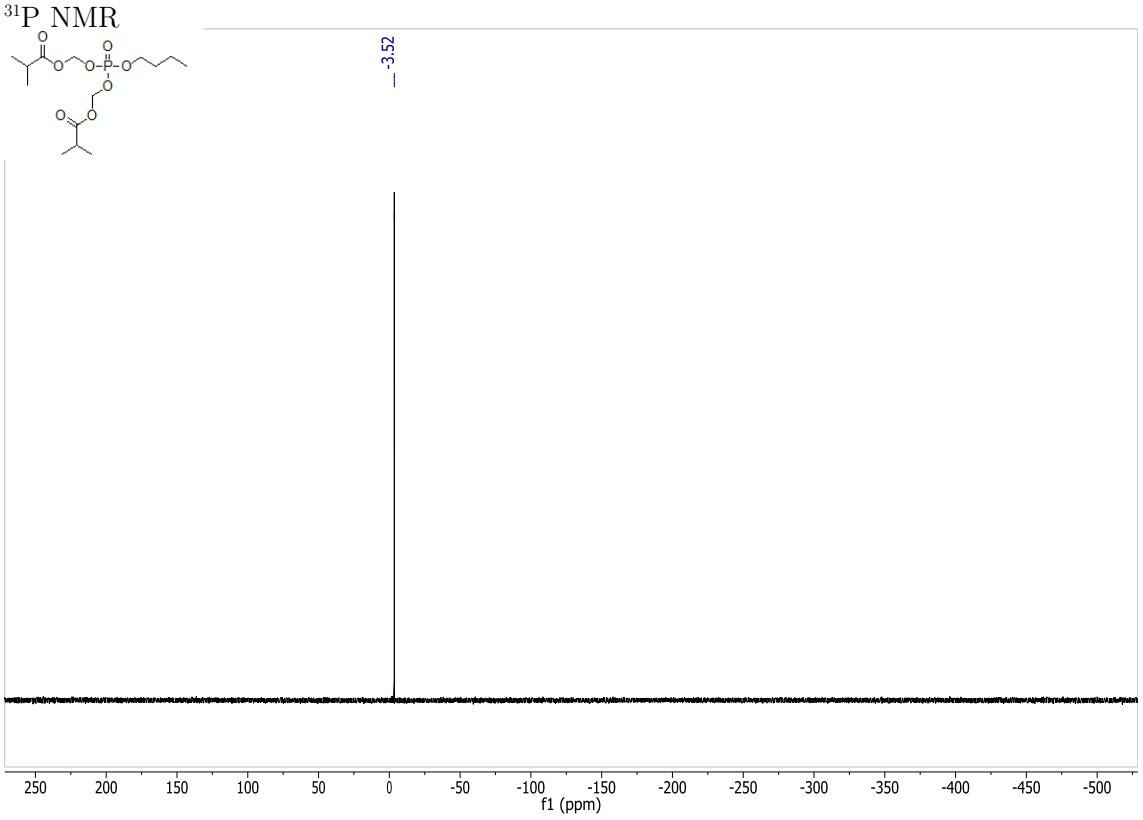
^{1}H NMR



^{13}C NMR

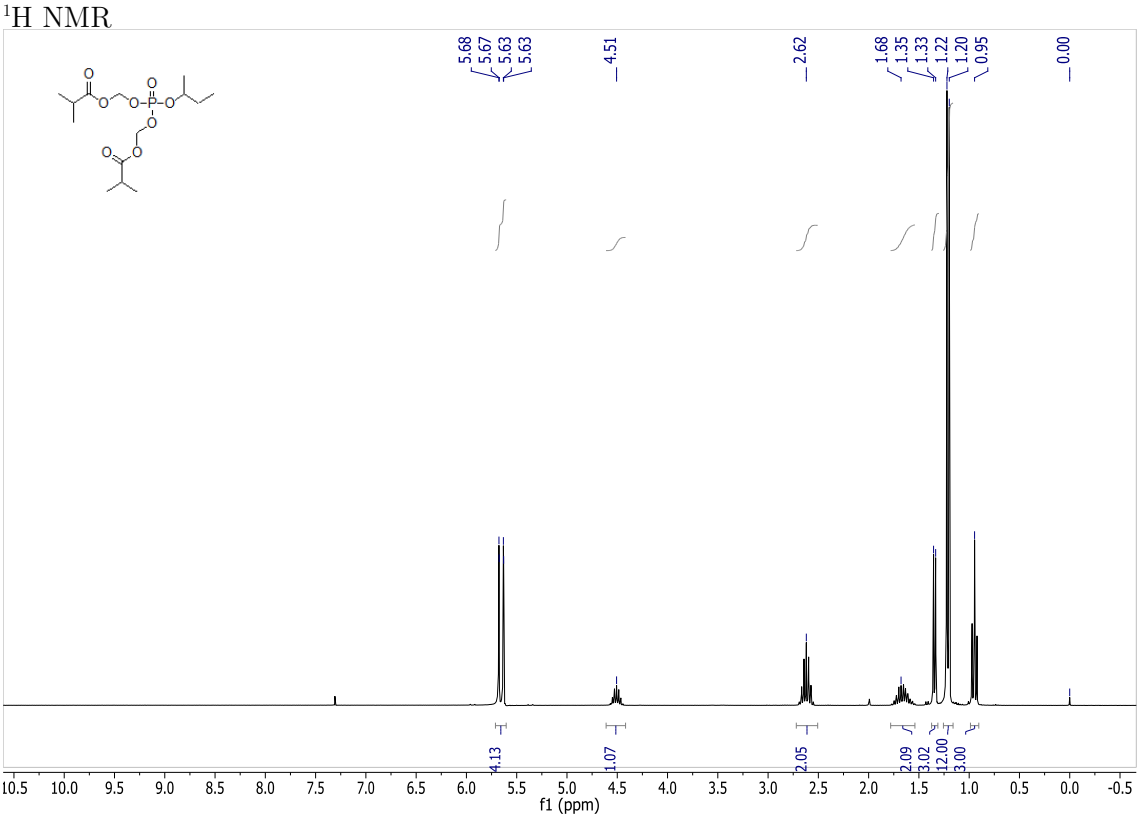


^{31}P NMR

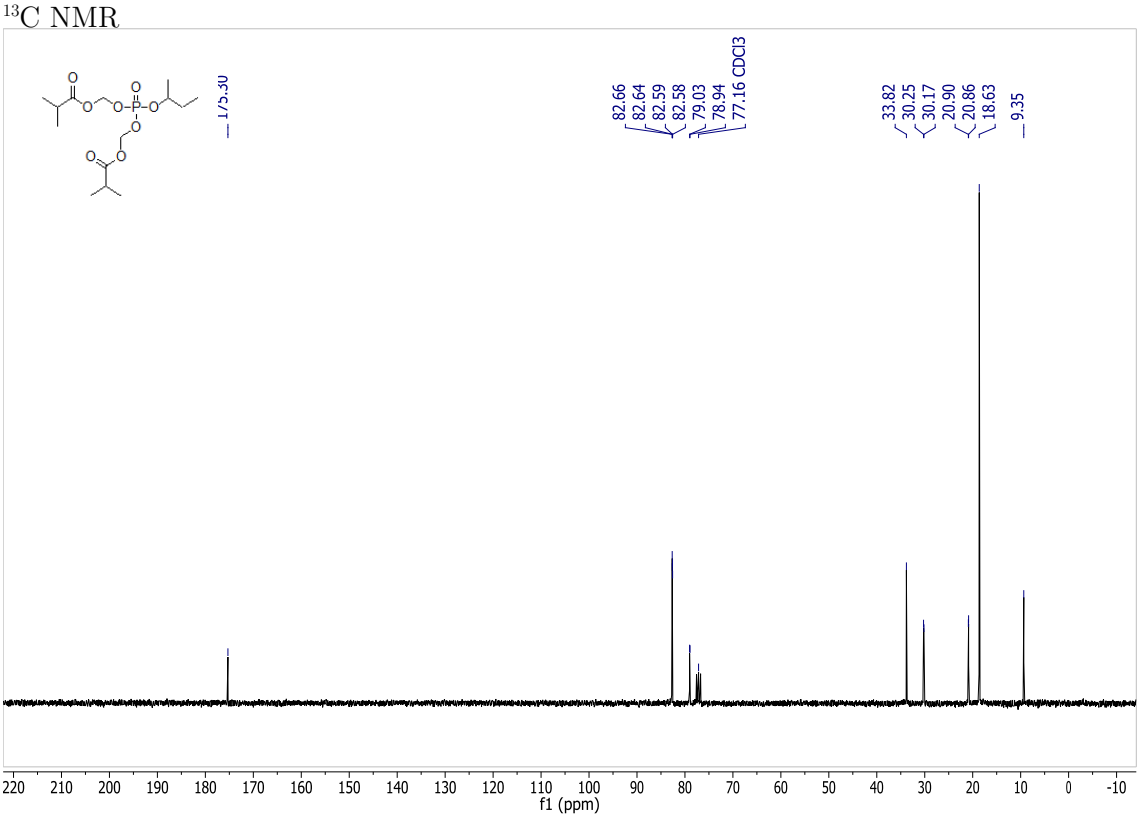

-3.52
250
200
150
100
50
0
-50
-100
-150
-200
-250
-300
-350
-400
-450
-500
f1 (ppm)

Bis(izobutiriloksimetil) 2-metilpropil fosfat (6c)

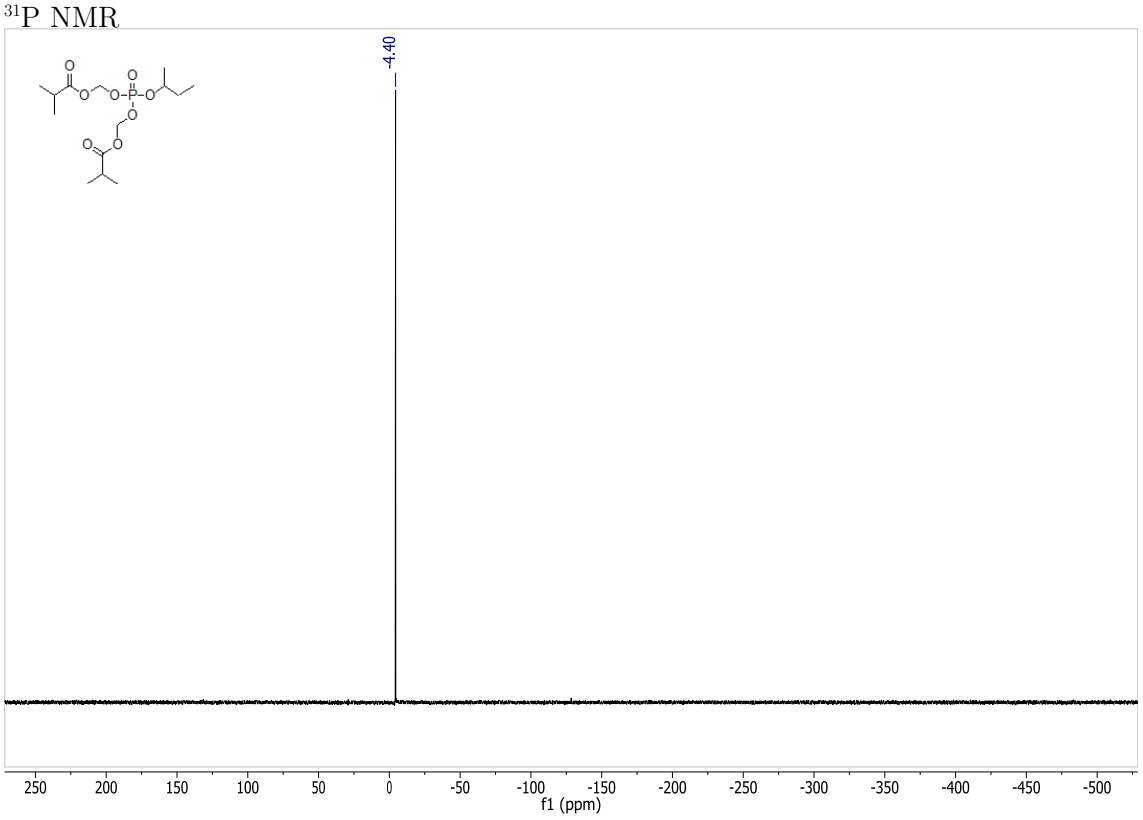
^{1}H NMR



^{13}C NMR

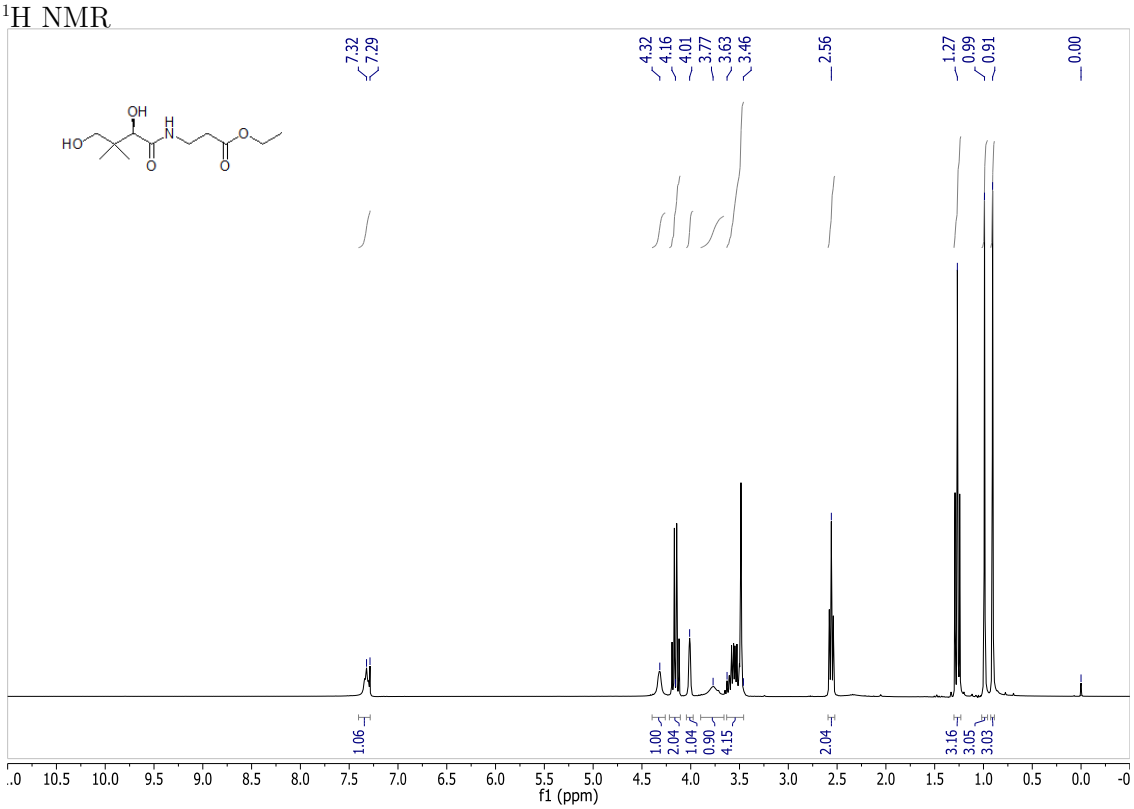


^{31}P NMR

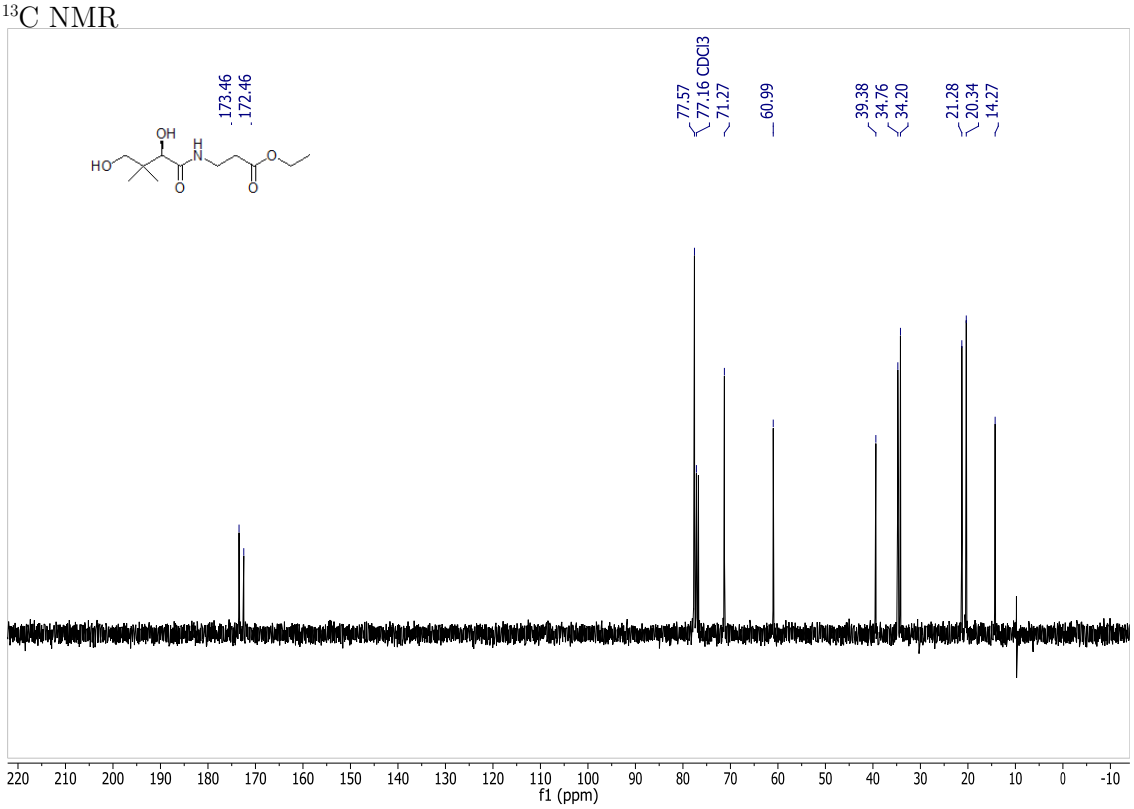

-4.40
250
200
150
100
50
0
-50
-100
-150
-200
-250
-300
-350
-400
-450
-500
f1 (ppm)

(R)-etil 3-(2,4-dihidroksi-3,3-dimetilbutanamido)propanoat (10)

^{1}H NMR

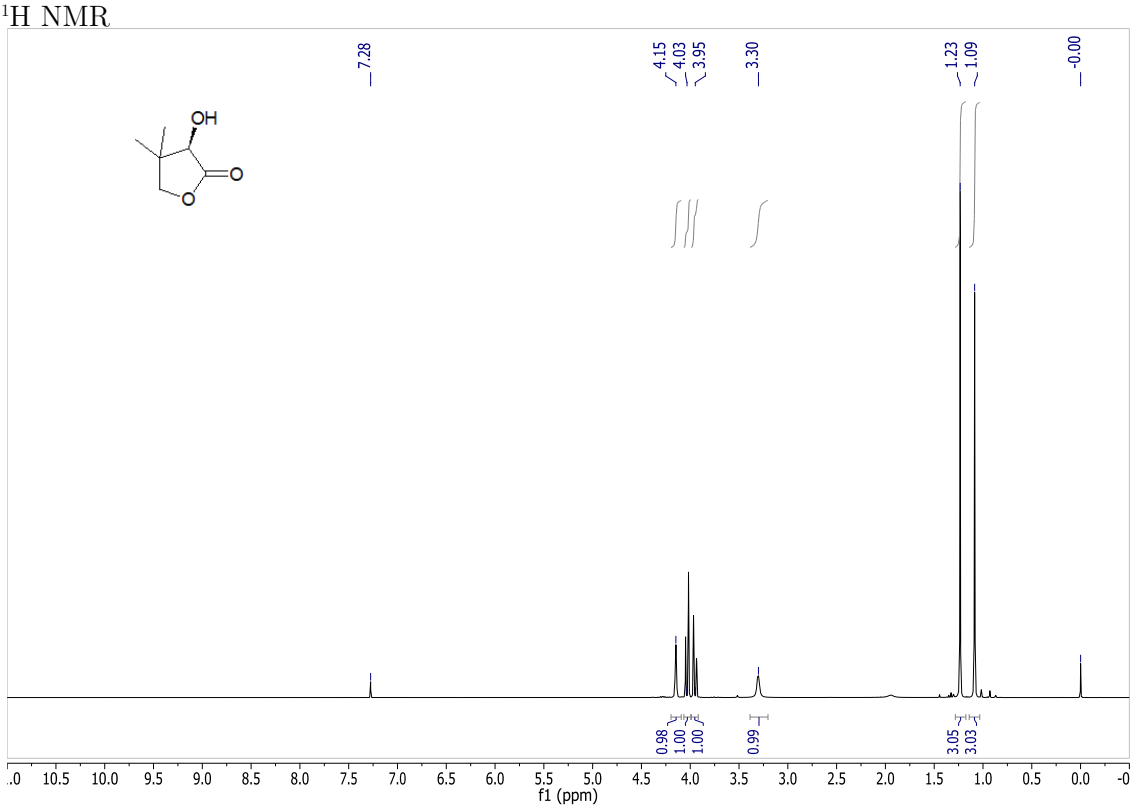


^{13}C NMR

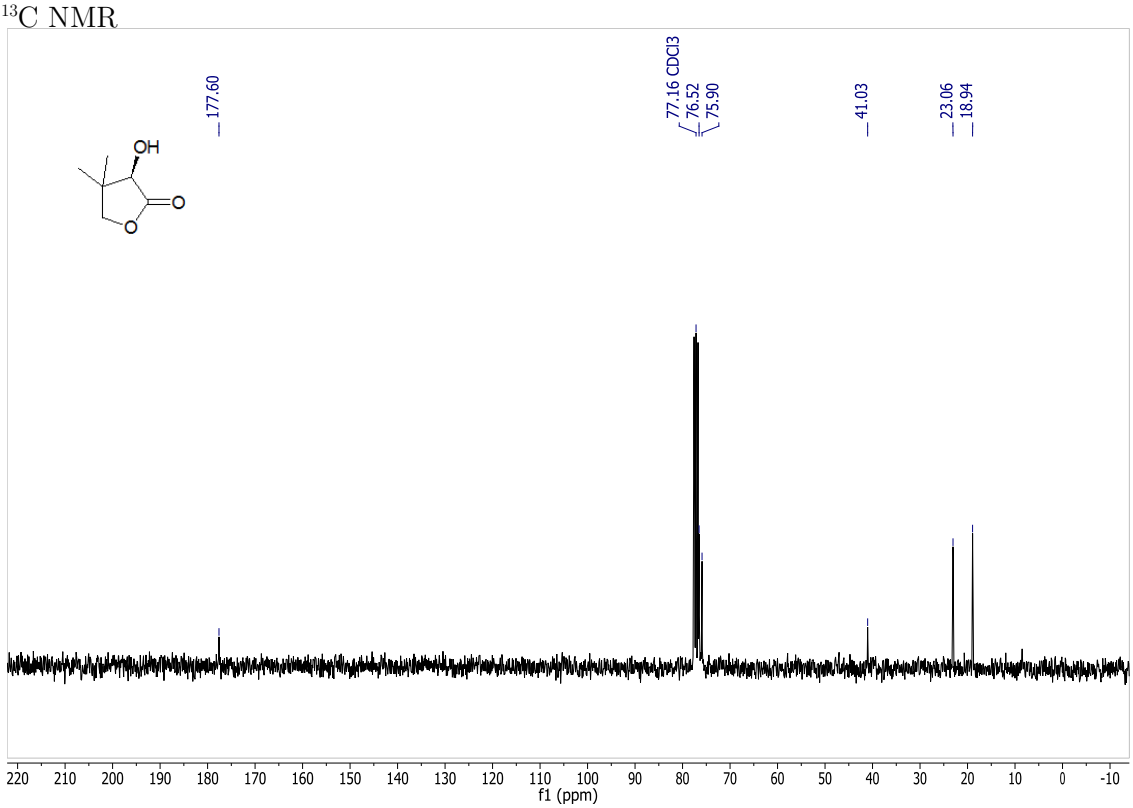


D-pantolakton (12)

^{1}H NMR

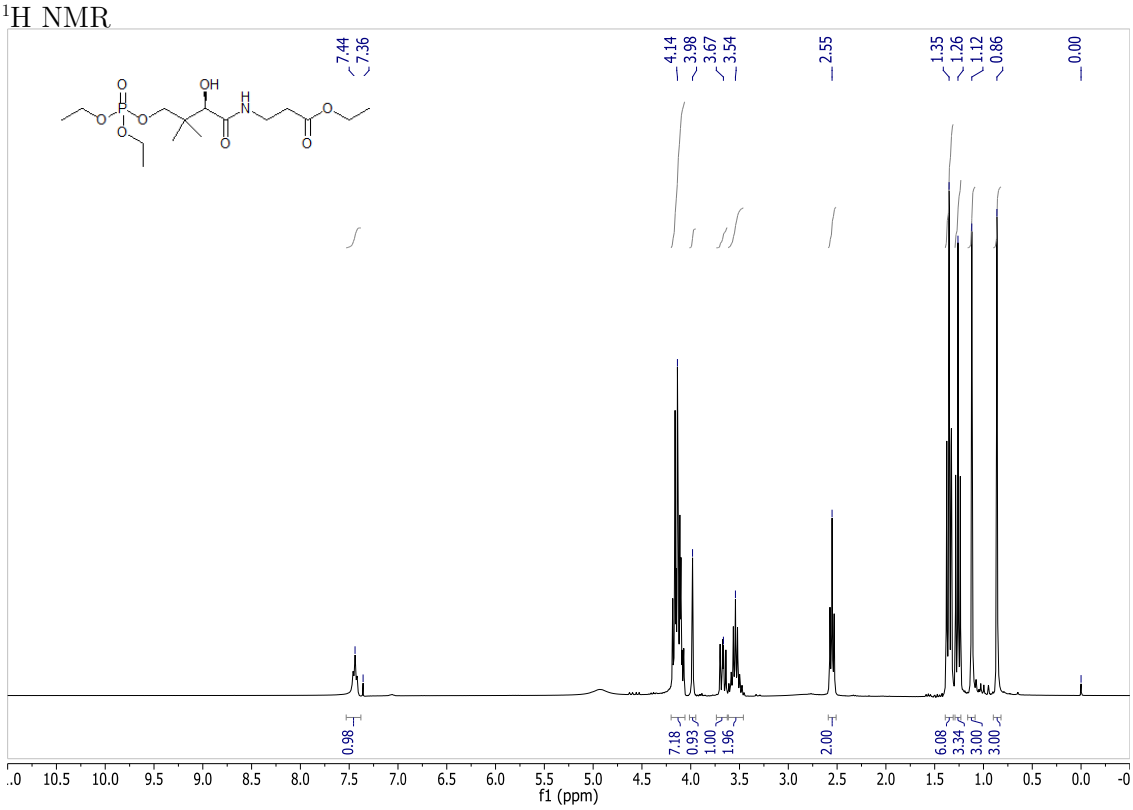


^{13}C NMR

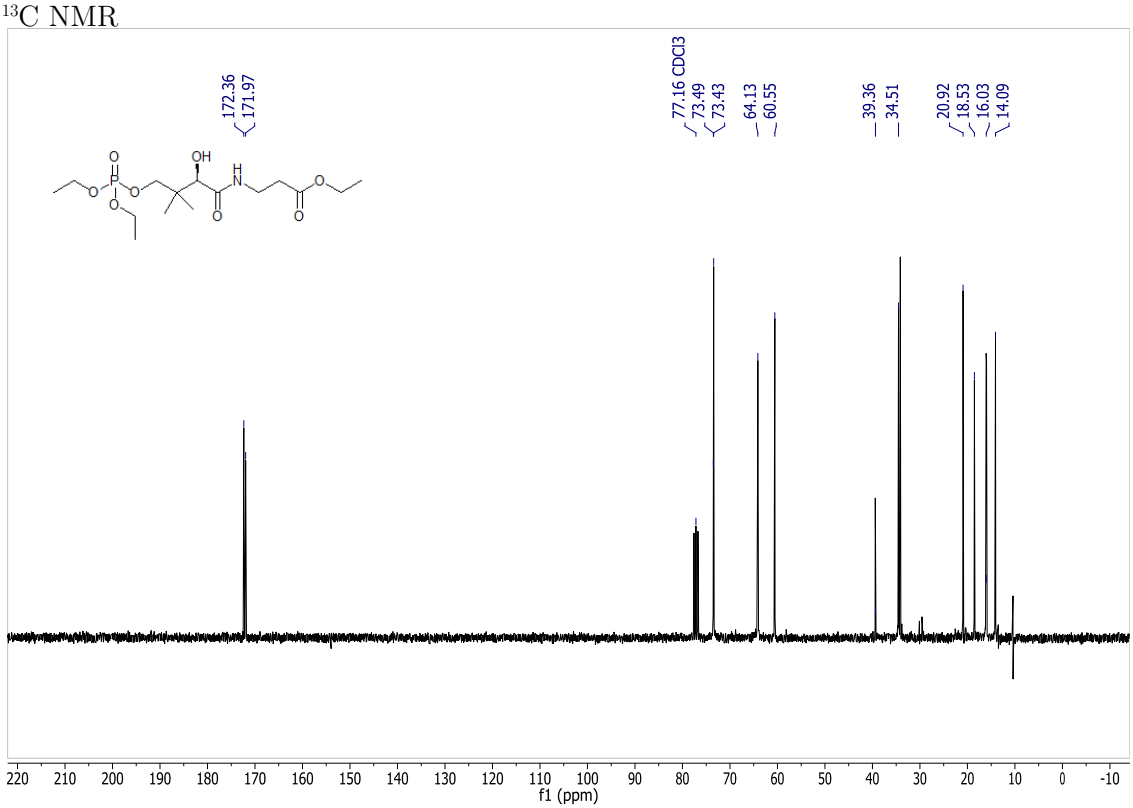


(R)-etil 3-(4-(dietoksifosforiloksi)-2-hidroksi-3,3-dimetilbutanamido)propanoat) (11a)

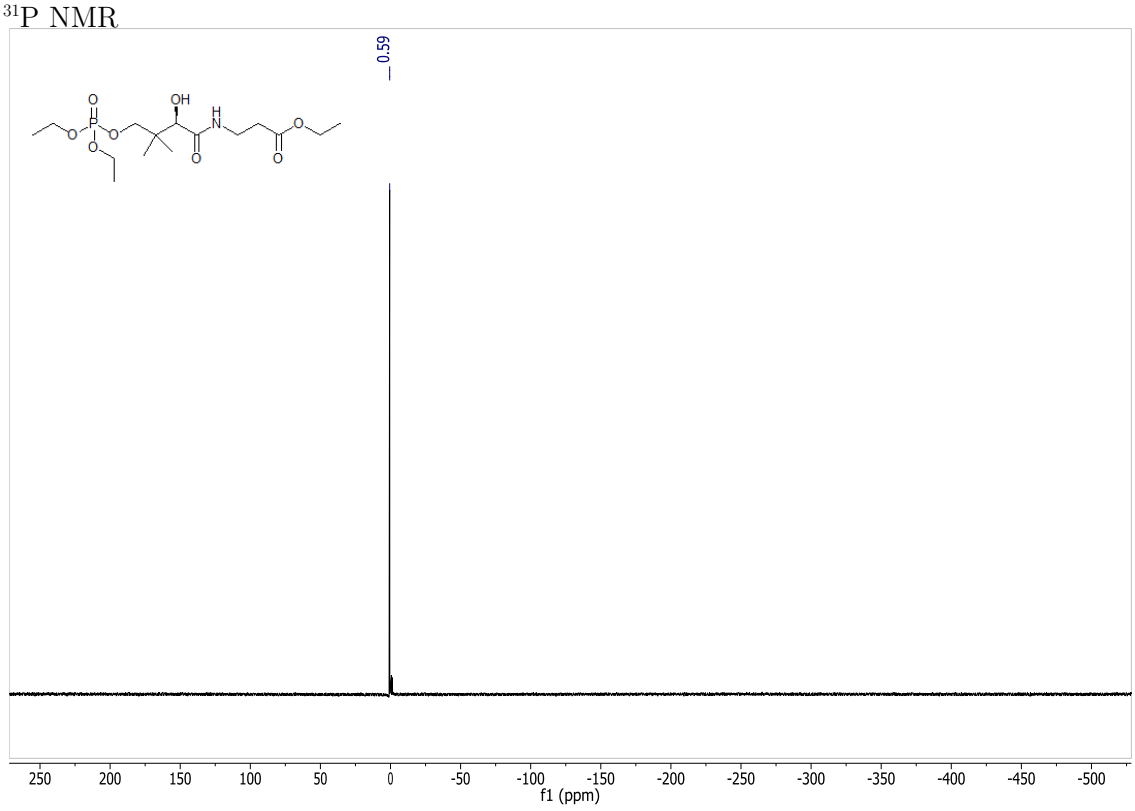
^{1}H NMR



^{13}C NMR

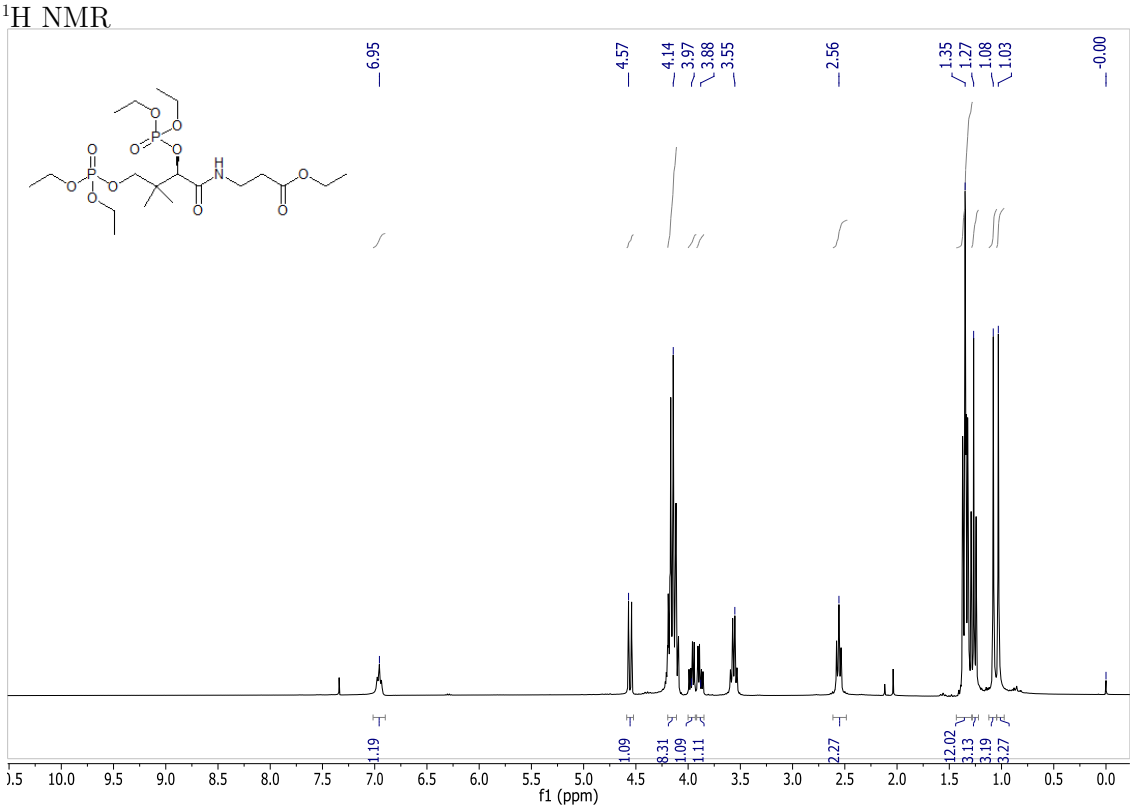


^{31}P NMR

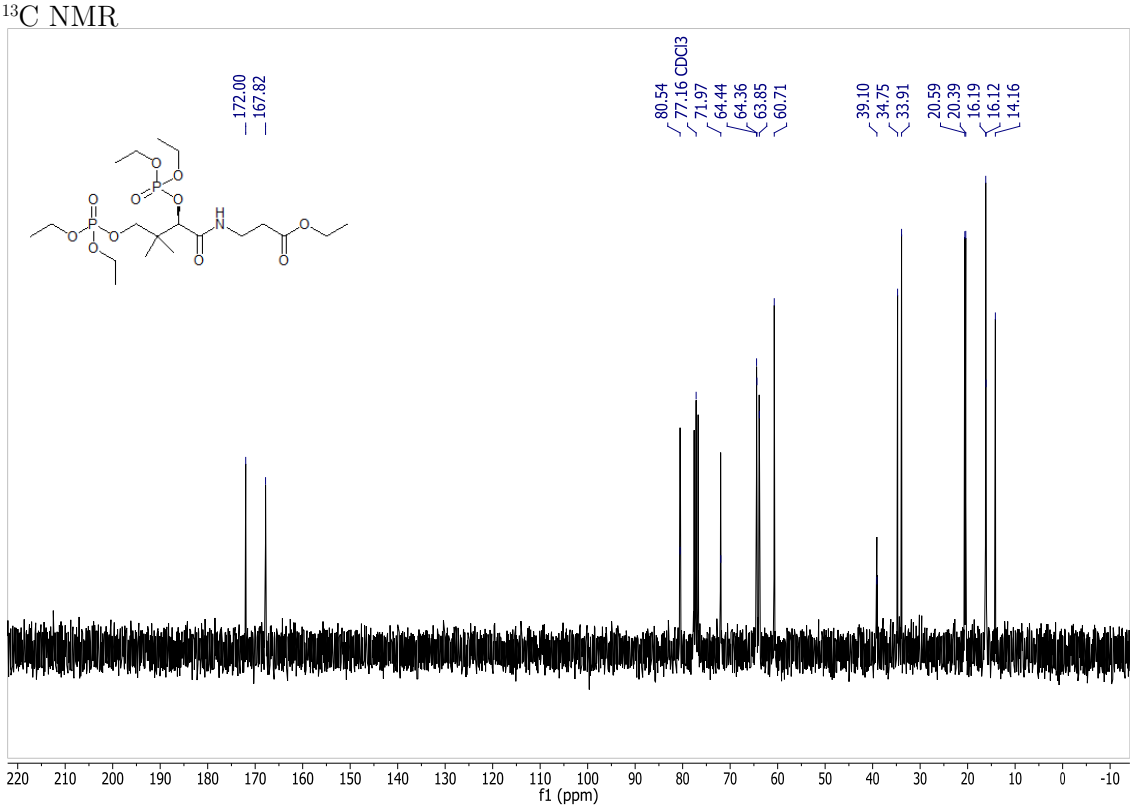

0.59
250
200
150
100
50
0
-50
-100
-150
-200
-250
-300
-350
-400
-450
-500
f1 (ppm)

(R)-etil 3-(2,4-bis(dietoksifosforiloksi)-3,3-dimetilbutanamido)propanoat (11a')

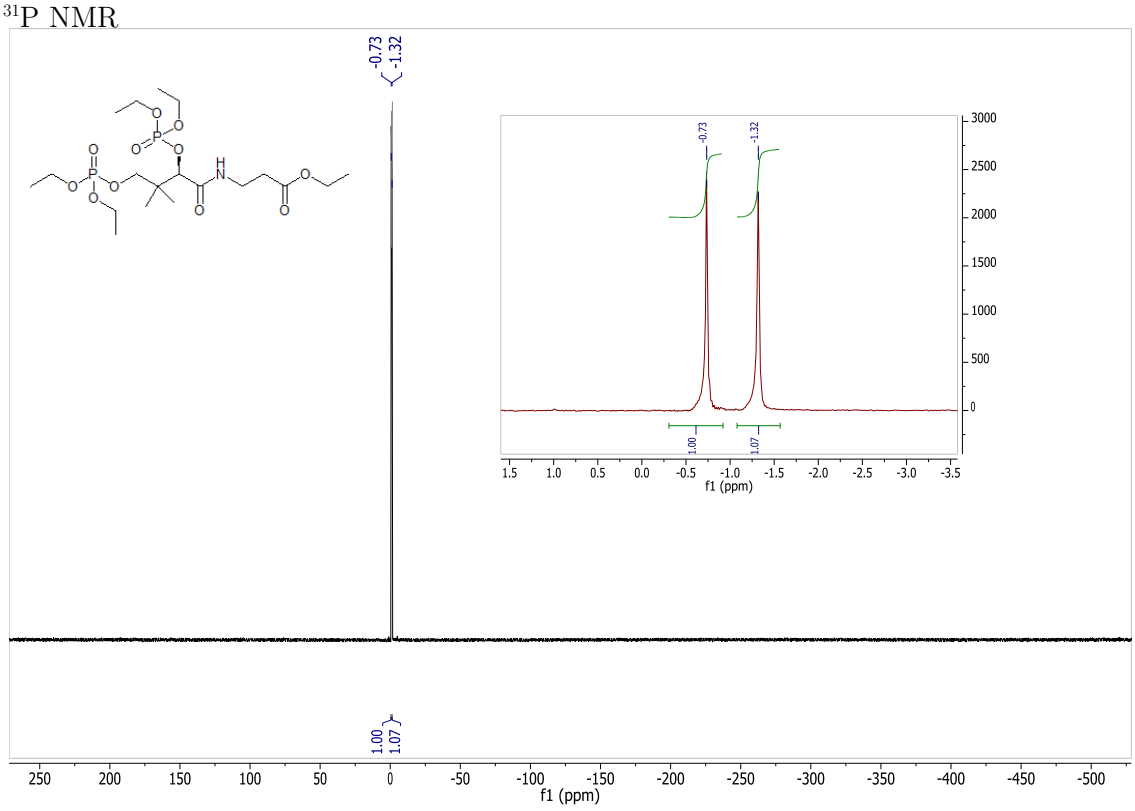
^{1}H NMR



^{13}C NMR

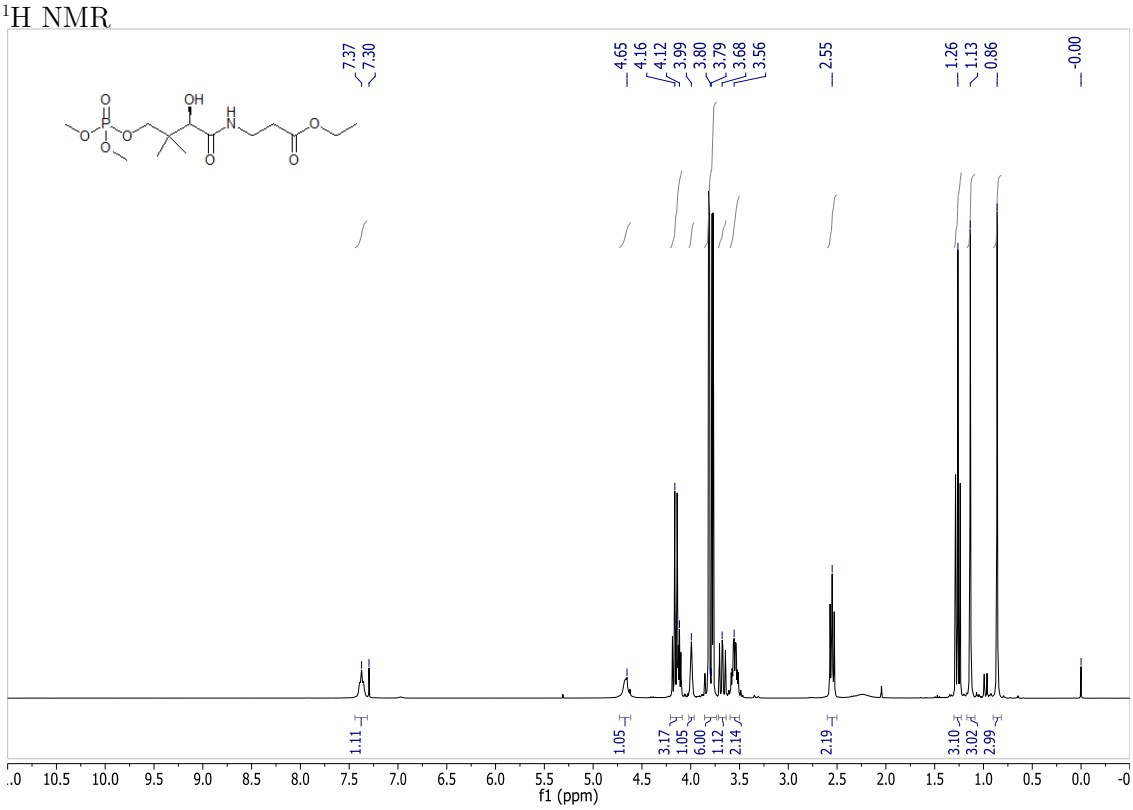


^{31}P NMR

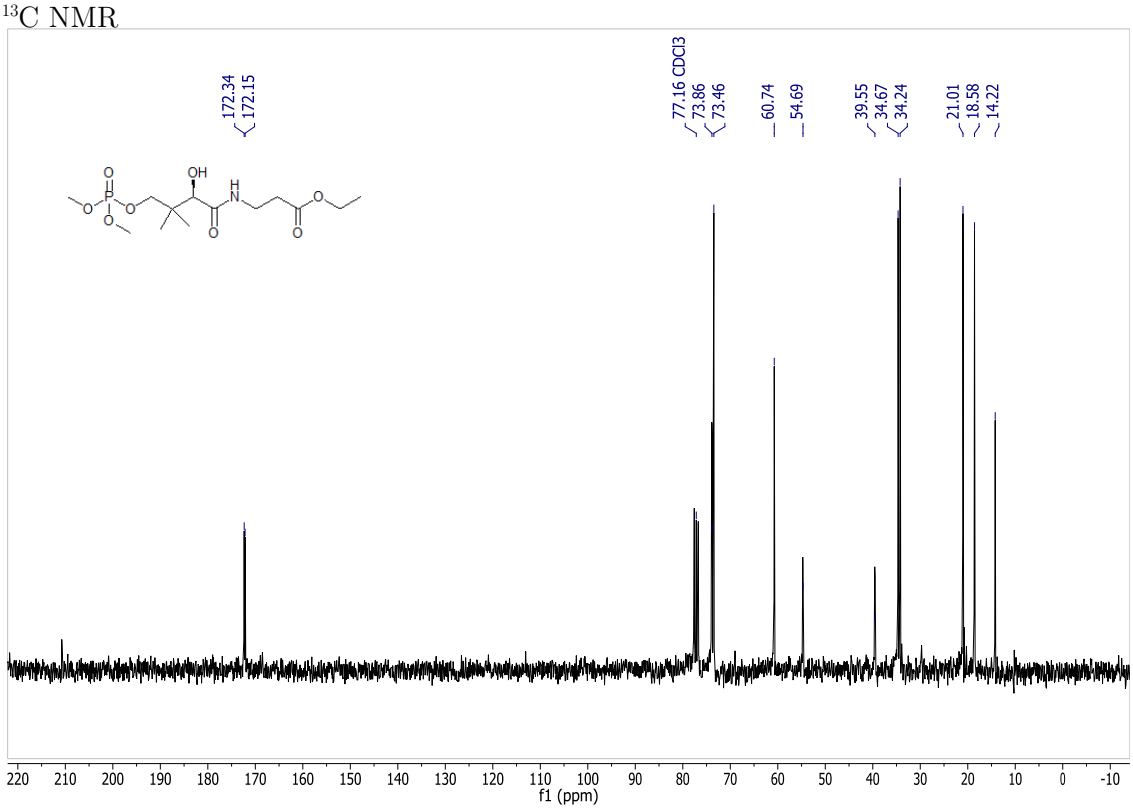


(R)-etil 3-(4-(dimetoksifosforiloksi)-2-hidroksi-3,3-dimetilbutanamido)propanoat (11b)

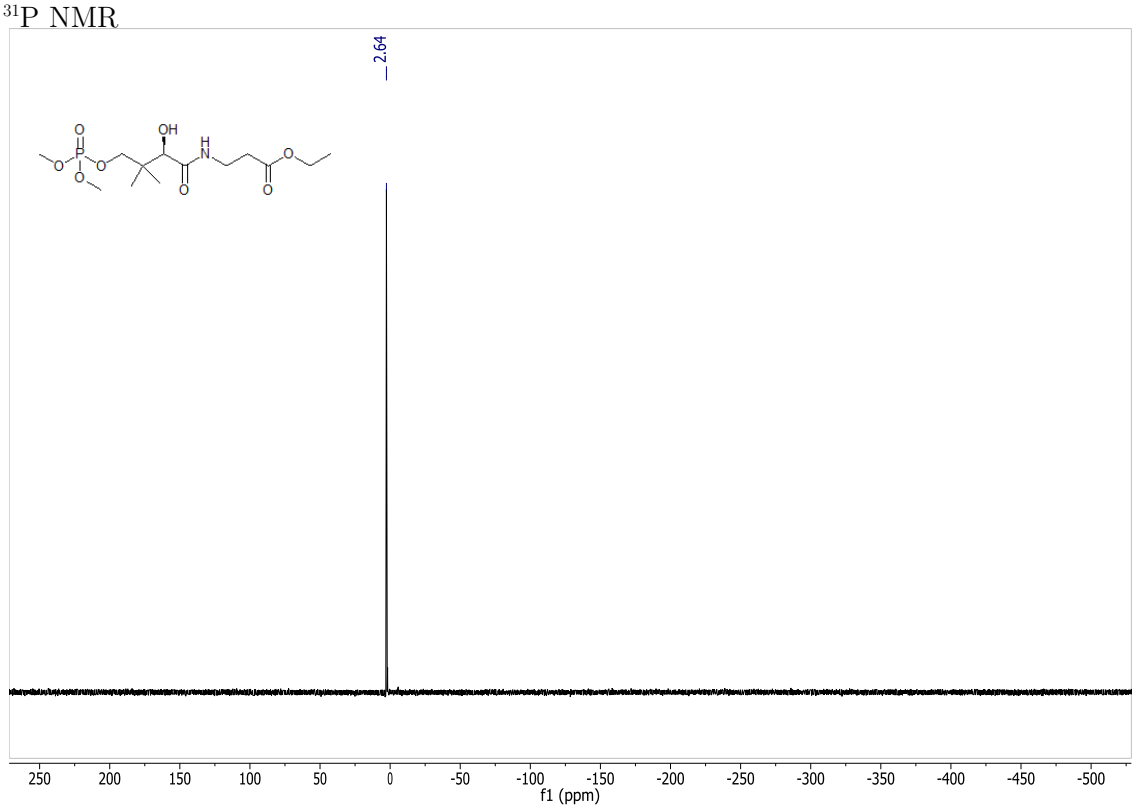
^{1}H NMR



^{13}C NMR

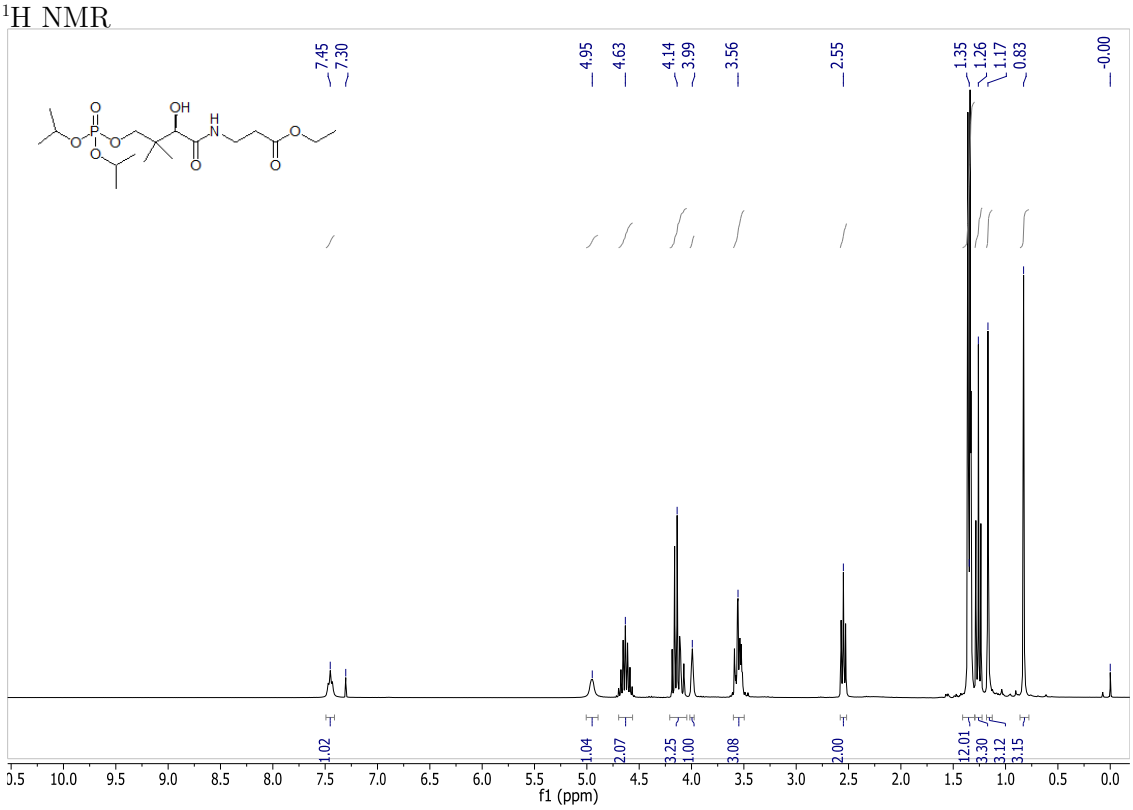


^{31}P NMR

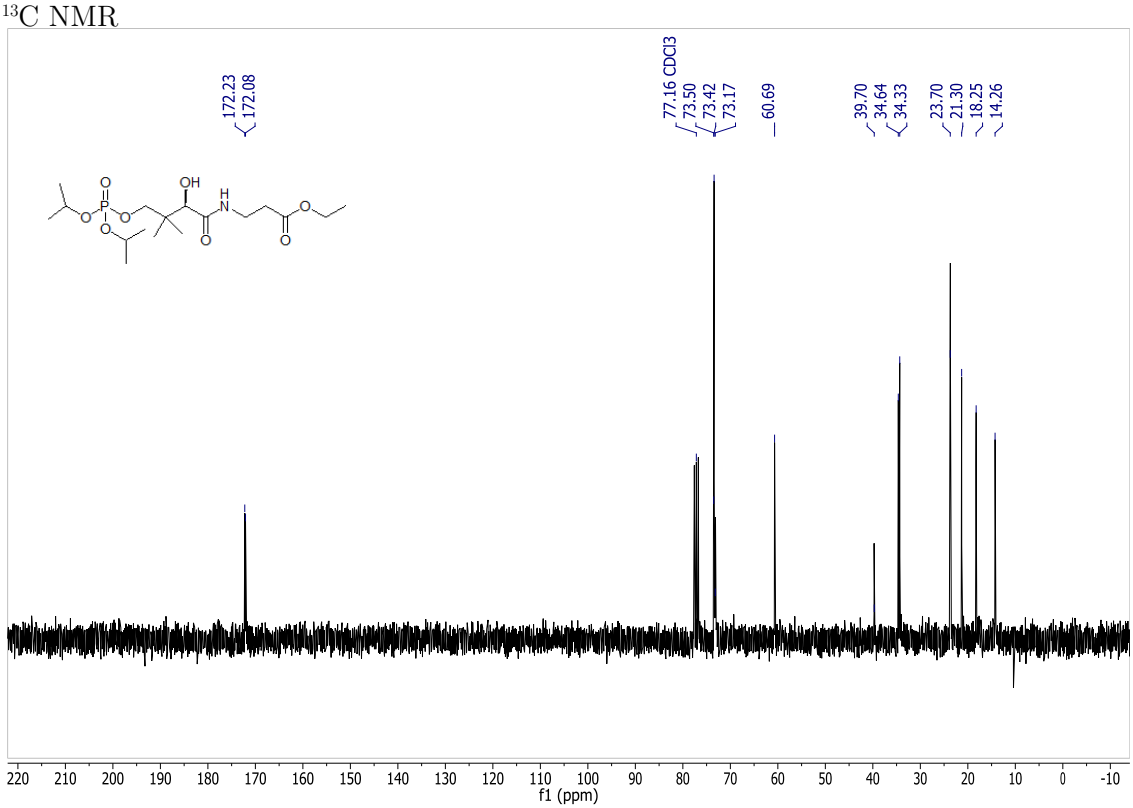

2.64
250
200
150
100
50
0
-50
-100
-150
-200
-250
-300
-350
-400
-450
-500
f1 (ppm)

(R)-etil 3-(4-(diizopropoksifosforiloksi)-2-hidroksi-3,3-dimetilbutanamido)propanoat (11c)

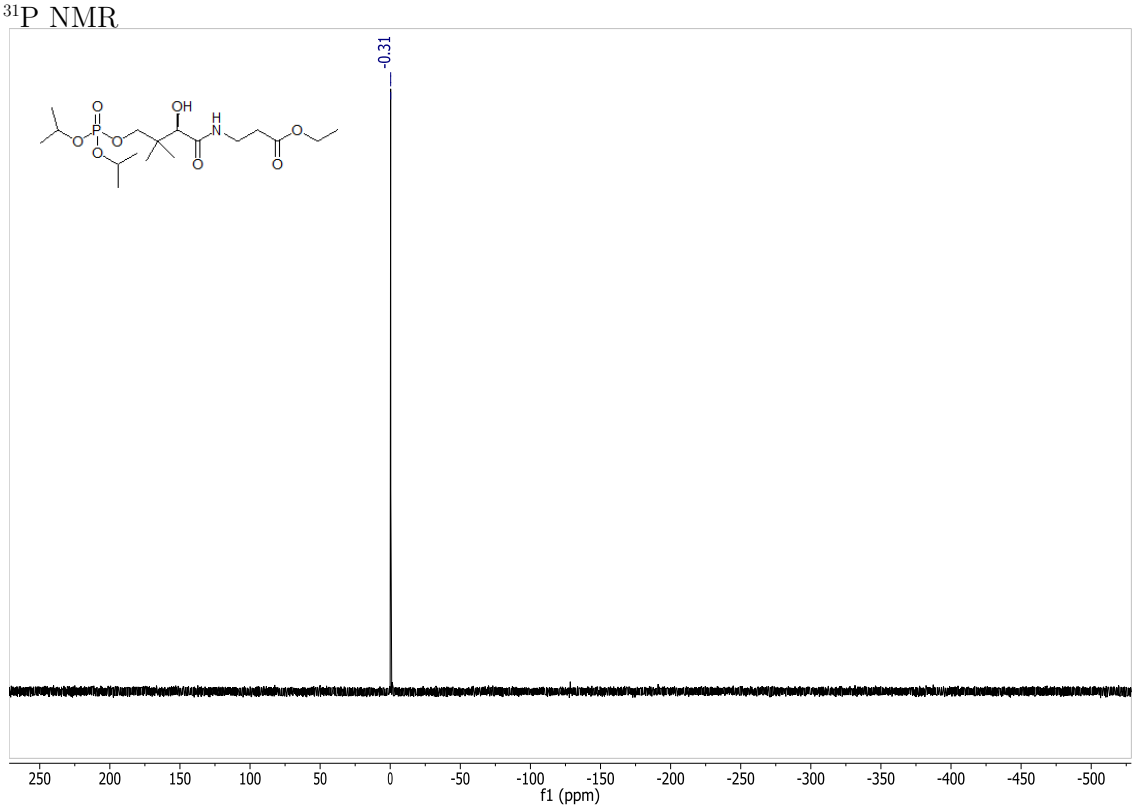
^{1}H NMR



^{13}C NMR

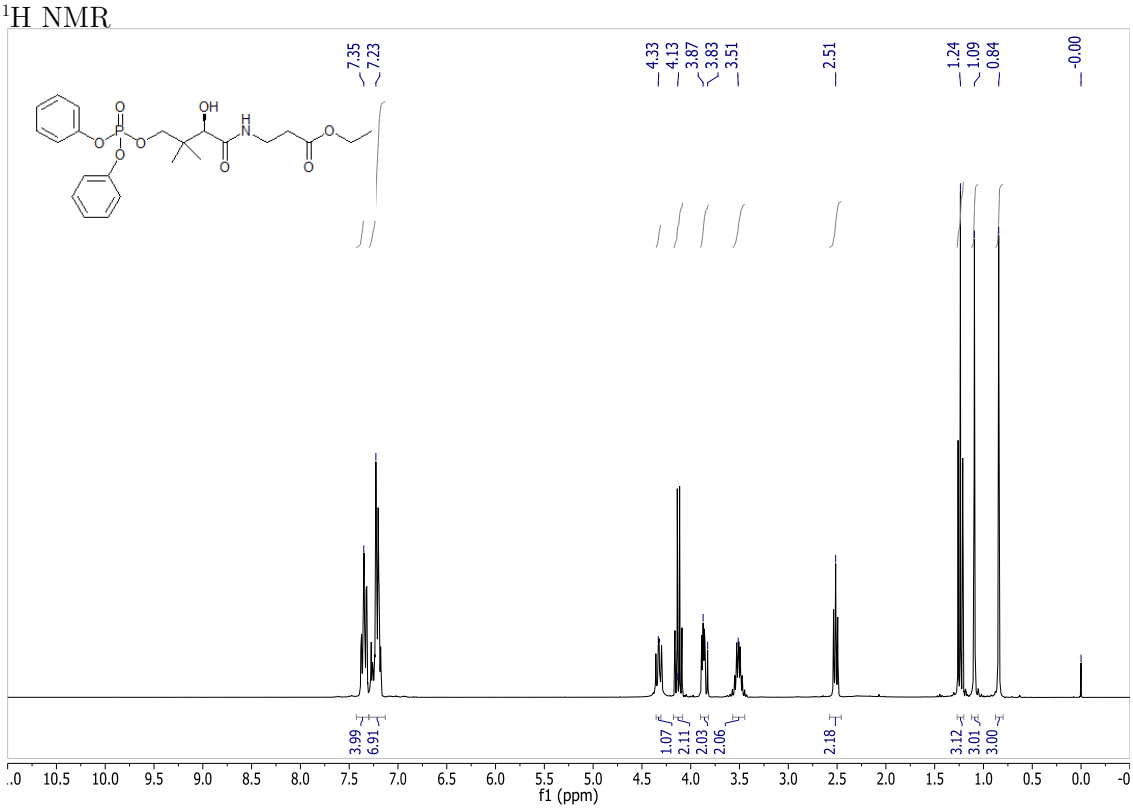


^{31}P NMR

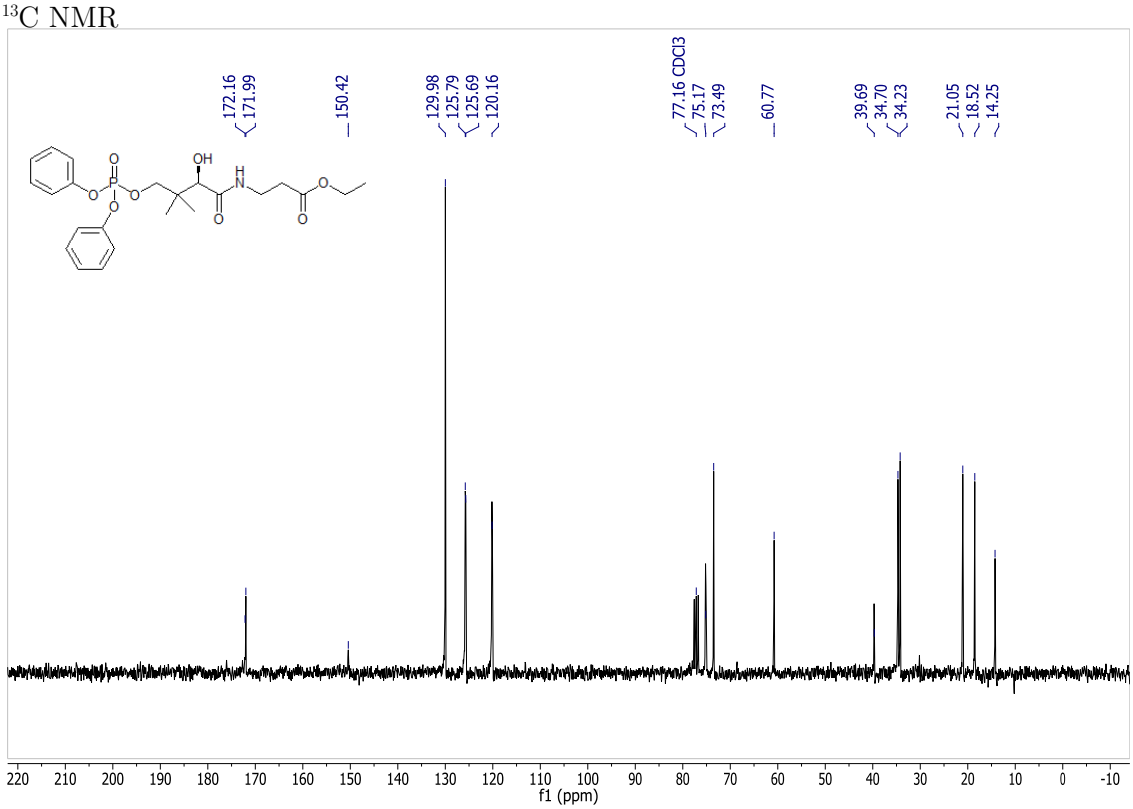

-0.31
250
200
150
100
50
0
-50
-100
-150
-200
-250
-300
-350
-400
-450
-500
f1 (ppm)

(R)-etil 3-(4-(difenoksifosforiloksi)-2-hidroksi-3,3-dimetilbutanamido)propanoat (11d)

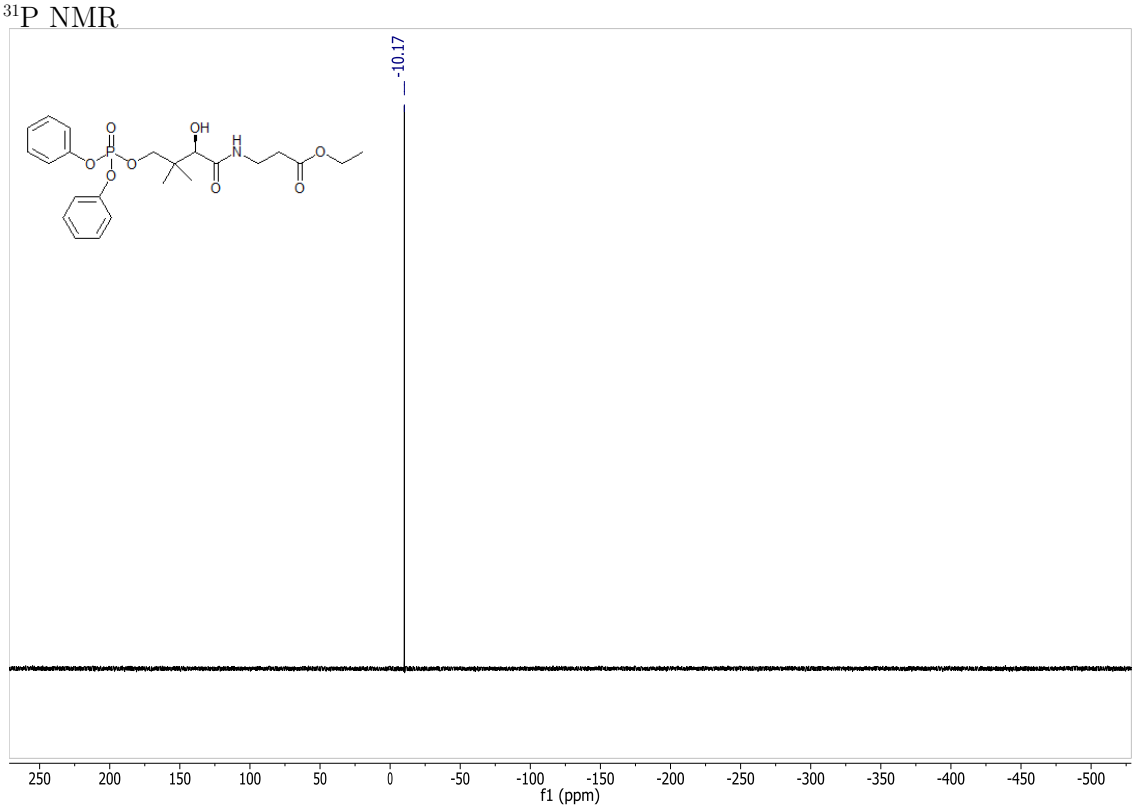
^{1}H NMR



^{13}C NMR

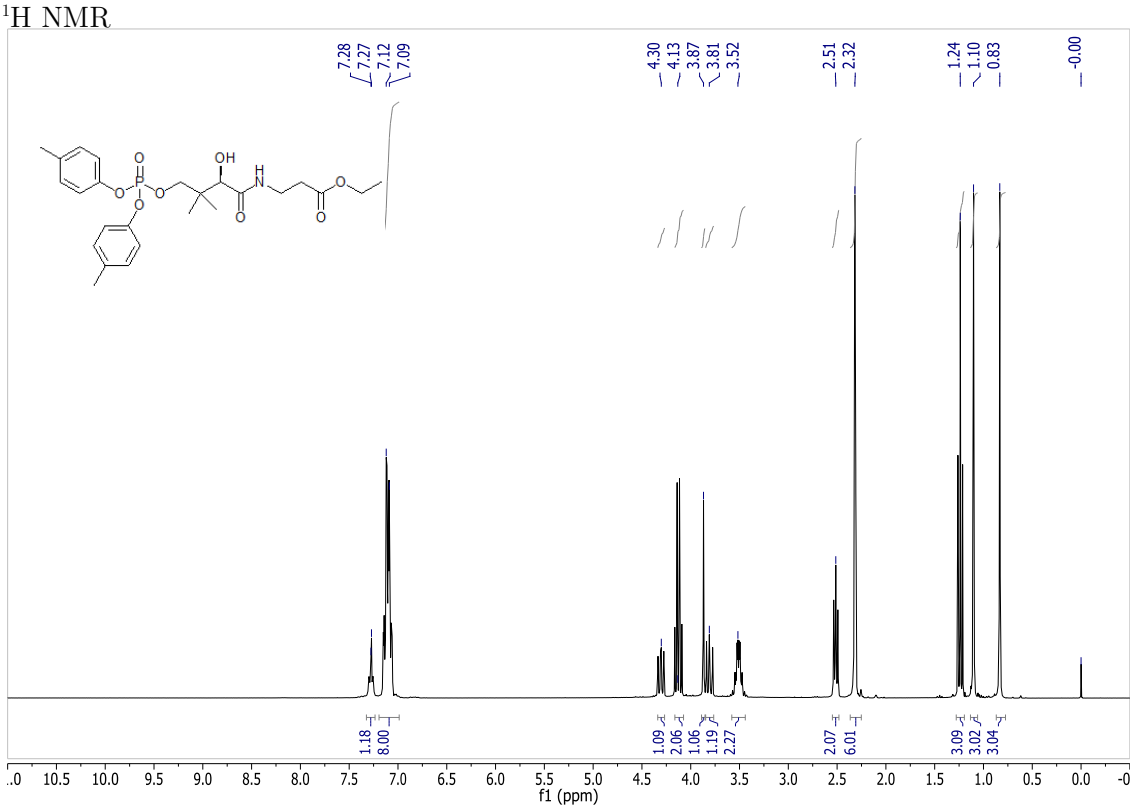


^{31}P NMR

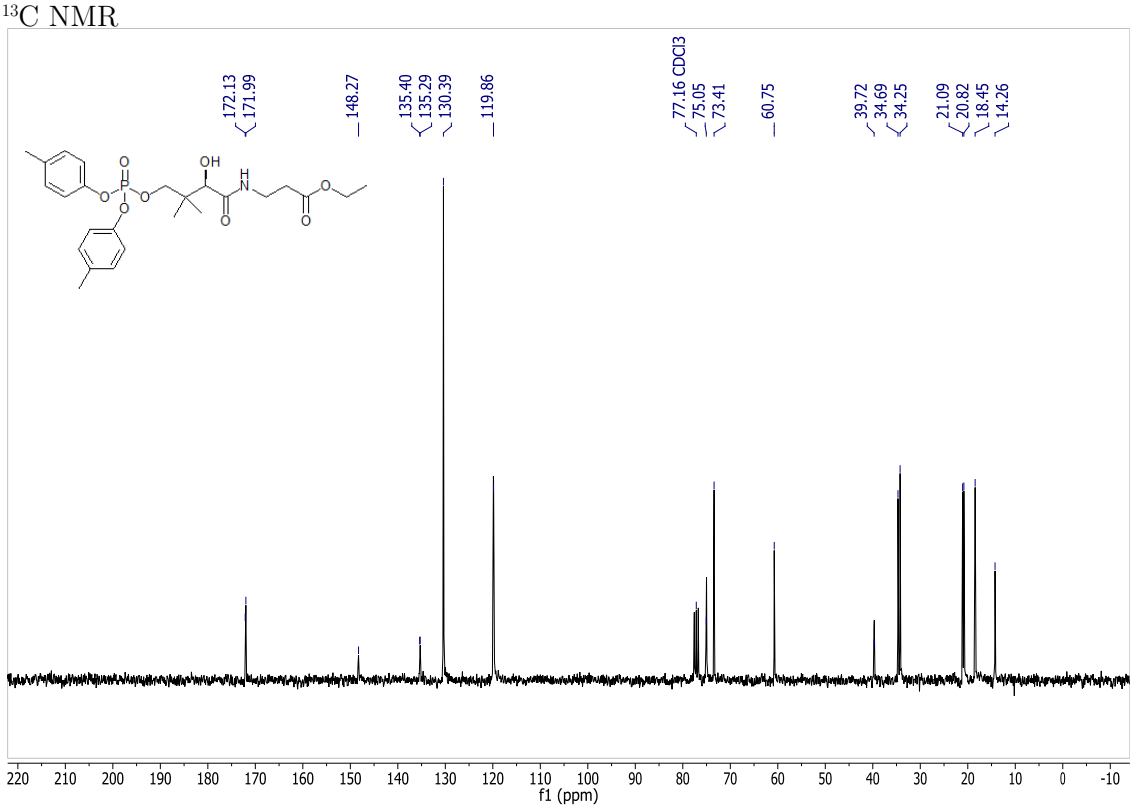

-10.17
250
200
150
100
50
0
-50
-100
-150
-200
-250
-300
-350
-400
-450
-500
f1 (ppm)

(R)-etil 3-(4-(bis(p-toliloksi)fosforiloksi)-2-hidroksi-3,3-dimetilbutanamido)propanoat (11e)

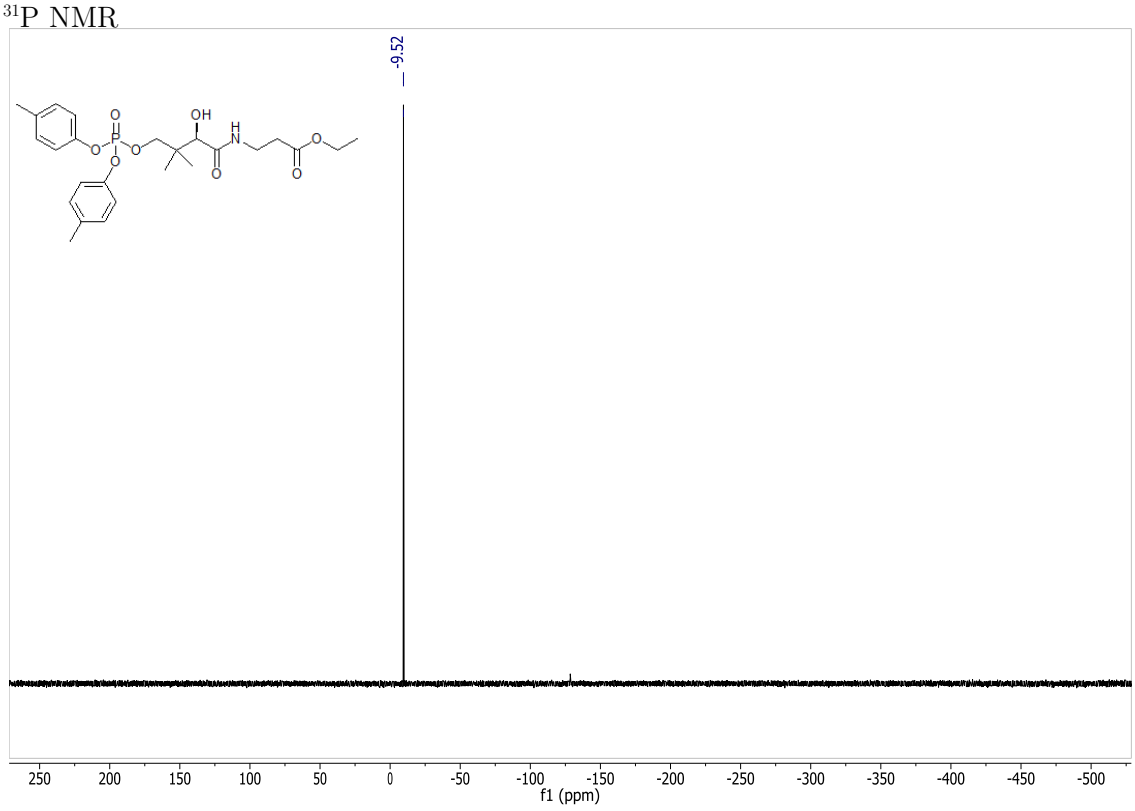
^{1}H NMR



^{13}C NMR

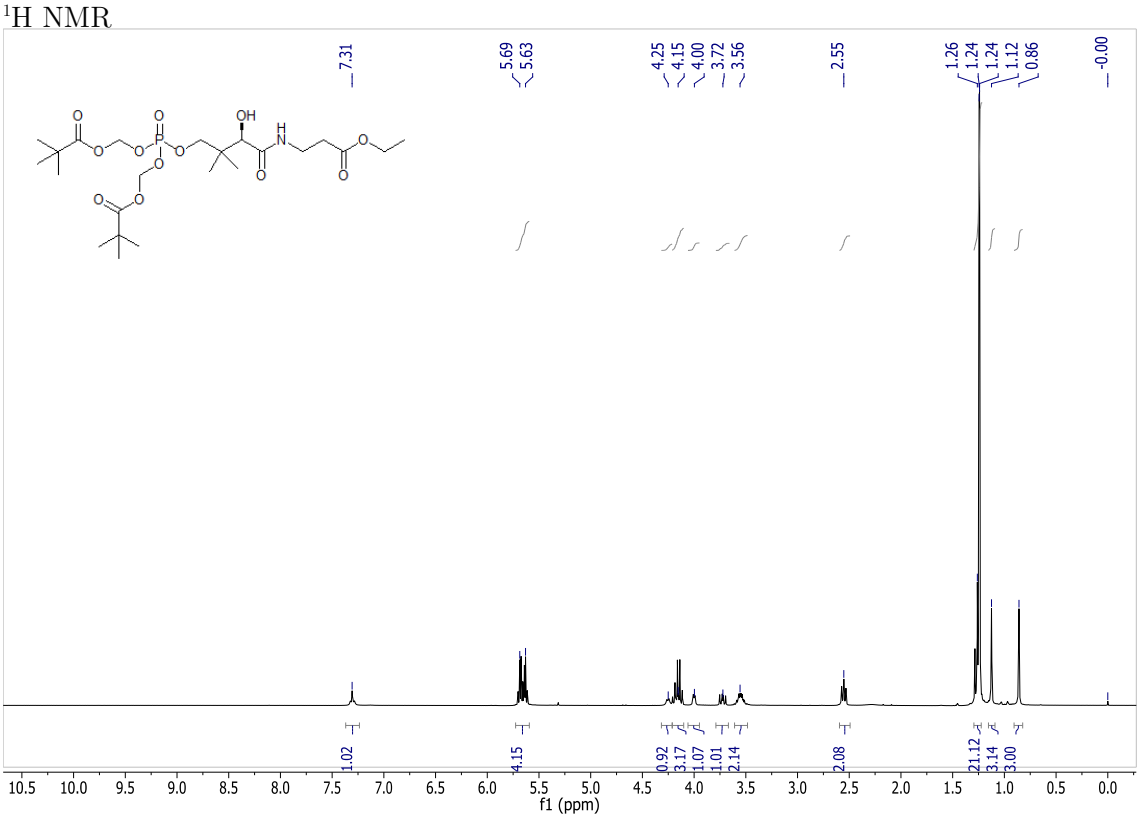


^{31}P NMR

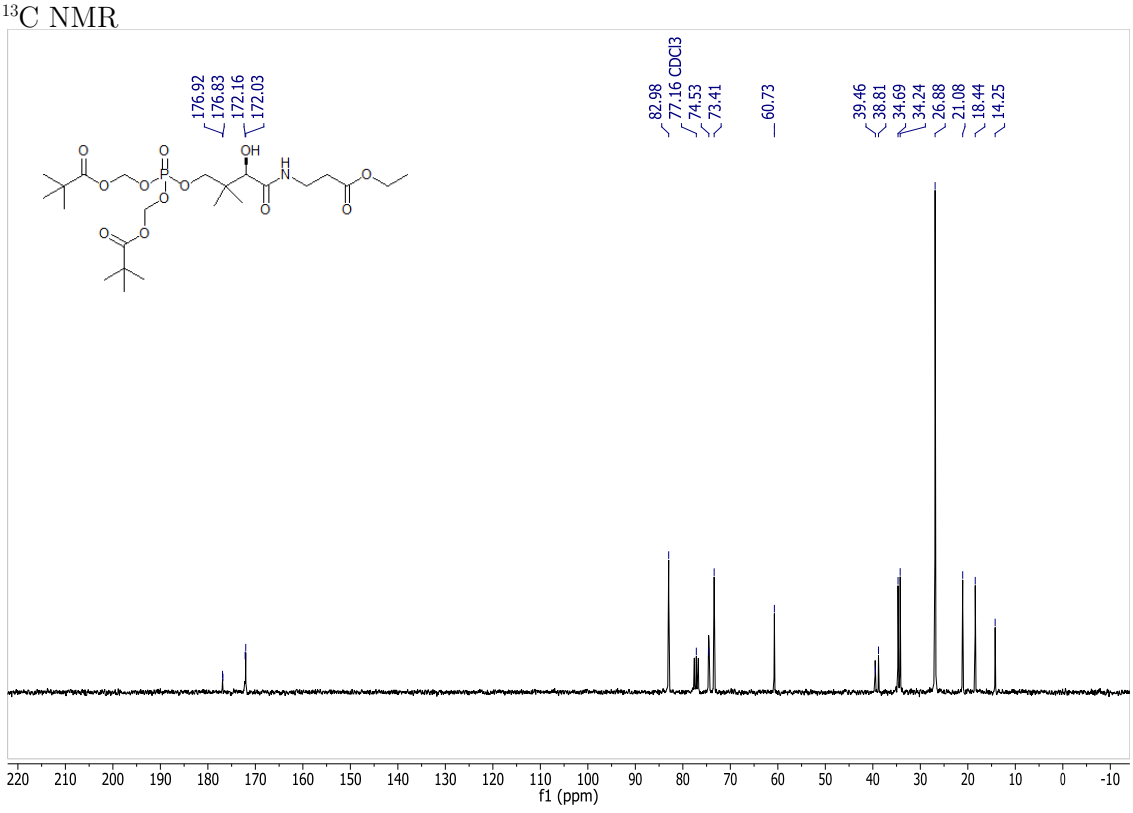

-9.52
250
200
150
100
50
0
-50
-100
-150
-200
-250
-300
-350
-400
-450
-500
f1 (ppm)

(R)-etil 3-(4-(bis(pivaloiloksimetil)fosforiloksi)-2-hidroksi-3,3-dimetilbutanamido)propanoat (11h)

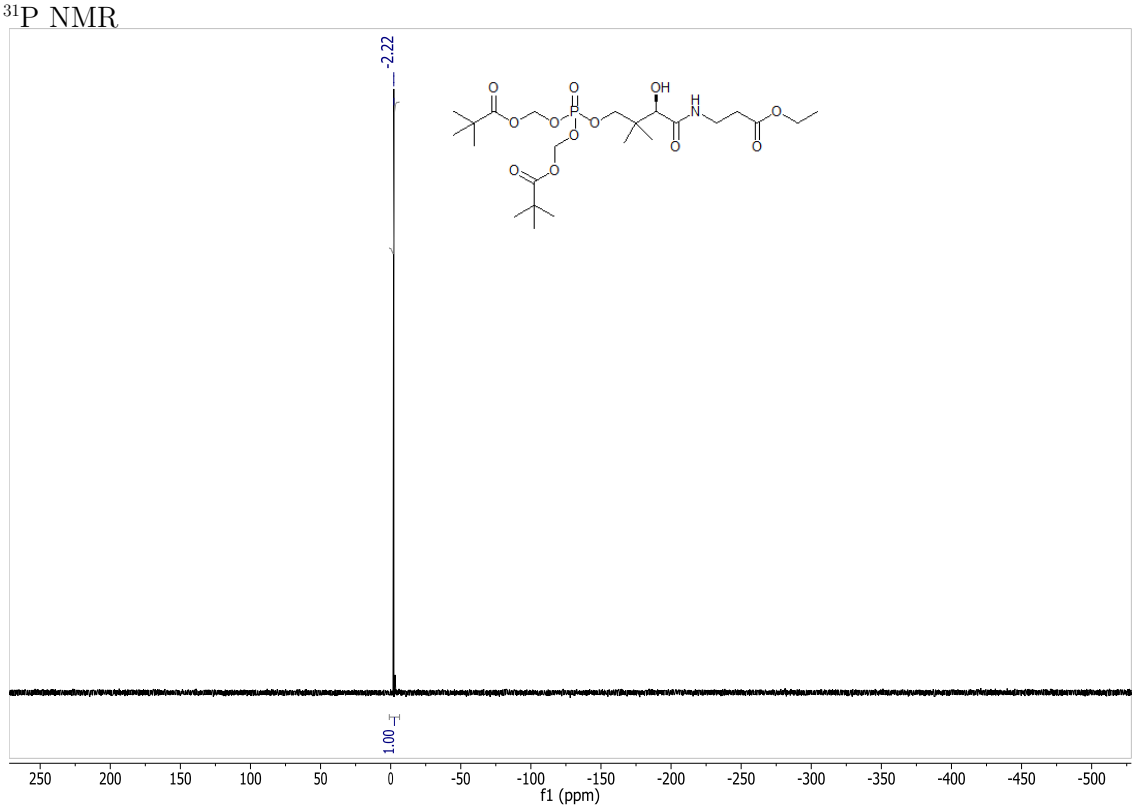
^{1}H NMR



^{13}C NMR

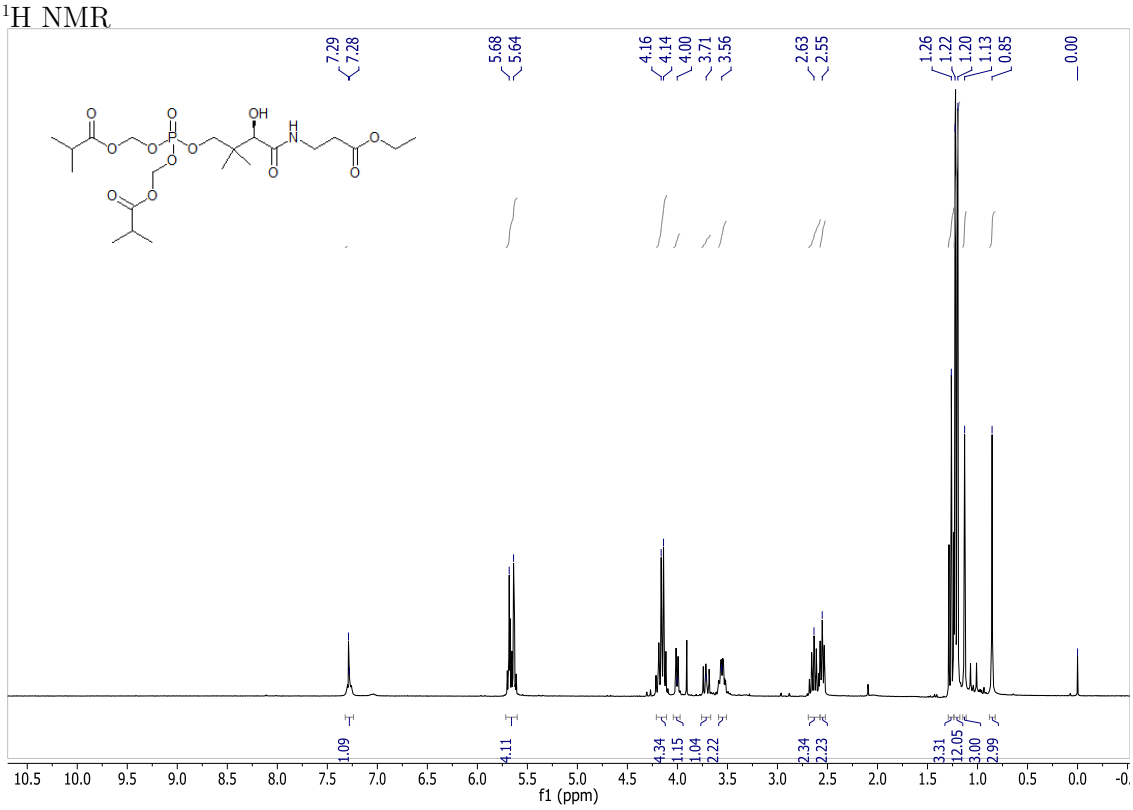


^{31}P NMR

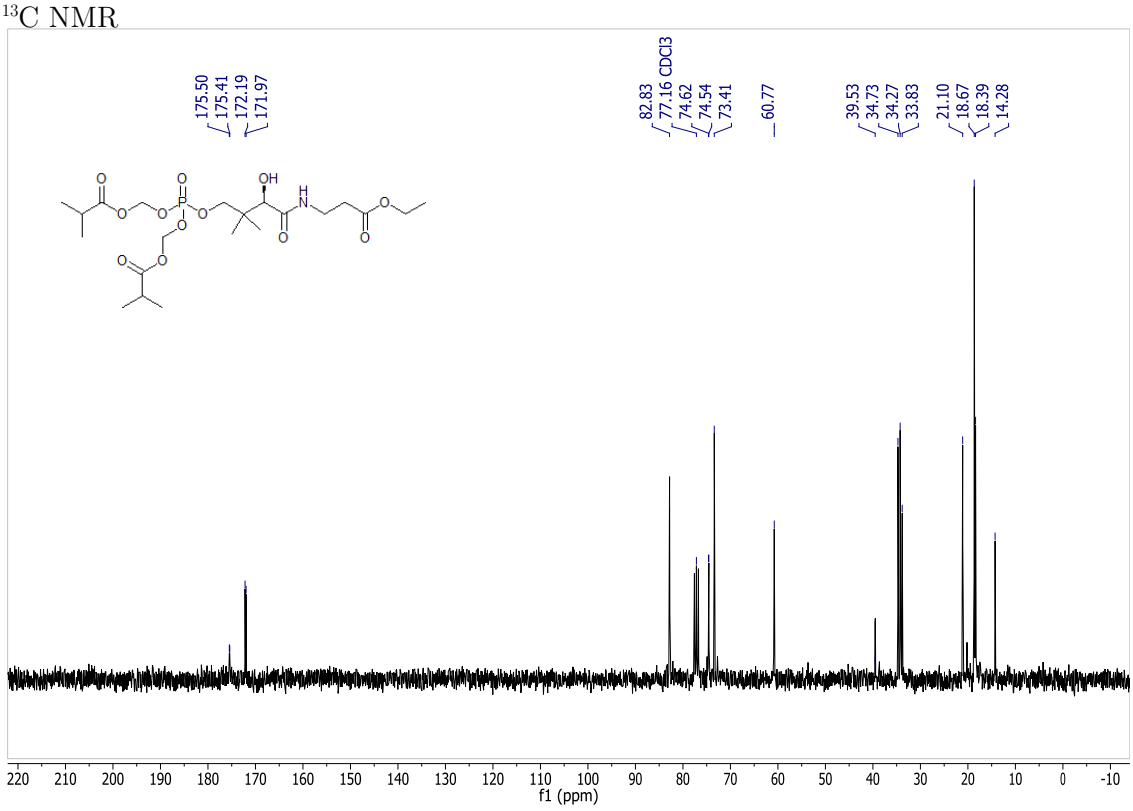

-2.22
1.00
250
200
150
100
50
0
-50
-100
-150
-200
-250
-300
-350
-400
-450
-500
f1 (ppm)

(R)-etil 3-(4-(bis(izobutiriloksimetil)fosforiloksi)-2-hidroksi-3,3-dimetilbutanamido)propanoat (11i)

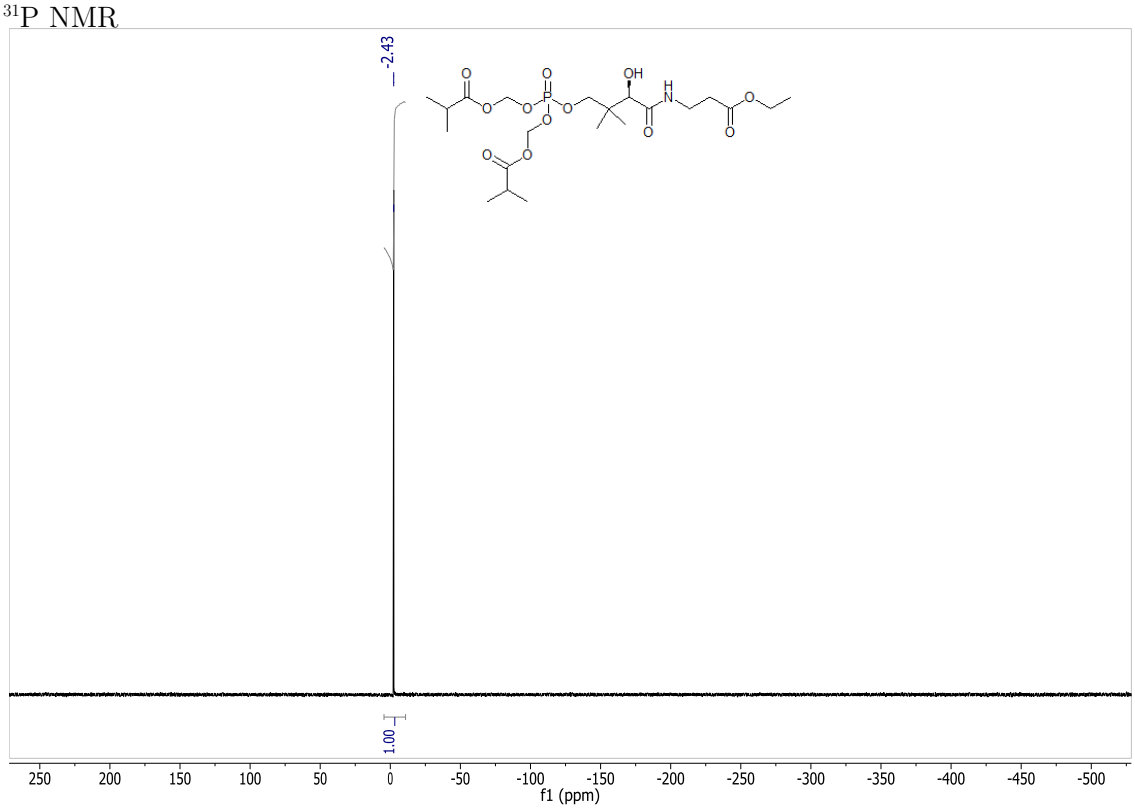
^{1}H NMR



^{13}C NMR

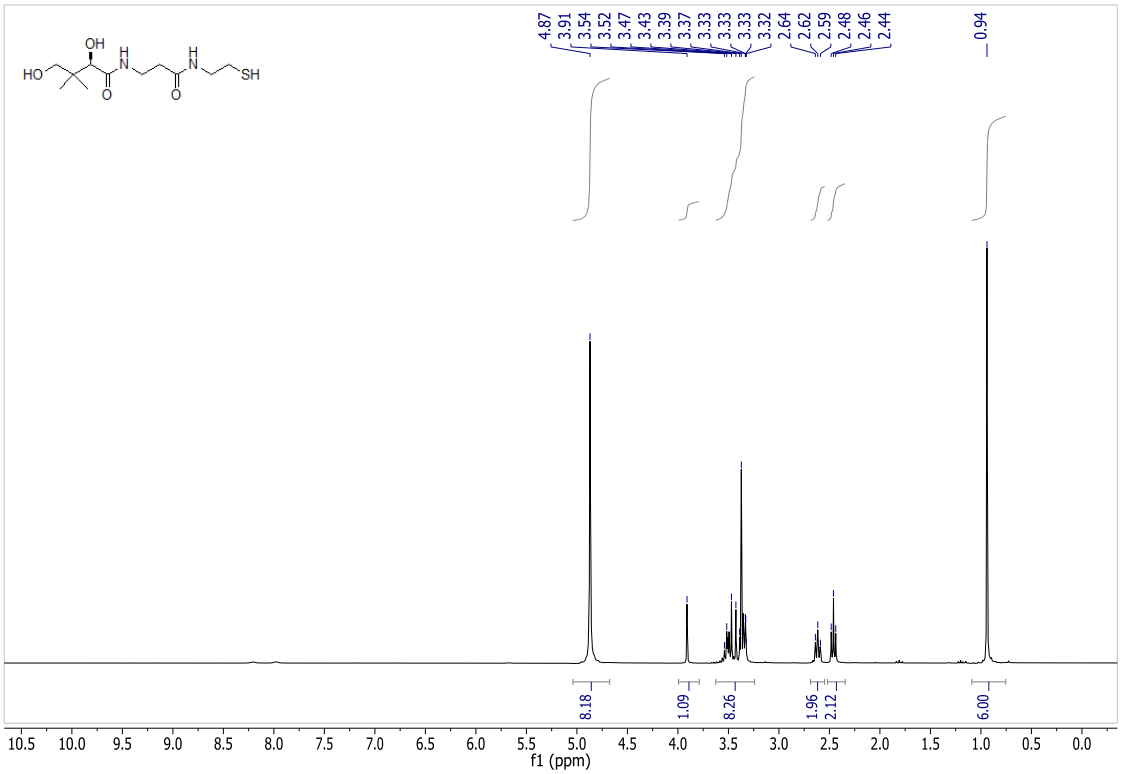


^{31}P NMR


-2.43
1.00
250
200
150
100
50
0
-50
-100
-150
-200
-250
-300
-350
-400
-450
-500
f1 (ppm)

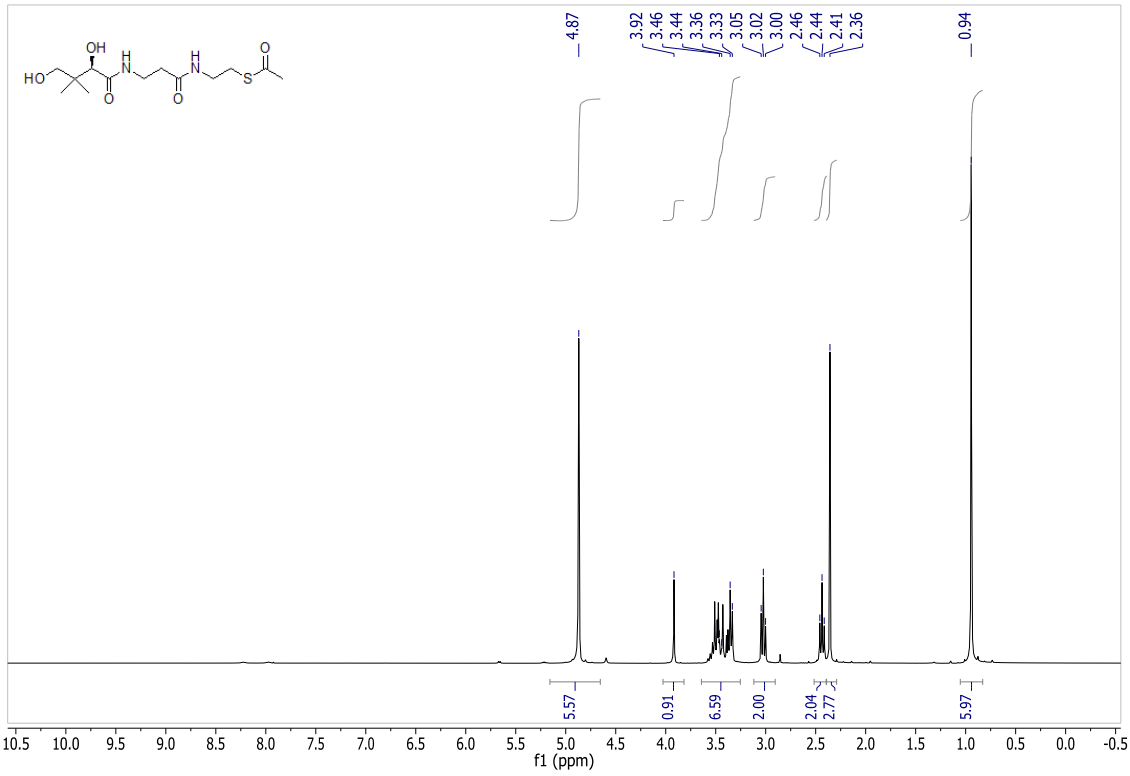
(R)-2,4-dihidroksi-N-(3-(2-mercaptoetilamino)-3-oxopropyl)-3,3-dimetilbutanamide (14)

^{1}H NMR

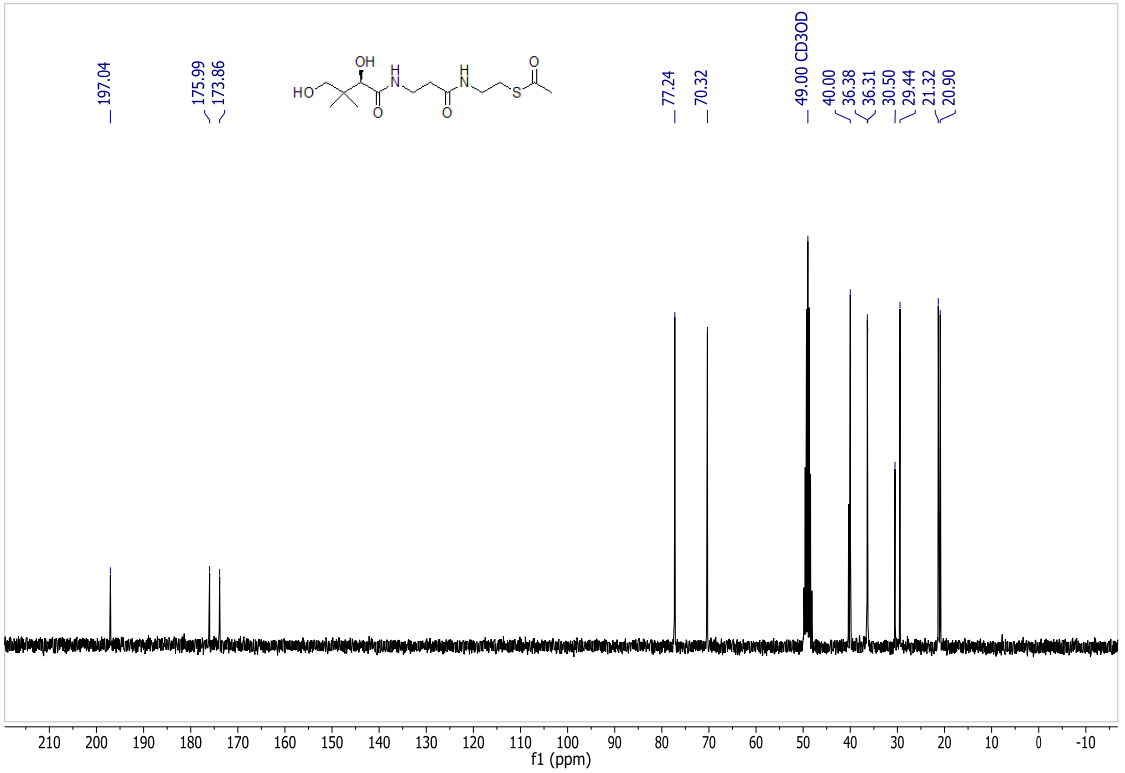


(R)-2,4-dihidroksi-N-(3-(2-mercaptoetilamino)-3-oxopropyl)-3,3-dimetilbutanamide (15)

^{1}H NMR

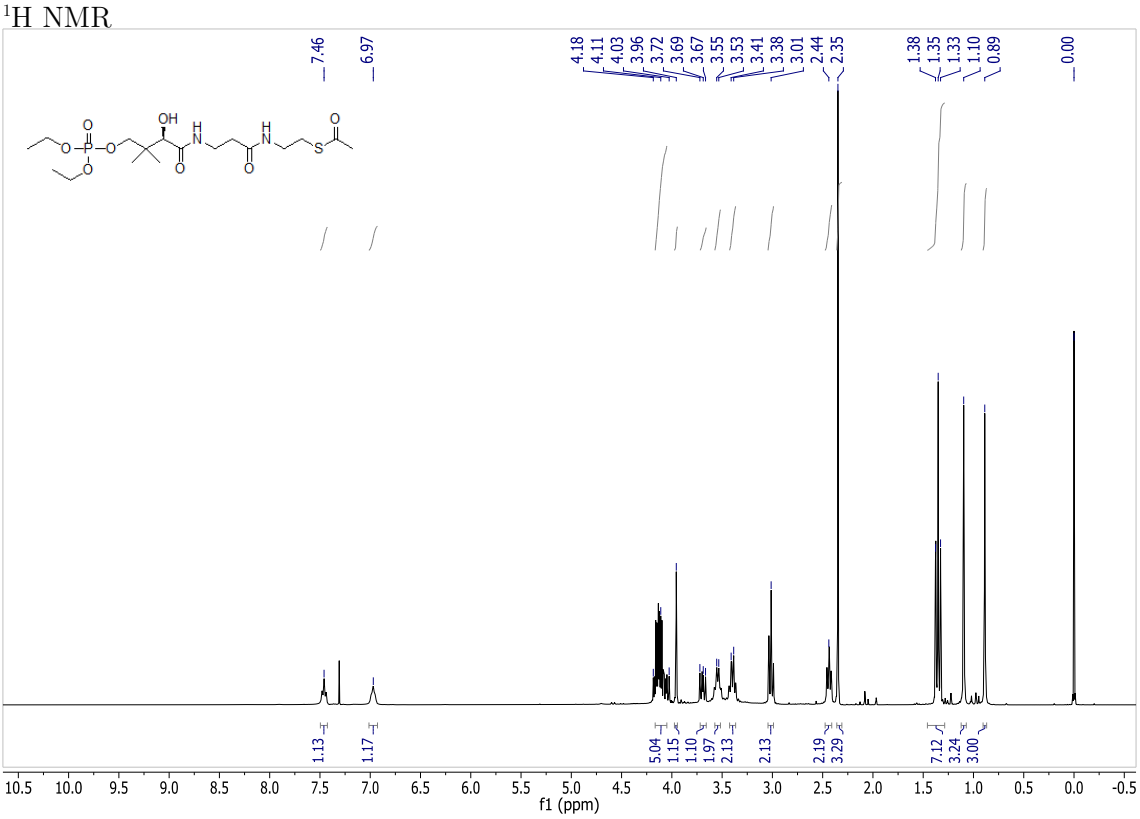


^{13}C NMR

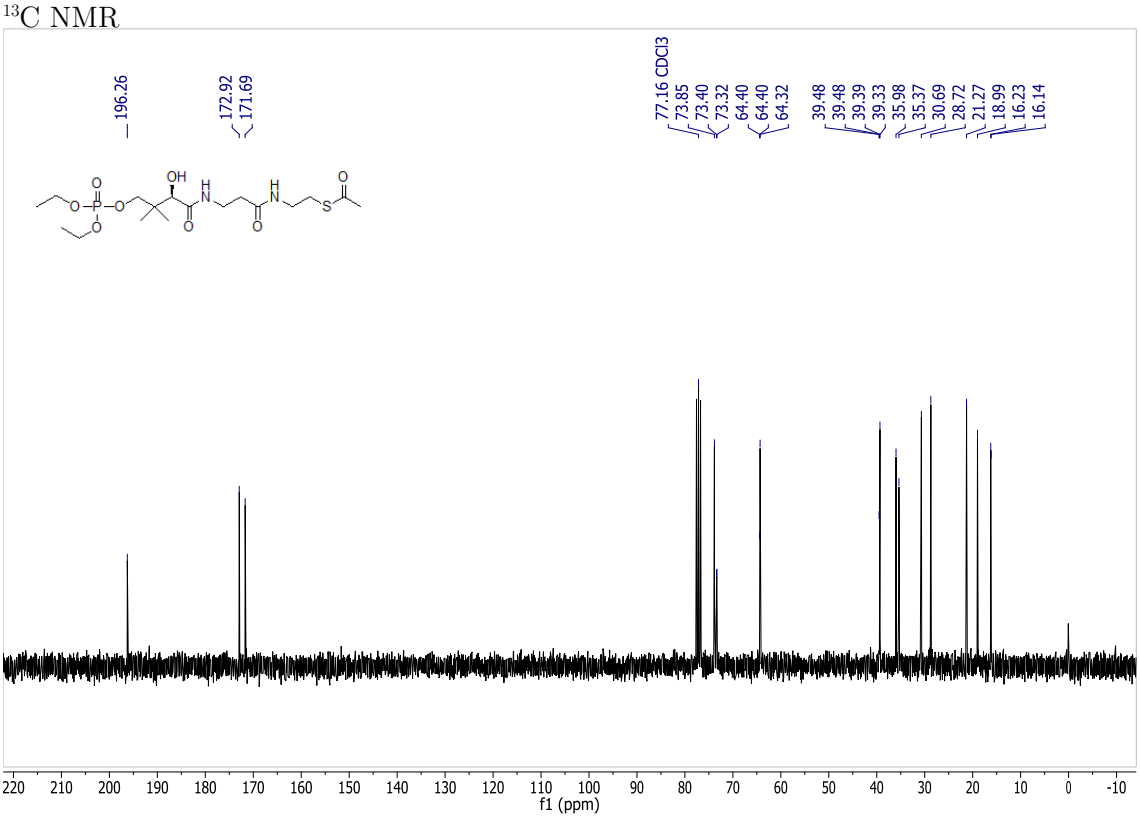


(R)-S-2-(3-(4-(dietoksifosforiloksi)-2-hidroksi-3,3-dimetilbutanamido)propanamido)etil etanetioat (16a)

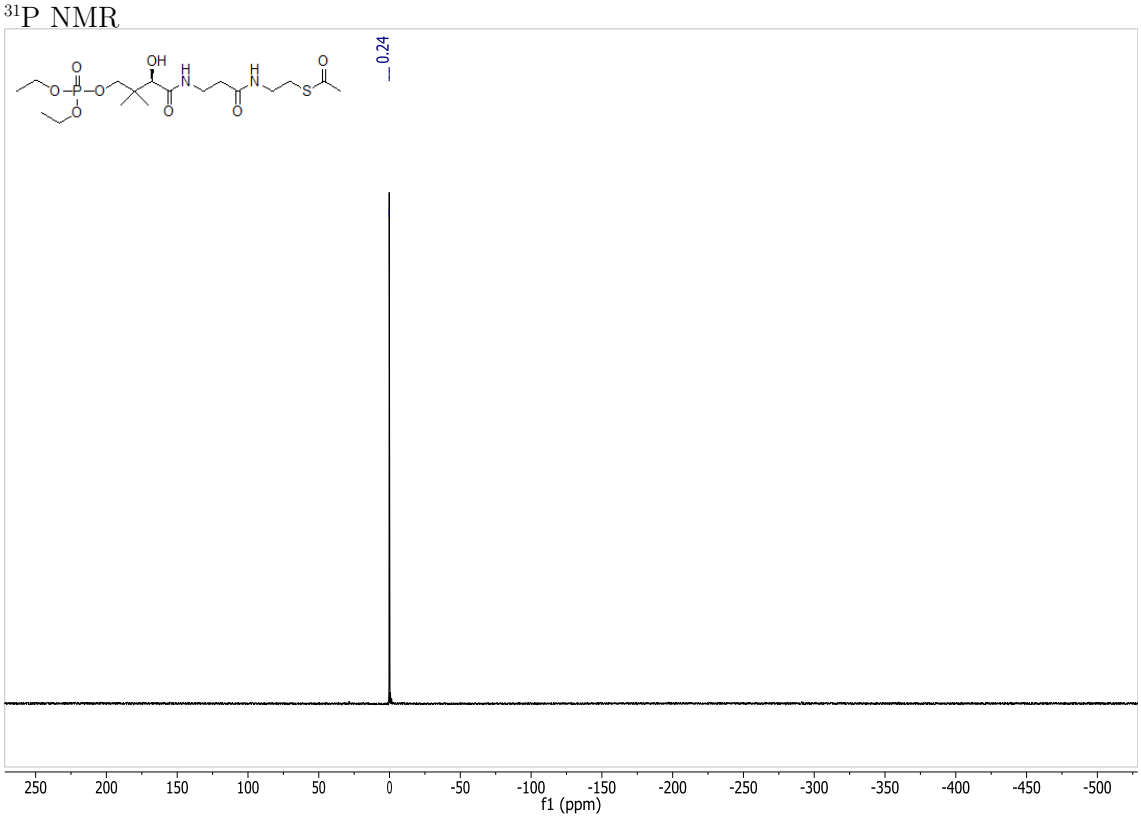
^{1}H NMR



^{13}C NMR

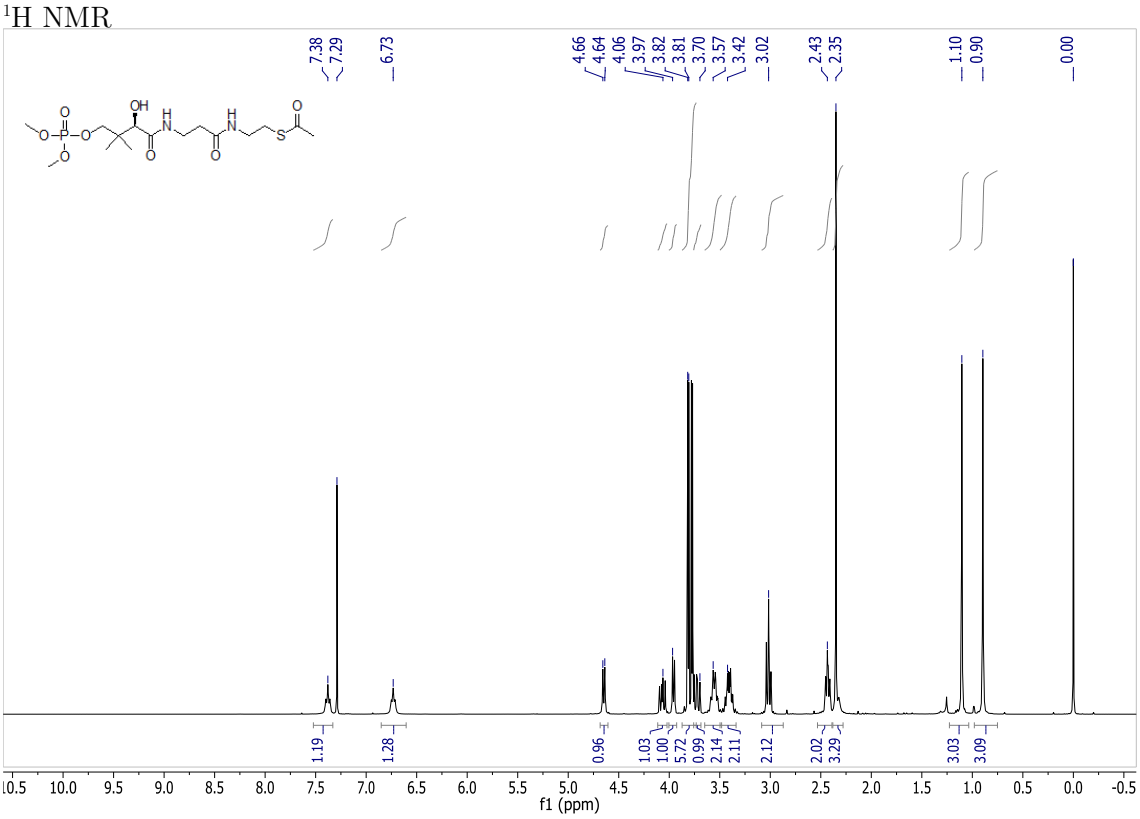


^{31}P NMR

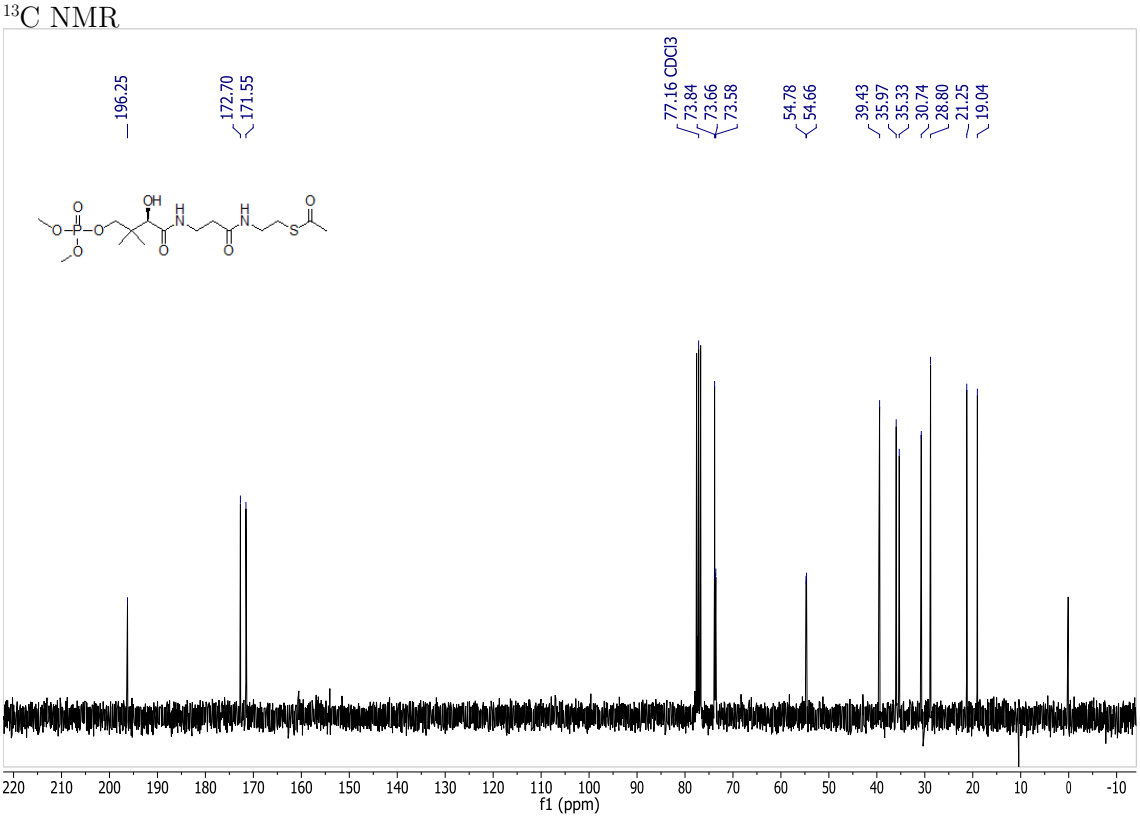

0.24
250
200
150
100
50
0
-50
-100
-150
-200
-250
-300
-350
-400
-450
-500
f1 (ppm)

(R)-S-2-(3-(4-(dimetoksifosforiloksi)-2-hidroksi-3,3-dimetilbutanamido)propanamido)etil etanetioat (16b)

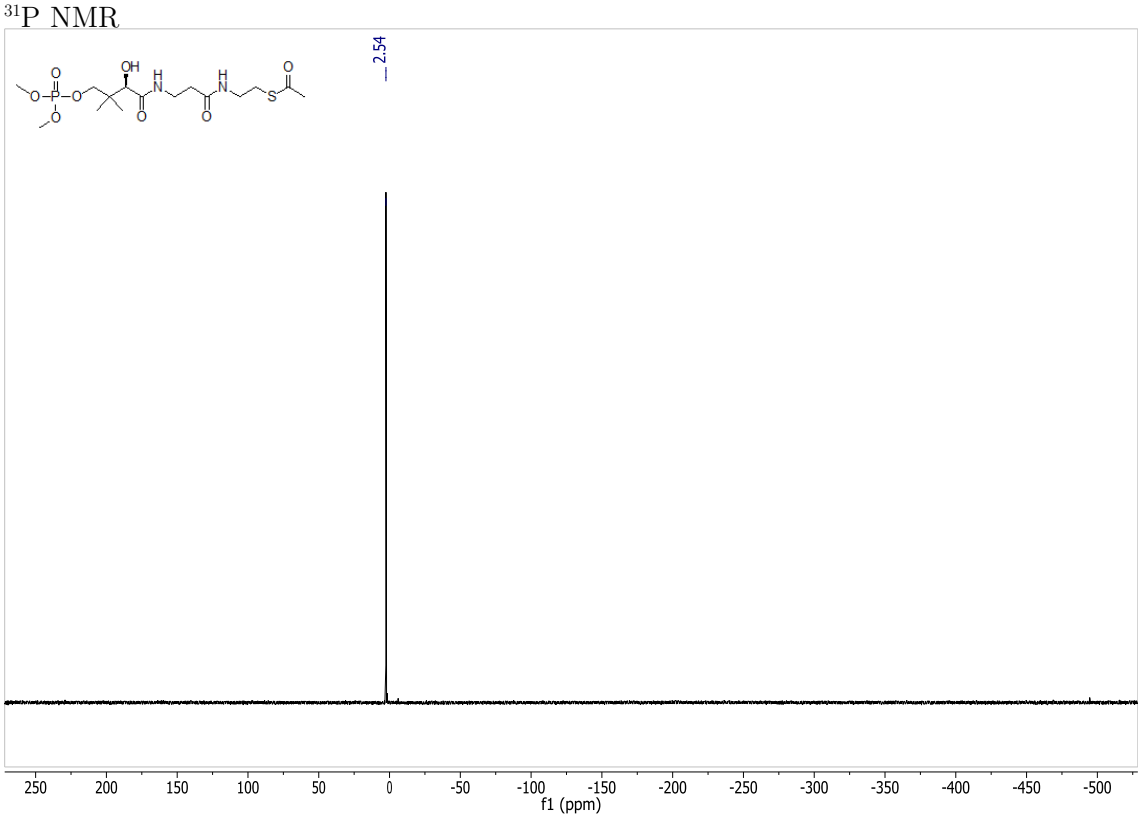
^{1}H NMR



^{13}C NMR

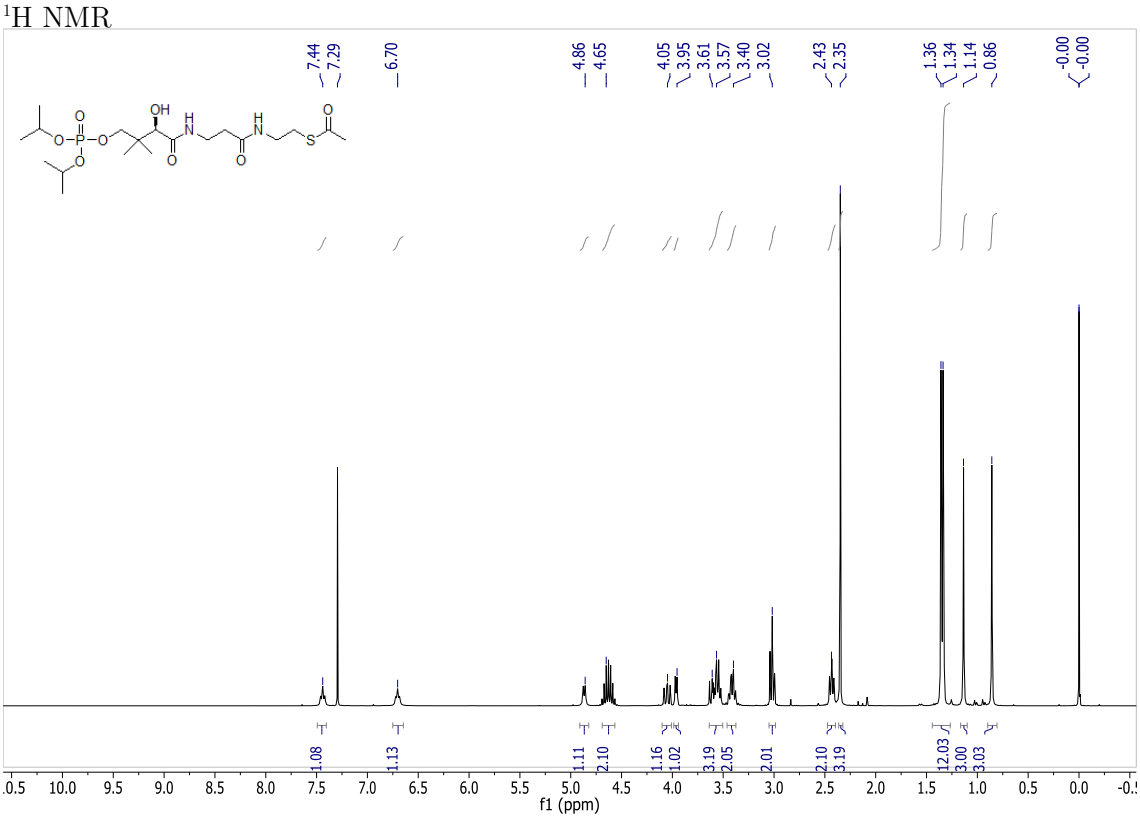


^{31}P NMR

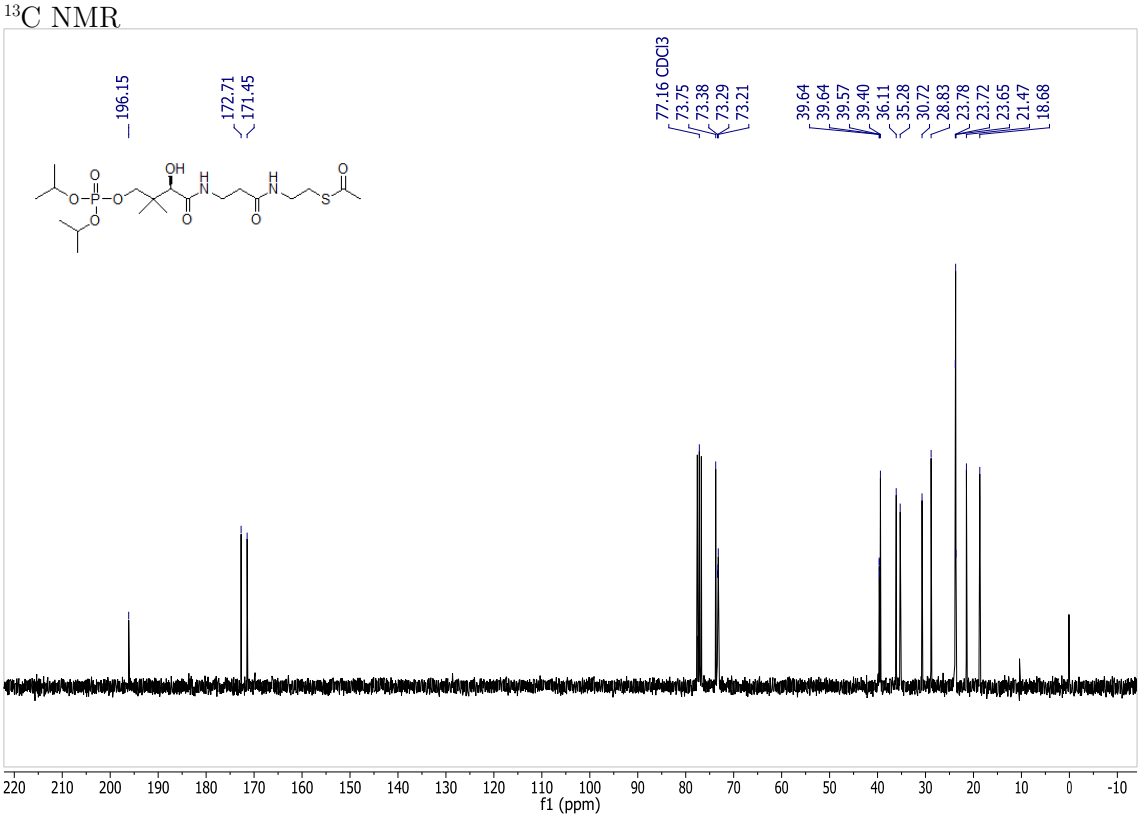

2.54
250
200
150
100
50
0
-50
-100
-150
-200
-250
-300
-350
-400
-450
-500
f1 (ppm)

(R)-S-2-(3-(4-(diizopropoksifosforiloksi)-2-hidroksi-3,3-dimetilbutanamido)propanamido)etil etanetioat (16c)

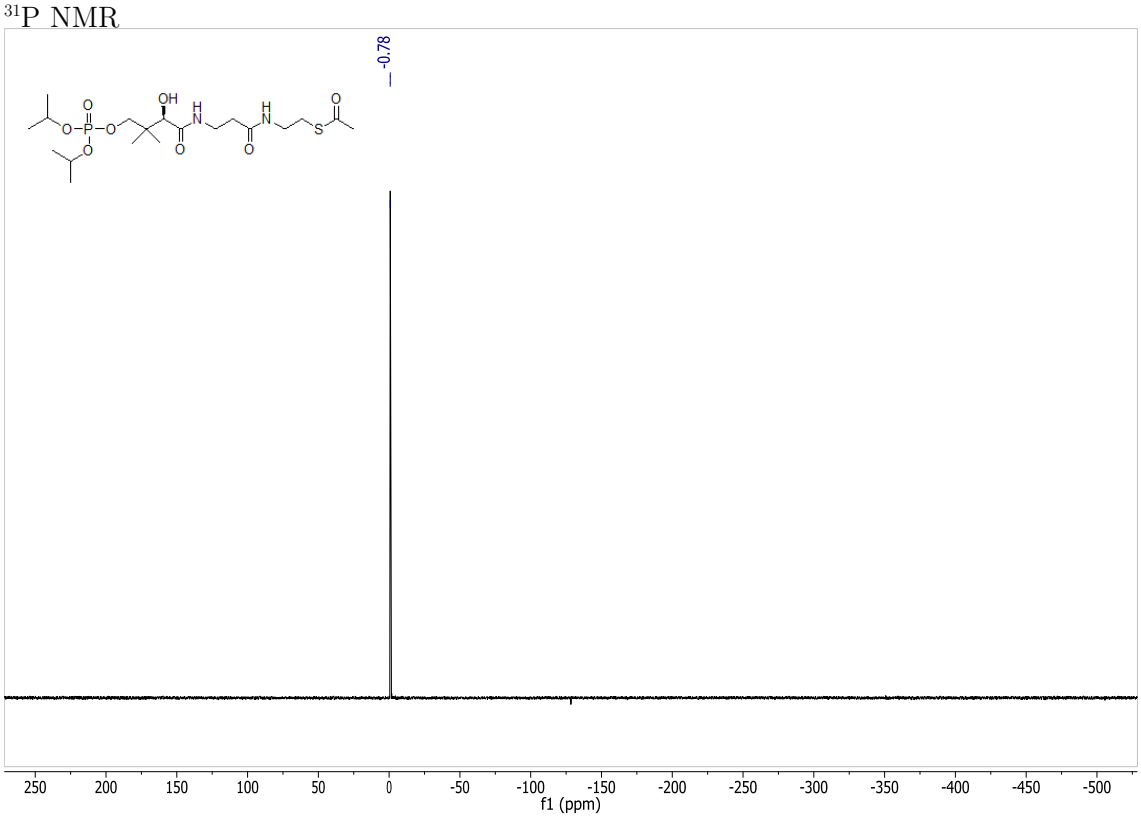
^{1}H NMR



^{13}C NMR

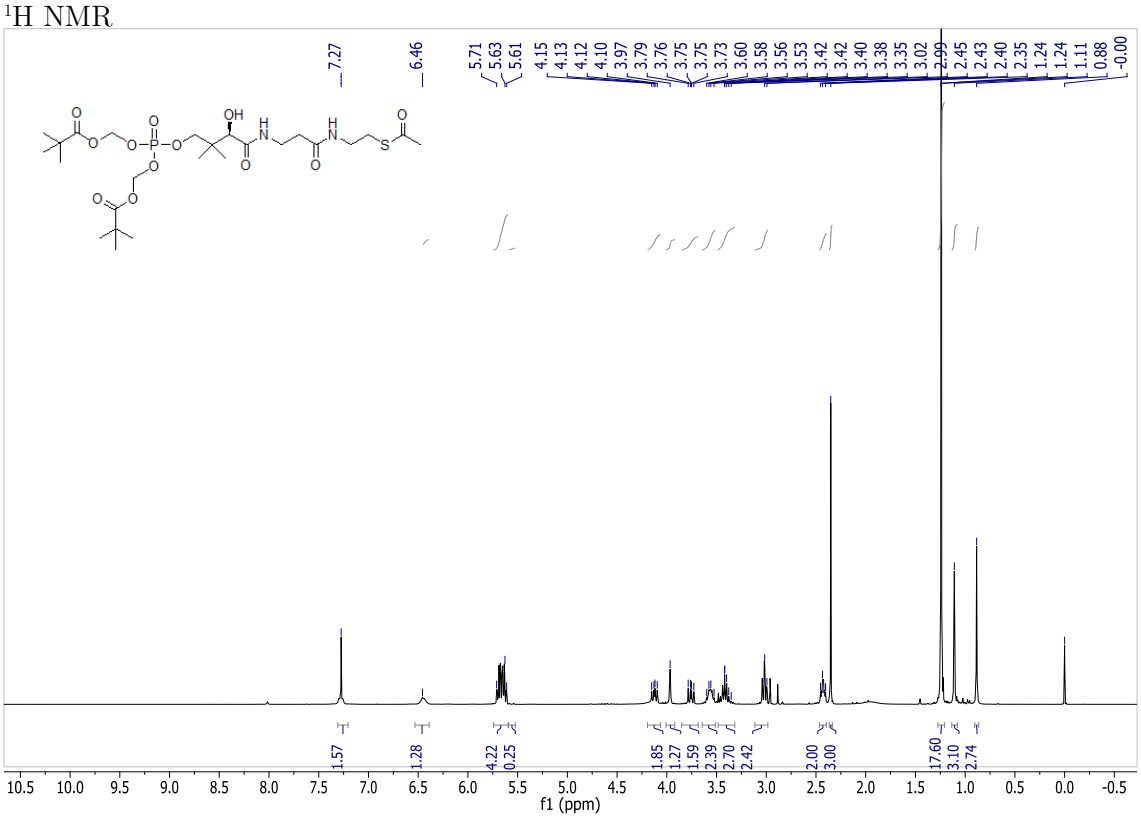


^{31}P NMR

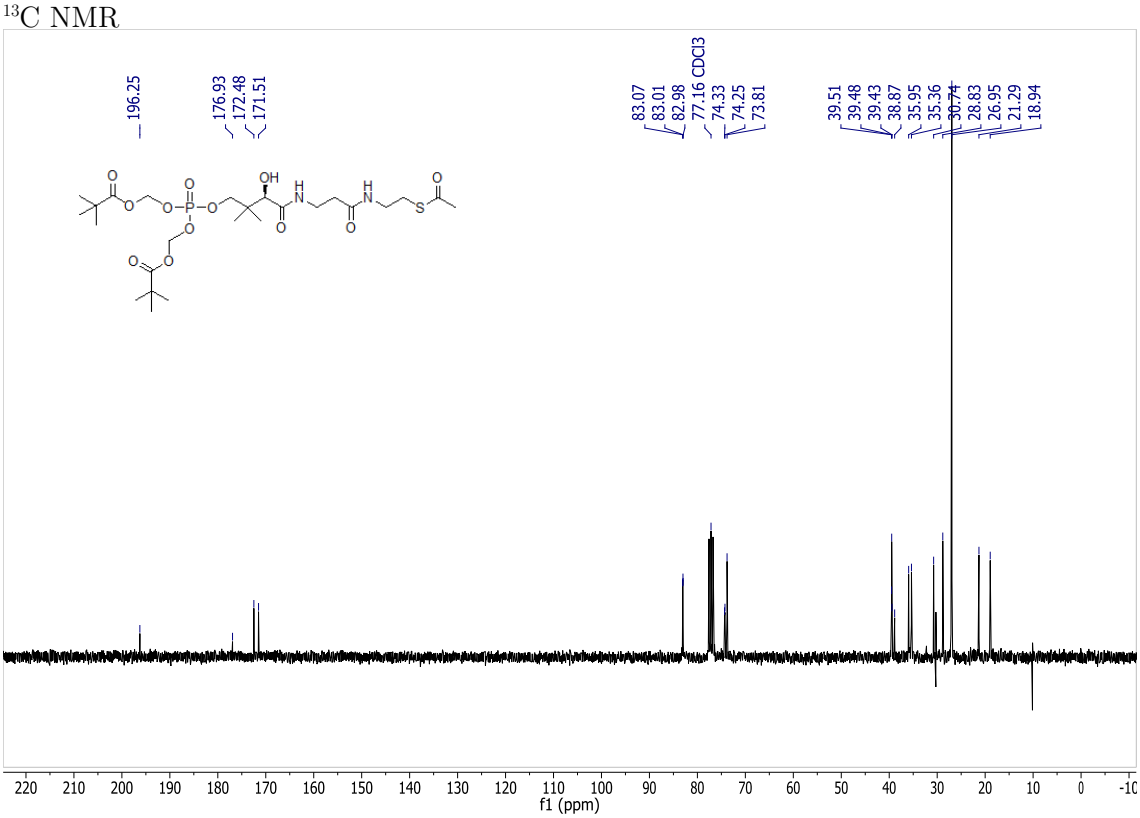

-0.78
250
200
150
100
50
0
-50
-100
-150
-200
-250
-300
-350
-400
-450
-500
f1 (ppm)

(R)-S-2-(3-(4-(di(pivaloiloksimetoksi)fosforiloksi)-2-hidroksi-3,3-dimetilbutanamido)propanamido)etil etanetioat (16b) (16d)

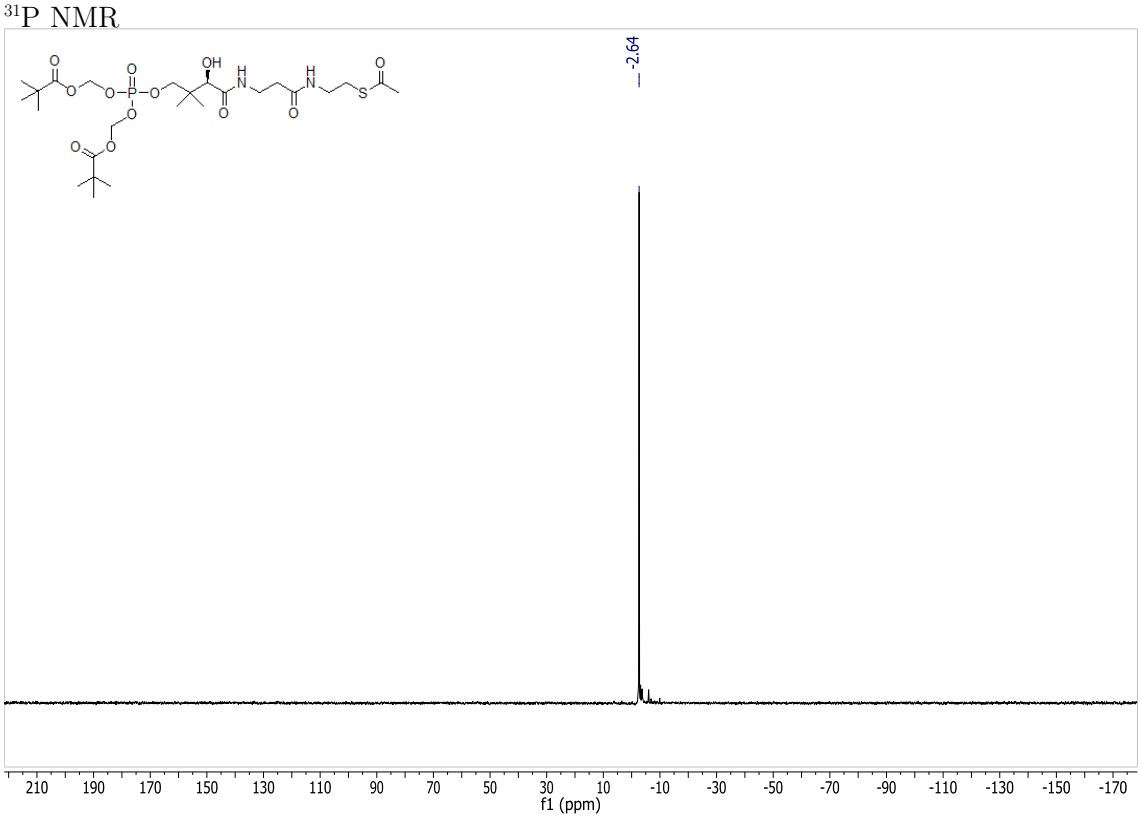
^{1}H NMR



^{13}C NMR



^{31}P NMR


-2.64
210
190
170
150
130
110
90
70
50
30
10
-10
-30
-50
-70
-90
-110
-130
-150
-170
f1 (ppm)

Literatura

[1] Williams RJ, Lyman CM, Goodyear GH, Truesdail JH, Holaday D. "Pantothenic Acid," A Growth Determinant of Universal Biological Occurrence. *Journal of the American Chemical Society.* 1933; 55 (7): 2912-2927.

[2] Spry C, Kirk K, Saliba KJ. Coenzyme A biosynthesis: an antimicrobial drug target. *FEMS Microbiology Reviews.* 2008; 32 (1): 56-106.

[3] Kelly GS. Pantothenic acid. *Altern. Med. Rev.* 2011; 16 (3): 263-274.

[4] Elvers B. Vitamins. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry - 7th Edition* Wiley-VCH Verlag GmbH; 2011.

[5] Lamson D, Ochi M, Hetherington J. The Concern about B-Vitamins Affecting the Oxidant Effect of Intravenous Ascorbate for Malignancy. *Alter. Med. Rev.* 2011; 16 (supplement ePub): 1S-5S.

[6] Kelly GS. Pantethine: A Review of its Biochemistry and Therapeutic Applications. *Altern. Med. Rev.* 1997; 2 (5): 365-376

[7] Theodoulou FL, Sibon OCM, Jackowski S, Gout I. Coenzyme A and its derivatives: renaissance of a textbook classic. *Biochemical Society Transactions.* 2014; 42 (4): 1025-1032.

[8] Leonardi R, Zhang Y-M, Rock CO, Jackowski S. Coenzyme A: Back in action. *Progress in Lipid Research.* 2005; 44 (2-3): 125-153.

[9] Srinivasan B, Sibon OCM. Coenzyme A, more than 'just' a metabolic cofactor. *Biochemical Society Transactions.* 2014; 42 (4): 1075-1079.

[10] Srinivasan B. *Rerouting 'coenzyme A' biosynthesis* [Doctoral Thesis], University of Groningen; 2015.

[11] Zhou B, Westaway SK, Levinson B, Johnson MA, Gitschier J, Hayflick SJ. A novel pantothenate kinase gene (PANK2) is defective in Hallervorden-Spatz syndrome. *Nature Genetics.* 2001; 28 (4): 345-349.

[12] Dusi S, Valletta L, Haack Tobias B, Tsuchiya Y, Venco P, Pasqualato S, Goffrini P, Tigano M, Demchenko N, Wieland T, Schwarzmayr T, Strom Tim M, Invernizzi F, Garavaglia B, Gregory A, Sanford L, Hamada J, Bettencourt C, Houlden H, Chiapparini L, Zorzi G, Kurian Manju A, Nardocci N, Prokisch H, Hayflick S, Gout I, Tiranti V. Exome Sequence Reveals Mutations in CoA Synthase as a Cause of Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation. *The American Journal of Human Genetics.* 2014; 94 (1): 11-22.

[13] Hayflick SJ. Defective pantothenate metabolism and neurodegeneration. *Biochemical Society Transactions.* 2014; 42 (4): 1063-1068.

[14] Pantothenate Kinase-Associated Neurodegeneration. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1490/ (zadnji dostop: januar 2016).

[15] Zorzi G, Nardocci N. Chapter Seven - Therapeutic Advances in Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation. *International Review of Neurobiology.* 2013; 110: 153-164.

[16] Srinivasan B, Baratashvili M, van der Zwaag M, Kanon B, Colombelli C, Lambrechts RA, Schaap O, Nollen EA, Podgorsek A, Kosec G, Petkovic H, Hayflick S, Tiranti V, Reijngoud D-J, Grzeschik NA, Sibon OCM. Extracellular 4[prime]-phosphopantetheine is a source for intracellular coenzyme A synthesis. *Nature Chemical Biology.* 2015; 11 (10): 784-792.

[17] Zano SP, Pate C, Frank M, Rock CO, Jackowski S. Correction of a genetic deficiency in pantothenate kinase 1 using phosphopantothenate replacement therapy. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2015; 116 (4): 281-288.

[18] Shimizu S, Kubo K, Tani Y, Ogata K. Purification and Properties of Pantothenate Kinase from Brevibacterium ammoniagenes IFO 12071. *Agricultural and Biological Chemistry.* 1973; 37 (12): 2863-2870.

[19] Rana A, Seinen E, Siudeja K, Muntendam R, Srinivasan B, van der Want JJ, Hayflick S, Reijngoud D-J, Kayser O, Sibon OCM. Pantethine rescues a Drosophila model for pantothenate kinase–associated neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2010; 107 (15): 6988-6993.

[20] Cornille E, Abou-Hamdan M, Khrestchatisky M, Nieoullon A, de Reggi M, Gharib B. Enhancement of L-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase activity and circulating ketone body levels by pantethine. Relevance to dopaminergic injury. *BMC Neuroscience.* 2010; 11 (1): 51.

[21] Rumberger JA, Napolitano J, Azumano I, Kamiya T, Evans M. Pantethine, a derivative of vitamin B5 used as a nutritional supplement, favorably alters low-density lipoprotein cholesterol metabolism in low– to moderate–cardiovascular risk North American subjects: a triple-blinded placebo and diet-controlled investigation. *Nutrition Research.* 2011; 31 (8): 608-615.

[22] Wittwer CT, Gahl WA, Butler JD, Zatz M, Thoene JG. Metabolism of pantethine in cystinosis. *The Journal of Clinical Investigation.* 1985; 76 (4): 1665-1672.

[23] Lira LM, Vasilev D, Pilli RA, Wessjohann LA. One-pot synthesis of organophosphate monoesters from alcohols. *Tetrahedron Letters.* 2013; 54 (13): 1690-1692.

[24] Slotin LA. Current Methods of Phosphorylation of Biological Molecules. *Synthesis.* 1977; 11: 737-752.

[25] Huttunen KM, Raunio H, Rautio J. Prodrugs—from Serendipity to Rational Design. *Pharmacological Reviews.* 2011; 63 (3): 750-771.

[26] Stella VJ, Nti-Addae KW. Prodrug strategies to overcome poor water solubility. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2007; 59 (7): 677-694.

[27] DrugBank, Fosphenytoin. http://www.drugbank.ca/drugs/DB01320 (zadnji dostop: junij 2016).

[28] DrugBank, Prednisolone. http://www.drugbank.ca/drugs/DB00860 (zadnji dostop: junij 2016).

[29] Xie W, Shao L. Phosphorylation of Corn Starch in an Ionic Liquid. *Starch - Stärke.* 2009; 61 (12): 702-708.

[30] Sung JH, Park DP, Park BJ, Choi HJ, Jhon MS. Phosphorylation of Potato Starch and Its Electrorheological Suspension. *Biomacromolecules.* 2005; 6 (4): 2182-2188.

[31] Mishra PK, Drueckhammer DG. Coenzyme A Analogues and Derivatives: Synthesis and Applications as Mechanistic Probes of Coenzyme A Ester-Utilizing Enzymes. *Chemical Reviews.* 2000; 100 (9): 3283-3310.

[32] Hayakawa, Y. In ComprehensiVe Organic Synthesis; Trost, B. M., Fleming, I., Winterfeldt, E., Eds.; Pergamon: Oxford, 1991; Vol. 6, pp 601-630.

[33] Clark VM, Hutchinson DW, Kirby AJ, Warren SG. The Design of Phosphorylating Agents. *Angewandte Chemie International Edition in English.* 1964; 3 (10): 678-685.

[34] Woolley DW. Pantothenic acid diphosphate. *Journal of Biological Chemistry.* 1940; 134 (1): 461-462.

[35] King TE, Strong FM. Phosphates of Pantothenic Acid. *Science.* 1950; 112 (2915): 562-565.

[36] King TE, Strong FM. Synthesis and properties of pantothenic acid diphosphate. *Journal of Biological Chemistry.* 1951; 189 (1): 315-323.

[37] King TE, Strong FM. Synthesis and properties of pantothenic acid monophosphates. *Journal of Biological Chemistry.* 1951; 191 (2): 515-521.

[38] Atherton FR. Process for the manufacture of pantothenic acid 4'-phosphate and its salts. Patent US 2870188 A; 1959.

[39] Baddiley J, Thain EM, Novelli GD, Lipmann F. Structure of Coenzyme A. *Nature.* 1953; 171: 76.

[40] Baddiley J, Thain EM. 323. Coenzyme A. Part VIII. The synthesis of pantetheine 4'-phosphate (acetobacter stimulatory factor), a degradation product of the coenzyme. *Journal of the Chemical Society (Resumed).* 1953; (0): 1610-1615.

[41] James B, Malcolm TE. Improvements in or relating to the manufacture of pentetheine-4-phosphate. Patent GB19530000779; 1953.

[42] Atherton FR, Openshaw HT, Todd AR. 94. Studies on phosphorylation. Part I. Dibenzyl chlorophosphonate as a phosphorylating agent. *Journal of the Chemical Society (Resumed).* 1945; (0): 382-385.

[43] Moffatt JG, Khorana HG. The total synthesis of coenzyme A. *Journal of the American Chemical Society.* 1959; 81 (5): 1265-1265.

[44] Moffatt JG, Khorana HG. Nucleoside Polyphosphates. XII.1 The Total Synthesis of Coenzyme A2. *Journal of the American Chemical Society.* 1961; 83 (3): 663-675.

[45] Michelson AM. Synthesis of coenzyme A. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 1964; 93 (1): 71-77.

[46] Günther WHH, Mautner HG. The Synthesis of Selenocoenzyme A1,2. *Journal of the American Chemical Society.* 1965; 87 (12): 2708-2716.

[47] Miller TL, Rowley GL, Stewart CJ. Coenzyme A Analogs. Synthesis of D-Oxypantetheine-4' Phosphate and Oxy-Coenzyme A1a,b. *Journal of the American Chemical Society.* 1966; 88 (10): 2299-2304.

[48] Stewart CJ, Thomas JO, Ball WJ, Aguirre AR. Coenzyme A analogs. III. Chemical synthesis of desulfopantetheine 4'-phosphate and its enzymic conversion to desulfo-coenzyme A. *Journal of the American Chemical Society.* 1968; 90 (18): 5000-5004.

[49] Okada S, Nagase O, Shimizu M. Investigations on pantothenic acid and its related compounds. VII. Chemical studies. 5. Synthesis of D-pantothenic acid 4'-phosphate. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.* 1967; 15 (5): 713-715.

[50] Yoshioka M, Samejima K, Tamura Z. A Simpler Synthesis of D-Pantothenic Acid 4'-Phosphate. *Chemical & pharmaceutical bulletin.* 1969; 17 (6): 1265-1267.

[51] Shimizu M. [55] Pantothenic acid and coenzyme A: Preparation of CoA analogs. In: Donald BM, Lemuel DW, eds. *Methods in Enzymology.* Vol 18, Part A: Academic Press; 1970: 322-338.

[52] Mautner HG. [56] Synthesis of coenzyme A analogs. In: Donald BM, Lemuel DW, eds. *Methods in Enzymology.* Vol Volume 18, Part A: Academic Press; 1970: 338-350.

[53] Hashimoto M, Mukaiyama T. A total synthesis of coenzyme A by oxidation-reduction condensation. *Chemistry Letters.* 1972; 1 (7): 595-598.

[54] Gerngross TU, Martin DP. Enzyme-catalyzed synthesis of poly[(R)-(-)-3-hydroxybutyrate]: formation of macroscopic granules in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1995; 92 (14): 6279-6283.

[55] Gao F, Yan X, Shakya T, Baettig OM, Ait-Mohand-Brunet S, Berghuis AM, Wright GD, Auclair K. Synthesis and Structure−Activity Relationships of Truncated Bisubstrate Inhibitors of Aminoglycoside 6‘-N-Acetyltransferases. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2006; 49 (17): 5273-5281.

[56] Ikehara M, Ohtsuka E. Studies on Coenzyme Analogs. XIV. A New Phosphorylating Agent, Morpholinophosphorodichloridate. *Chemical & pharmaceutical bulletin.* 1963; 11 (4): 435-440.

[57] Kopelevich VM, Zhdanovich ES, Preobrazhenskii NA. Investigations in the field of coenzyme A. V. Synthesis of 4'-phosphate-D-pantetheine. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 1967; 1 (11): 629-630.

[58] Lysenkova AV, Kopelevich VM, Gunar VI. Acyl Carriers. XV. Synthesis of S-sulfopantetheine 4′-phosphate. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 1979; 13 (1): 64-66.

[59] Tener GM. 2-Cyanoethyl Phosphate and its Use in the Synthesis of Phosphate Esters1. *Journal of the American Chemical Society.* 1961; 83 (1): 159-168.

[60] Shimizu M, Nagase O, Hosokawa Y, Tagawa H. Chemical synthesis of coenzyme A analogs of a modified cysteamine moiety. *Tetrahedron.* 1968; 24 (14): 5241-5250.

[61] Kopelevich VM, Lysenkova AV, Mishchenko VV, Gunar VI, Pron'ko PS, Moiseenok AG. Investigations in the field of acyl group carriers. XVI. hydrolytic

stability and enzymatic dephosphorylation of d-pantothenic acid 4′-phosphate. *Chemistry of Natural Compounds.* 1981; 17 (4): 360-364.

[62] Moiseenok AG, Gurinovich VA, Lysenkova AV, Gunar VI, Kopelevich VM. Biotransformation of pantothenate, pantethine, and phosphopantothenate in the livers of rats with a pantothenic acid deficiency. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 1986; 20 (12): 810-814.

[63] Michenfelder M, Rétey J. Methylmalonylcarba(dethia)-Coenzyme A as Substrate of the Coenzyme B12-Dependent Methylmalonyl-CoA Mutase: Enzymatic Rearrangement of a β- to a γ-Keto Acid. *Angewandte Chemie International Edition in English.* 1986; 25 (4): 366-367.

[64] Martini H, Rétey J. Propionylaza(dethia)coenzym A als Pseudosubstrat der biotinhaltigen Transcarboxylase. *Angewandte Chemie.* 1993; 105 (2): 287-289.

[65] Zhao Y, Michenfelder M, Rétey J. Synthesis, characterization, and enzymic conversion of nonhydrolysable analogues of propionylcoenzyme A. *Canadian Journal of Chemistry.* 1994; 72 (1): 164-169.

[66] Martin DP, Drueckhammer DG. Combined chemical and enzymic synthesis of coenzyme A analogs. *Journal of the American Chemical Society.* 1992; 114 (18): 7287-7288.

[67] Martin DP, Bibart RT, Drueckhammer DG. Synthesis of Novel Analogs of Acetyl Coenzyme A: Mimics of Enzyme Reaction Intermediates. *Journal of the American Chemical Society.* 1994; 116 (11): 4660-4668.

[68] Taguchi Y, Nishimura N, Kakimoto T, Mushika Y. Synthetic studies on phosphorylating reagent. V. A convenient synthesis of 2',3'-cyclic Coenzyme A. *Bulletin of the Chemical Society of Japan.* 1976; 49 (4): 1122-1125.

[69] Michalski J, Dabkowski W. State of the Art. Chemical Synthesis of Biophosphates and their Analogues via PIII Derivatives. In: Majoral J-P, ed. *New Aspects in Phosphorus Chemistry IV.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2004: 93-144.

[70] Khalil EM, De Angelis J, Ishii M, Cole PA. Mechanism-based inhibition of the melatonin rhythm enzyme: Pharmacologic exploitation of active site functional plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* 1999; 96 (22): 12418-12423.

[71] Cebrat M, Kim CM, Thompson PR, Daugherty M, Cole PA. Synthesis and analysis of potential prodrugs of coenzyme A analogues for the inhibition of the histone acetyltransferase p300. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2003; 11 (15): 3307-3313.

[72] Mandel AL, La Clair JJ, Burkart MD. Modular Synthesis of Pantetheine and Phosphopantetheine. *Organic Letters.* 2004; 6 (26): 4801-4803.

[73] Tautz L, Rétey J. A highly convergent synthesis of myristoyl-carba(dethia)-coenzyme A. *European Journal of Organic Chemistry.* 2010; 2010 (9): 1728-1735.

[74] Rautio J, Kumpulainen H, Heimbach T, Oliyai R, Oh D, Jaervinen T, Savolainen J. Prodrugs: design and clinical applications. *Nature Reviews: Drug Discovery.* 2008; 7 (3): 255-270.

[75] Pertusat F, Serpi M, McGuigan C. Medicinal Chemistry of Nucleoside Phosphonate Prodrugs for Antiviral Therapy. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy.* 2012; 22 (5): 181-203.

[76] Wagner CR, Iyer VV, McIntee EJ. Pronucleotides: Toward the in vivo delivery of antiviral and anticancer nucleotides. *Medicinal Research Reviews.* 2000; 20 (6): 417-451.

[77] *Nucleosides and Nucleotides as Antitumor and Antiviral Agents.* New York: Springer US; 1993.

[78] Schultz C. Prodrugs of biologically active phosphate esters. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2003; 11 (6): 885-898.

[79] Hecker SJ, Erion MD. Prodrugs of Phosphates and Phosphonates. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2008; 51 (8): 2328-2345.

[80] Krise JP, Stella VJ. Prodrugs of phosphates, phosphonates, and phosphinates. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 1996; 19 (2): 287-310.

[81] Carole A, Gilles Q, Stephane B, Cedrik G, Florence S, Jean-Louis K. New Antiviral Nucleoside Prodrugs Await Application. *Current Medicinal Chemistry.* 2003; 10 (18): 1825-1843.

[82] Maria EA. Current Prodrug Strategies for the Delivery of Nucleotides into Cells. *Drug Design Reviews - Online (Discontinued).* 2005; 2 (5): 373-387.

[83] Jansen ABA, Russell TJ. 379. Some novel penicillin derivatives. *Journal of the Chemical Society (Resumed).* 1965; (0): 2127-2132.

[84] DrugBank, Pivampicillin. http://www.drugbank.ca/drugs/DB01604 (zadnji dostop: januar 2016).

[85] Farquhar D, Srivastva DN, Kuttesch NJ, Saunders PP. Biologically reversible phosphate-protective groups. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 1983; 72 (3): 324-325.

[86] Srivastva DN, Farquhar D. Bioreversible phosphate protective groups: Synthesis and stability of model acyloxymethyl phosphates. *Bioorganic Chemistry.* 1984; 12 (2): 118-129.

[87] DrugBank, Adefovir Dipivoxil. http://www.drugbank.ca/drugs/DB00718 (zadnji dostop: april 2016).

[88] Drugs, Tenofovir Disoproxil Fumarate. http://www.drugs.com/monograph/viread.html (zadnji dostop: April).

[89] Liederer BM, Borchardt RT. Enzymes involved in the bioconversion of ester-based prodrugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2006; 95 (6): 1177-1195.

[90] Sastry JK, Nehete PN, Khan S, Nowak BJ, Plunkett W, Arlinghaus RB, Farquhar D. Membrane-permeable dideoxyuridine 5'-monophosphate analogue inhibits human immunodeficiency virus infection. *Molecular Pharmacology.* 1992; 41 (3): 441-445.

[91] Farquhar D, Khan S, Srivastva DN, Saunders PP. Synthesis and Antitumor Evaluation of Bis[(pivaloyloxy)methyl] 2'-Deoxy-5-fluorouridine 5'-Monophosphate (FdUMP): A Strategy To Introduce Nucleotides into Cells. *Journal of Medicinal Chemistry.* 1994; 37 (23): 3902-3909.

[92] Farquhar D, Chen R, Khan S. 5'-[4-(Pivaloyloxy)-1,3,2-dioxaphosphorinan-2-yl]-2'-deoxy-5-fluorouridine: A Membrane-Permeating Prodrug of 5-Fluoro-2'-deoxyuridylic Acid (FdUMP). *Journal of Medicinal Chemistry.* 1995; 38 (3): 488-495.

[93] Kang SH, Sinhababu AK, Cory JG, Mitchell BS, Thakker DR, Cho MJ. Cellular Delivery of Nucleoside Diphosphates: A Prodrug Approach. *Pharmaceutical Research.* 1997; 14 (6): 706-712.

[94] Rose JD, Parker WB, Someya H, Shaddix SC, Montgomery JA, Secrist JA. Enhancement of Nucleoside Cytotoxicity through Nucleotide Prodrugs. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2002; 45 (20): 4505-4512.

[95] Khan SR, Kumar SK, Farquhar D. Bis(carbamoyloxymethyl) Esters of 2′,3′-Dideoxyuridine 5′-monophosphate (ddUMP) as Potential ddUMP Prodrugs. *Pharmaceutical Research.* 2005; 22 (3): 390-396.

[96] Zhao S, Etzkorn FA. A phosphorylated prodrug for the inhibition of Pin1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2007; 17 (23): 6615-6618.

[97] Seo S, Onizuka K, Nishioka C, Takahashi E, Tsuneda S, Abe H, Ito Y. Phosphorylated 5-ethynyl-2'-deoxyuridine for advanced DNA labeling. *Organic & Biomolecular Chemistry.* 2015; 13 (15): 4589-4595.

[98] Rutschow S, Thiem J, Kranz C, Marquardt T. Membrane-Permeant derivatives of mannose-1-phosphate. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2002; 10 (12): 4043-4049.

[99] Hwang Y, Cole PA. Efficient Synthesis of Phosphorylated Prodrugs with Bis(POM)-phosphoryl Chloride. *Organic Letters.* 2004; 6 (10): 1555-1556.

[100] Vaino A, Biestek M, Shkreli M. Pantothenate derivatives for the treatment of neurologic disorders. Patent WO2015061792; 2015.

[101] Jenko B, Kosec. G, Petkovic H, Podgorsek Berke A, Pahor J, Cusak A, Sibon OCM, Srinivasan B. Stable pantetheine derivatives for the treatment of pantothenate kinase associated neurodegeneration (pkan) and methods for the synthesis of such compounds. Patent WO2015063177; 2015.

[102] Beigelman L, Wang G, Smith DB, Prhavc M, Jekle CA, Deval J. Substituted nucleosides, nucleotides and analogs thereof. Patent WO2015054465; 2015.

[103] Committee on toxicity of chemicals in food, consumer products and the environment, COT statement on the effects of chronic dietary exposure to methanol.
https://cot.food.gov.uk/sites/default/files/cot/cotstatementmethanol201102revjuly.pdf (zadnji dostop: maj 2016).

[104] Brass EP. Pivalate-Generating Prodrugs and Carnitine Homeostasis in Man. *Pharmacological Reviews.* 2002; 54 (4): 589-598.

[105] Roemer S, Stadler C, Rudolf MT, Jastorff B, Schultz C. Membrane-permeant analogues of the putative second messenger myo-inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1.* 1996; (14): 1683-1694.

[106] Dinkel C, Moody M, Traynor-Kaplan A, Schultz C. Membrane-Permeant 3-OH-Phosphorylated Phosphoinositide Derivatives. *Angewandte Chemie International Edition.* 2001; 40 (16): 3004-3008.

[107] Li W, Schultz C, Llopis J, Tsien RY. Membrane-permeant esters of inositol polyphosphates, chemical syntheses and biological applications. *Tetrahedron.* 1997; 53 (35): 12017-12040.

[108] Rudolf MT, Dinkel C, Traynor-Kaplan AE, Schultz C. Antagonists of myo-inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate allow repeated epithelial chloride secretion. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2003; 11 (15): 3315-3329.

[109] Ruda GF, Alibu VP, Mitsos C, Bidet O, Kaiser M, Brun R, Barrett MP, Gilbert IH. Synthesis and Biological Evaluation of Phosphate Prodrugs of 4-Phospho-D - erythronohydroxamic Acid, an Inhibitor of 6-Phosphogluconate Dehydrogenase. *ChemMedChem.* 2007; 2 (8): 1169-1180.

[110] Mentel M, Laketa V, Subramanian D, Gillandt H, Schultz C. Photoactivatable and Cell-Membrane-Permeable Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate. *Angewandte Chemie International Edition.* 2011; 50 (16): 3811-3814.

[111] Efimov VA, Aralov AV, Klykov VN, Chakhmakhcheva OG. Synthesis of RNA by the Rapid Phosphotriester Method Using Azido-Based 2′-O-Protecting Groups. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* 2009; 28 (9): 846-865.

[112] Kitas EA, Wade JD, Johns RB, Perich JW, Tregear GW. Preparation and use of N[small alpha]-fluorenylmethoxycarbonyl-O-dibenzylphosphono-L-tyrosine in continuous flow solid phase peptide synthesis. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications.* 1991; (5): 338-339.

[113] Fabio GD, Malgieri G, Isernia C, D'Onofrio J, Gaglione M, Messere A, Zarrelli A, De Napoli L. A novel synthetic strategy for monosubstituted cyclodextrin derivatives. *Chemical Communications.* 2012; 48 (32): 3875-3877.

[114] Hwang Y, Ganguly S, Ho AK, Klein DC, Cole PA. Enzymatic and cellular study of a serotonin N-acetyltransferase phosphopantetheine-based prodrug. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2007; 15 (5): 2147-2155.

[115] Ye M-C, Li L-P, Zhao Y-F, Zhai C. Iodine induced cyclization of organophosphorus compounds. *Phosphorus and Sulfur and the Related Elements.* 1988; 39 (1-2): 79-87.

[116] Boger DL, Mathvink RJ. Intramolecular acyl radical-alkene addition reactions: macrocyclization reactions. *Journal of the American Chemical Society.* 1990; 112 (10): 4008-4011.

[117] White JD, Green NJ, Fleming FF. Tin(IV)-catalyzed lactonization of ω-Hydroxy trifluoroethyl esters. *Tetrahedron Letters.* 1993; 34 (22): 3515-3518.

[118] Betley JR, Cesaro-Tadic S, Mekhalfia A, Rickard JH, Denham H, Partridge LJ, Plückthun A, Blackburn GM. Direct Screening for Phosphatase Activity by Turnover-Based Capture of Protein Catalysts. *Angewandte Chemie International Edition.* 2002; 41 (5): 775-777.

[119] Deng H, ; Evindar, Ghotas, ; Bernier, Sylvie, ; Yao, Gang, ; Coffin, Aaron, ; Yang, Hongfang, ; Acharya, Raksha, A. Agonists of the sphingosine- 1- phosphate receptor (slp) Patent WO2008016674 (A1) 2008.

[120] Abbott A, Sierakowski T, Kiddle JJ, Clark KK, Mezyk SP. Detailed Investigation of the Radical-Induced Destruction of Chemical Warfare Agent Simulants in Aqueous Solution. *The Journal of Physical Chemistry B.* 2010; 114 (22): 7681-7685.

[121] Kufelnicki A, Woźniczka M, Kalinowska-Lis U, Jezierska J, Ochocki J. Synthesis, acid–base and complexing properties with Cu(II), Co(II) and Zn(II) in aqueous solution of a novel 1H-benzimidazol-2-ylmethyl diethyl phosphate ligand: Comparison with other 2-substituted benzimidazole ligands. *Polyhedron.* 2013; 53: 20-25.

[122] Jie MHGBTY. Synthesis of Chiral Amphetamine Derivatives by Stereospecific, Regioselective Cuprate Addition Reaction with Aziridine Phosphoramidate Compounds Patent US2015183716 (A1); 2015.

[123] Marshall JA, Peterson JC, Lebioda L. Synthesis of triannulanes via intramolecular [2 + 1] cyclizations of large-ring cycloalkenes. *Journal of the American Chemical Society.* 1984; 106 (20): 6006-6015.

[124] Murahashi S, Taniguchi Y, Imada Y, Tanigawa Y. Palladium(0)-catalyzed azidation of allyl esters. Selective synthesis of allyl azides, primary allylamines, and related compounds. *The Journal of Organic Chemistry.* 1989; 54 (14): 3292-3303.

[125] Paik I-H, Xie S, Shapiro TA, Labonte T, Narducci Sarjeant AA, Baege AC, Posner GH. Second Generation, Orally Active, Antimalarial, Artemisinin-Derived Trioxane Dimers with High Stability, Efficacy, and Anticancer Activity. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2006; 49 (9): 2731-2734.

[126] Maslak V, Tokic-Vujosevic Z, Saicic RN. Palladium-catalyzed cross-couplings of allylic phosphates. *Tetrahedron Letters.* 2009; 50 (16): 1858-1860.

[127] Fahrig Rudolf LD, ; Rolfs Andreas, ; Dieks Henrik, ; Teubner Janek, ; Heinrich Joerg-Christian, ; Heinrich Jorg-Christian. Nucleosides for suppressing or reducing the development of resistance in cytostatic therapy Patent US2010227834 (A1); 2010.

[128] Shang R, Huang Z, Xiao X, Lu X, Fu Y, Liu L. β-Aryl Nitrile Construction via Palladium-Catalyzed Decarboxylative Benzylation of α-Cyano Aliphatic Carboxylate Salts. *Advanced Synthesis & Catalysis.* 2012; 354 (13): 2465-2472.

[129] Parry RJ, Burns MR, Jiralerspong S, Alemany L. Synthesis of (+)-(1S)-1-pyrophosphoryl-(2R, 3R)-2,3-dihydroxy-(4S)-4-(phosphoryloxymethyl)cyclopentane, a stable, optically-active carbocyclic analog of 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP). *Tetrahedron.* 1997; 53 (21): 7077-7088.

[130] Rigas B. Anti-inflammatory compounds and uses thereof Patent WO2009023631 (A1); 2009.

[131] Walker SR, Jiao W, Parker EJ. Synthesis and evaluation of dual site inhibitors of 3-deoxy-d-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2011; 21 (17): 5092-5097.

[132] Andya V, Pravinchandra, ; Richhariya, Santosh, ; Divya, Prabhakar, ; Meeran, Hashim, Nizar, Poovanathil, Nagoor, ; Tewari, Neera. Novel intermediates for the preparation of hmg-coa reductase inhibitors Patent WO2011132172 (A1); 2011.

[133] Basil R. Phospho-ester derivatives and uses thereof. Patent US2013225529 (A1); 2013.

[134] Pisarek S, Bednarski H, Gryko D. An Efficient Method for Phosphorylation of Alcohols: Preparation of Por-phyrin-Derived Phosphates. *Synlett.* 2012; 23 (18): 2667-2671.

[135] Parry RJ, Burns MR, Skae PN, Hoyt JC, Pal B. Carbocyclic analogues of d-ribose-5-phosphate: Synthesis and behavior with 5-phosphoribosyl α-1-pyrophosphate synthetases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 1996; 4 (7): 1077-1088.

[136] Soliveri G, Bertolotti A, Panza L, Poletti L, Jones C, Lay L. Synthesis of phosphorylated fragments of Streptococcus pneumoniae type 19F capsular polysaccharide. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1.* 2002; (19): 2174-2181.

[137] Andrew Dicks, Hent A. *Green Chemistry Metrics: A Guide to Determining and Evaluating Process Greenness.* 1 ed: Springer International Publishing; 2015.

[138] ICH, Impurities: Guedeline for residual solvents. http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/impurities-guideline-for-residual-solvents.html (zadnji dostop: maj 2016).

[139] Residual solvents - US Pharmacopeial Convention. http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/generalChapter467Current.pdf (zadnji dostop: marec 2016).

[140] Dhineshkumar J, Prabhu KR. Cross-Hetero-Dehydrogenative Coupling Reaction of Phosphites: A Catalytic Metal-Free Phosphorylation of Amines and Alcohols. *Organic Letters.* 2013; 15 (23): 6062-6065.

[141] Leonardi R, Rehg JE, Rock CO, Jackowski S. Pantothenate Kinase 1 Is Required to Support the Metabolic Transition from the Fed to the Fasted State. *PLoS ONE.* 2010; 5 (6): e11107.

[142] Manesh K. Compounds and compositions for the treatment of autoimmune and chronic metabolic diseases. Patent WO2014087323; 2013.

[143] Nicolaou KC, Mathison CJN. Synthesis of Imides, N-Acyl Vinylogous Carbamates and Ureas, and Nitriles by Oxidation of Amides and Amines with Dess–Martin Periodinane. *Angewandte Chemie International Edition.* 2005; 44 (37): 5992-5997.

[144] Dumbala Srinivasa Reddy, Kashinath Komirishetty, Pandrangi SS. Process for the preparation of aminoacrylic acid derivatives. Patent US20140256976 A1; 2014.

[145] Reichstein T, Grüssner A. Polyoxy-acyl-derivate des β-Alanins. *Helvetica Chimica Acta.* 1940; 23 (1): 650-657.

[146] Ojima I, Kogure T, Terasaki T, Achiwa K. Effective biomimetic route to D-(+)-pantothenate using asymmetric hydrogenation catalyzed by a chiral rhodium complex in the key step. *The Journal of Organic Chemistry.* 1978; 43 (18): 3444-3446.

[147] Hyun Cho J, Coats SJ, Pradere U, Schinazi RF, Zhang H, Zhou L. Purine monophosphate prodrugs for treatment of viral infections. Patent WO2012158811; 2012.

[148] Moumne R, Lavielle S, Karoyan P. Efficient Synthesis of β 2-Amino Acid by Homologation of α -Amino Acids Involving the Reformatsky Reaction and Mannich-Type Imminium Electrophile. *The Journal of Organic Chemistry.* 2006; 71 (8): 3332-3334.

[149] Clement B, Lopian K. Characterization of in Vitro Biotransformation of New, Orally Active, Direct Thrombin Inhibitor Ximelagatran, an Amidoxime and Ester Prodrug. *Drug Metabolism and Disposition.* 2003; 31 (5): 645-651.

[150] Gibaldi M, Lee M, Desai A, Pharmacists ASoH-S. *Gibaldi's Drug Delivery Systems in Pharmaceutical Care.* Bethesda, Maryland: American Society of Health-System Pharmacists; 2007.

[151] DrugBank, Enalapril. http://www.drugbank.ca/drugs/DB00584 (zadnji dostop: may 2016).

[152] DrugBank, Oseltamivir. http://www.drugbank.ca/drugs/DB00198 (zadnji dostop: maj 2016).

[153] Serafinowska HT, Ashton RJ, Bailey S, Harnden MR, Jackson SM, Sutton D. Synthesis and in Vivo Evaluation of Prodrugs of 9-[2-(Phosphonomethoxy)ethoxy]adenine. *Journal of Medicinal Chemistry.* 1995; 38 (8): 1372-1379.

[154] Saliba Kevin J, Spry C. Exploiting the coenzyme A biosynthesis pathway for the identification of new antimalarial agents: the case for pantothenamides. *Biochemical Society Transactions.* 2014; 42 (4): 1087-1093.

[155] Moolman Wessel JA, de Villiers M, Strauss E. Recent advances in targeting coenzyme A biosynthesis and utilization for antimicrobial drug development. *Biochemical Society Transactions.* 2014; 42 (4): 1080-1086.

[156] Yan X, Akinnusi TO, Larsen AT, Auclair K. Synthesis of 4[prime or minute]-aminopantetheine and derivatives to probe aminoglycoside N-6[prime or minute]-acetyltransferase. *Organic & Biomolecular Chemistry.* 2011; 9 (5): 1538-1546.

[157] Walton E, Wilson AN, Holly FW, Folkers K. Synthesis of Pantetheine and S-Acetylpantetheine. *Journal of the American Chemical Society.* 1954; 76 (4): 1146-1148.

[158] Heidlindemann M, Hammel M, Scheffler U, Mahrwald R, Hummel W, Berkessel A, Gröger H. Chemoenzymatic Synthesis of Vitamin B5-Intermediate (R)-Pantolactone via Combined Asymmetric Organo- and Biocatalysis. *The Journal of Organic Chemistry.* 2015; 80 (7): 3387-3396.

[159] Sanyal I, Barman PD, Banerjee AK. Enantiodivergent Syntheses of Pantolactone and Pantothenic Acid from d-Mannitol. *Synthesis.* 2012; 44 (07): 1102-1108.

[160] Agarwal V, Diethelm S, Ray L, Garg N, Awakawa T, Dorrestein PC, Moore BS. Chemoenzymatic Synthesis of Acyl Coenzyme A Substrates Enables in Situ Labeling of Small Molecules and Proteins. *Organic Letters.* 2015; 17 (18): 4452-4455.

Bibliografija

Objave v povezavi z delom

Članki v revijah

PAHOR, Jerca, STAVBER, Stojan, ČUSAK, Alen, KOSEC, Gregor, PETKOVIĆ, Hrvoje, PODGORŠEK, Ajda. Toward the efficient synthesis of new phosphopantothenate derivatives by using chlorophosphate reagents. *Synthesis*, ISSN 0039-7881, [v tisku] 2016, str., ilustr., doi: 10.1055/s-0035-1562437. [COBISS.SI-ID 4655736], [JCR, SNIP] .

Patentna prijava

JENKO, Branko, KOSEC, Gregor, PETKOVIĆ, Hrvoje, PODGORŠEK, Ajda, PAHOR, Jerca, ČUSAK, Alen, SIBON, Oda Cornelia Maria, SRINIVASAN, Balaji. *Stable pantetheine derivatives for the treatment of pantothenate kinase associated neurodegeneration (PKAN) and methods for the synthesis of such compounds: patentna prijava WO 2015/063177 A1.* [Geneve]: World Intellectual Property Organization, 7. maj 2015. 26, 3, 5 str., ilustr. [COBISS.SI-ID 28577319]

Prispevek na konferenci

PAHOR, Jerca, PODGORŠEK, Ajda, ČUSAK, Alen, KOSEC, Gregor, PETKOVIĆ, Hrvoje, STAVBER, Stojan. Razvoj metod za pripravo aciloksialkilnih predzdravil fosfatov ter uporaba topil, primernih za farmacevtsko industrijo. V: PAVLIN, Majda (ur.), et al. *Zbornik : 1. del = Proceedings : part 1.* Ljubljana: Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana, 2016, str. 81-90. http://ipssc.mps.si/2016/Proceedings8_IPSSC_2016_Part1.pdf. [COBISS.SI-ID 29529383]

Povzetek prispevka na konferenci

PAHOR, Jerca, STAVBER, Stojan, PODGORŠEK, Ajda. Efficient synthesis of isobutyriloksimetil prodrugs of phosphates. V: PRPAR MIHEVC, Sonja (ur.), PRUNK, Mateja (ur.), PUNGERČAR, Jože (ur.). *10th Young researchers' day, 31 March, 2016, Ljubljana : program and abstract book.* Ljubljana: Institut Jožef Stefan, 2016, str. 38. [COBISS.SI-ID 29406247]

PAHOR, Jerca, STAVBER, Stojan, PODGORŠEK, Ajda. New approaches to the synthseis of aciloksialkyl prodrugs of phosphates. V: CHAUDHARY, Sandeep (ur.), JOSHI, Jyoti (ur.). *International Conferences on Current Challenges in Drug Discovery Research : CCDDR 2015, 23-25 November 2015, Jaipur, Rajasthan (India).* New Delhi: Excel India Publishers, 2015, str. 89. [COBISS.SI-ID 29084455]

Druge objave

Prispevek na konferenci

PAHOR, Jerca, STAVBER, Gaj, STAVBER, Stojan. Aerobno oksidativno jodiranje organskih spojin, katalizirano z dušikovo(V) kislino = Aerobic oxidative iodinantion of organic compounds catalysed with nitric(V) acid. V: KRAVANJA, Zdravko (ur.), BRODNJAK-VONČINA, Darinka (ur.), BOGATAJ, Miloš (ur.). *Slovenski kemijski dnevi 2012, Portorož, 12.-14. september 2012 = Slovenian Chemical Days 2012, Portorož, September 12-14, 2012.* Maribor: FKKT, 2012, 11 str. [COBISS.SI-ID 26092327]

Povzetek prispevka na konferenci

PAHOR, Jerca, STAVBER, Gaj, STAVBER, Stojan. Aerobic oxidative iodinantion of organic copounds catalysed with nitric(V) acid. V: CIPKEBIP - Centre of Excellence for Integrated Approaches in Chemistry and Biology of Proteins, Third Annual Conference, 15-16 November 2012, Ljubljana. RUPNIK, Maja (ur.), TUŠAR, Livija (ur.), TURK, Dušan (ur.).*Immune response and host microbiota in disease development.* Ljubljana: Centre of Excellence for Integrated Approaches in Chemistry and Biology of Proteins, 2012, str. 39. [COBISS.SI-ID 26285863]

Diplomska naloga

PAHOR, Jerca. *Aerobno oksidativno jodiranje organskih spojin, katalizirano z dušikovo(V) kislino : diplomsko delo.* Ljubljana: [J. Pahor], 2012. 65 f., ilustr. [COBISS.SI-ID 36192773]

Biografija

Rodila sem se 20. 3. 1988 v Šempetru pri Gorici. Maturirala sem leta 2007 na Gimnaziji Škofja Loka ter se vpisala na univerzitetni študijski program Kemija na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani. Študij sem zaključila 7. 9. 2012 z diplomo iz organske kemije pod mentorstvom doc. dr. Janeza Cerkovnika in somentorstvom prof. dr. Stojana Stavberja. Oktobra istega leta sem se vpisala na doktorski študij na Mednarodni podiplomski šoli Jožefa Stefana, smer Ekotehnologija, ter se z decembrom zaposlila na Odseku za fizikalno in organsko kemijo na Inštitutu "Jožef Stefan". Pod mentorstvom doc. dr. Ajde Podgoršek Berke ter prof. dr. Stojana Stavberja sem opravila raziskovanje za doktorsko disertacijo s področja organske kemije.

Stvarno kazalo

Aciloksialkilni klorofosfatni reagenti
bis(POM) klorofosfat **4a**, 32, 47
bis(*i*-BOM) klorofosfat **4b**, 33
sinteza, 50
fosforiliranje alkoholov, 41
fosforiliranje v manj strupenih topilih, 44
fosforiliranje fosfopantotenata 10, 69

Derivati fosfopantotenata z maskirano fosfatno skupino, 61
alkilne in fenilne maskirne skupine, 65
POM maskirne skupine, 68
i-BOM maskirne skupine, 69

Derivati fosfopanteteina z maskirano fosfatno skupino, 70
alkilne in fenilne maskirne skupine, 72
POM maskirne skupine, 73

Etil D-pantotenat **10**, 62

S-acetilpantetein **15**, 71