



Imię i nazwisko autora rozprawy: **Joanna Stefaniak-Skorupa**
Dyscyplina naukowa: **Nauki Chemiczne**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: **„Nowe potencjalne chemoterapeutyki przeciwdrobnoustrojowe oparte na strukturze aminokwasów”**

Tytuł rozprawy w języku angielskim: **“Novel potential antimicrobials based on the amino acid scaffold.”**

Promotor

podpis

prof. dr hab. inż. Maria J. Milewska

Gdańsk, rok 2025



OŚWIADCZENIE

Autor rozprawy doktorskiej: Joanna Stefaniak-Skorupa

Ja, niżej podpisany(a), oświadczam, iż jestem świadomy(a), że zgodnie z przepisem art. 27 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (t.j. Dz.U. z 2021 poz. 1062), uczelnia może korzystać z mojej rozprawy doktorskiej zatytułowanej:

„Nowe potencjalne chemoterapeutyki przeciwdrobnoustrojowe oparte na strukturze aminokwasów.”

do prowadzenia badań naukowych lub w celach dydaktycznych.¹

Świadomy(a) odpowiedzialności karnej z tytułu naruszenia przepisów ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych i konsekwencji dyscyplinarnych określonych w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2021.478 t.j.), a także odpowiedzialności cywilno-prawnej oświadczam, że przedkładana rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie.

Oświadczam, że treść rozprawy opracowana została na podstawie wyników badań prowadzonych pod kierunkiem i w ścisłej współpracy z promotorem prof. dr hab. inż. Marią J. Milewską.

Niniejsza rozprawa doktorska nie była wcześniej podstawą żadnej innej urzędowej procedury związanej z nadaniem stopnia doktora.

Wszystkie informacje umieszczone w ww. rozprawie uzyskane ze źródeł pisanych i elektronicznych, zostały udokumentowane w wykazie literatury odpowiednimi odnośnikami, zgodnie z przepisem art. 34 ustawy o prawie autorskim i prawach pokrewnych.

Potwierdzam zgodność niniejszej wersji pracy doktorskiej z załączoną wersją elektroniczną.

Gdańsk, dnia.....

Podpis doktoranta

Ja, niżej podpisana, wyrażam zgodę na umieszczenie ww. rozprawy doktorskiej w wersji elektronicznej w otwartym, cyfrowym repozytorium instytucjonalnym Politechniki Gdańskiej.

Gdańsk, dnia.....

Podpis doktoranta

¹ Art. 27. 1. Instytucje oświatowe oraz podmioty, o których mowa w art. 7 ust. 1 pkt 1, 2 i 4–8 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, mogą na potrzeby zilustrowania treści przekazywanych w celach dydaktycznych lub w celu prowadzenia działalności naukowej korzystać z rozpowszechnionych utworów w oryginale i w tłumaczeniu oraz zwielokrotnić w tym celu rozpowszechnione drobne twory lub fragmenty większych utworów.

2. W przypadku publicznego udostępniania utworów w taki sposób, aby każdy mógł mieć do nich dostęp w miejscu i czasie przez siebie wybranym korzystanie, o którym mowa w ust. 1, jest dozwolone wyłącznie dla ograniczonego kręgu osób uczących się, nauczających lub prowadzących badania naukowe, zidentyfikowanych przez podmioty wymienione w ust.



OPIS ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Autor rozprawy doktorskiej: Joanna Stefaniak-Skorupa

Tytuł rozprawy doktorskiej w języku polskim: „Nowe potencjalne chemoterapeutyki przeciwdrobnoustrojowe oparte na strukturze aminokwasów.”

Tytuł rozprawy w języku angielskim: “Novel potential antimicrobials based on the amino acid scaffold.”

Język rozprawy doktorskiej: polski

Promotor rozprawy doktorskiej: prof. dr hab. inż. Maria J. Milewska

Data obrony: r. 2026

Słowa kluczowe rozprawy doktorskiej w języku polskim: siderofory, chemoterapeutyki przeciwgrzybowe, synteza organiczna, łącznik „trimethyl lock”, szlak biosyntezy L-metioniny

Słowa kluczowe rozprawy doktorskiej w języku angielskim: siderophores, antifungal chemotherapeutics, organic synthesis, „trimethyl lock” linker, L-methionine biosynthesis pathway

Streszczenie rozprawy w języku polskim: Coraz większa liczba bakterii i grzybów wykazuje wielolekooporność, co znacząco ogranicza dostępne możliwości terapeutyczne. Z tego względu niezbędne jest projektowanie i poszukiwanie nowych środków przeciwdrobnoustrojowych oraz doskonalenie tych już dostępnych. W niniejszej pracy opisano badania, których celem było opracowanie i synteza nowych związków o potencjalnym działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Obejmowało to projektowanie i otrzymanie koniugatów związków o strukturze aminokwasów z nośnikami molekularnymi, a także potencjalnych inhibitorów wybranych enzymów szlaku biosyntezy L-metioniny (MBP). Przedstawione wyniki badań wskazują, że zaproponowany syntetyczny siderofor hydroksamowy może służyć jako skuteczny nośnik molekularny w syntezie koniugatów potencjalnych chemoterapeutyków. Koniugaty te stanowią nowy typ układu prolekowego, przy czym są zdolne do skutecznego penetrowania komórek grzybowych z rodzaju *Candida*. Połączenia zawierające labilny łącznik wykazały, że są one łatwo rozkładane w bezkomórkowym ekstrakcie *C. albicans*, natomiast połączenia zawierające inhibitor enzymatyczny wykazały aktywność przeciwgrzybową. Ponadto w ramach niniejszej pracy zaproponowano i przeprowadzono syntezę pięciu aminokwasów, jako potencjalnych inhibitorów wybranych enzymów MBP. Dwa z tych związków okazały się stosunkowo silnymi inhibitorami sulfhydrylazy O-acetylohomoserynowej Met15p.



Streszczenie rozprawy w języku angielskim: An increasing number of bacterial and fungal micro-organisms exhibit multidrug resistance, significantly limiting available therapeutic options. Therefore, it is essential to design and discover new antimicrobial agents, as well as to improve the existing ones. This PhD thesis describes research aimed at the development and synthesis of novel compounds with potential antimicrobial activity. The research project involved design and synthesis of conjugates of amino acid–based compounds with molecular carriers, as well as potential inhibitors targeting specific enzymes in the L-methionine biosynthesis pathway (MBP). The results obtained suggest that the synthetic hydroxamate siderophore can be utilized as an effective molecular carrier for the synthesis of compounds exhibiting antifungal activity. These conjugates represent a new type of prodrugs and can effectively penetrate fungal cells of the *Candida* spp. Conjugates featuring a labile linker were easily cleaved in cell-free extracts of *C. albicans*, as well as conjugates containing the enzymatic inhibitor showed an antifungal activity. Furthermore, in this study the synthesis of five amino acid structures as potential inhibitors of selected MBP enzymes was proposed. Two of these compounds were found to be relatively potent inhibitors of O-acetyl-L-homoserine sulfhydrylase Met15p.

Pragnę serdecznie podziękować prof. dr hab. inż. Marii Milewskiej za życzliwość, cierpliwość i nieocenione wsparcie podczas realizacji mojej pracy. Pani cenne wskazówki oraz konstruktywna krytyka pozwoliły mi nie tylko pogłębić moją wiedzę, ale również rozwijać umiejętności badawcze i analityczne.

Chciałabym również podziękować dr inż. Andrzejowi Skwareckiemu za inspirację, motywację oraz poświęcony czas, który umożliwił mi skuteczną prowadzenie badań i ukończenie projektu badawczego. Pańskie zaangażowanie było dla mnie nieocenionym wsparciem w całym procesie tworzenia pracy.

Serdecznie dziękuję także prof. dr hab. inż. Sławomirowi Milewskiemu oraz dr hab. inż. Iwonie Gabriel za wszelką pomoc, wskazówki oraz rady, które znacząco przyczyniły się do pomyślnej realizacji mojego projektu badawczego.

Ponadto pragnę wyrazić wdzięczność wszystkim pracownikom Katedry Technologii Leków i Biochemii oraz Katedry Chemii Organicznej za codzienną życzliwość, wsparcie i inspirującą atmosferę pracy.

Na koniec składam wyrazy wdzięczności mojej rodzinie i przyjaciołom za ich nieustające wsparcie. Wasza obecność, słowa otuchy i zachęty były dla mnie nieocenionym źródłem siły i motywacji, bez których realizacja tej pracy byłaby o wiele trudniejsza.

Spis Treści

Streszczenie	12
Abstract.....	13
Finansowanie	14
Wykaz stosowanych skrótów	15
1. Przegląd literaturowy.....	17
1.1. Strategia „Konia Trojańskiego” w projektowaniu nowych potencjalnych związków przeciwdrobnoustrojowych.....	18
1.2. Siderofory jako małowcząsteczkowe organiczne nośniki molekularne	21
1.2.1. Właściwości chelatujące sideroforów	24
1.2.2. Mechanizmy pobierania żelaza z wykorzystaniem sideroforów.....	27
1.2.3. Połączenia siderofor-chemoterapeutyk	33
1.3. Układy „trimethyl lock” jako rozszczepialne łączniki organiczne.....	39
1.3.1. Układy TML rozszczepiane za pomocą esteraz	40
1.3.2. Układy TML rozszczepiane za pomocą fosfataz	41
1.3.3. Układy TML rozszczepiane za pomocą oksydoreduktazy chinonowej. 42	
1.3.4. Pozostałe układy TML.....	44
1.4. Projektowanie nowych, potencjalnych inhibitorów enzymatycznych w oparciu o nowe cele molekularne.....	46
1.4.1. Szlak biosyntezy L-metioniny	47
1.4.2. Enzymy szlaku biosyntezy L-metioniny jako nowe potencjalne cele molekularne.....	48
2. Cel i zakres pracy.....	50
3. Wyniki i dyskusja.....	52
3.1. Planowanie struktur i dobór składników koniugatów sideroforów.....	53
3.1.1. Synteza nośnika molekularnego – sideroforu hydroksamowego ω -N-acetylo- ω -N-hydroksy-L-ornityny	57
3.1.2. Synteza pochodnych przeciwgrzybowych i przeciw-bakteryjnych inhibitorów enzymatycznych oraz markera fluorescencyjnego.....	62
3.1.3. Synteza bezpośrednich połączeń siderofor hydroksamowy-cząsteczka transportowana	64
3.1.4. Synteza rozszczepialnego łącznika „trimethyl lock”	68

3.1.5. Synteza połączeń siderofor-inhibitor enzymatyczny z wykorzystaniem rozszczepialnego łącznika TML.....	69
3.2. Wyniki badania właściwości biologicznych otrzymanych koniugatów sideroforów.....	75
3.2.1. Badanie wnikania koniugatów sideroforów do wnętrza komórek drobnoustrojów.....	75
3.2.2. Badanie rozkładów enzymatycznych koniugatów sideroforów	78
3.2.3. Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej koniugatów sideroforów	82
3.3. Planowanie struktur potencjalnych inhibitorów enzymatycznych wybranych enzymów szlaku MBP.....	85
3.3.1. Synteza potencjalnych inhibitorów enzymatycznych szlaku biosyntezy L-metioniny.....	87
3.4. Wyniki badania właściwości biologicznych otrzymanych potencjalnych inhibitorów szlaku biosyntezy L-metioniny.....	93
3.4.1. Badanie efektu inhibicji aktywności wybranych enzymów szlaku biosyntezy L-metioniny.....	93
3.4.2. Badanie aktywności przeciwgrzybowej wybranych potencjalnych inhibitorów szlaku biosyntezy L-metioniny.....	94
4. Podsumowanie i wnioski końcowe	98
5. Część eksperymentalna	101
5.1. Informacje ogólne.....	101
5.2. Przepisy preparatywne.....	102
5.2.1. Synteza sideroforu ω -N-acetylo- ω -N-hydroksy-L-ornityny.....	102
5.2.2. Synteza pochodnych 4-cyjanotryptofanu	106
5.2.3. Synteza pochodnych cispentacyny	108
5.2.4. Synteza pochodnych O-karbamoilo-D-seryny.....	110
5.2.5. Synteza N-terminalnych połączeń ω -N-acetylo- ω -N-hydroksy-L-ornityny z cząsteczką transportowaną	113
5.2.6. Synteza C-terminalnych połączeń ω -N-acetylo- ω -hydroksy-L-ornityny z cząsteczką transportowaną	116
5.2.7. Synteza rdzenia układu TML	121
5.2.8. Synteza C-terminalnych połączeń ω -N-acetylo- ω -N-hydroksy-L-ornityny z łącznikiem TML oraz cząsteczką transportowaną	123
5.2.9. Synteza N-terminalnych połączeń ω -N-acetylo- ω -hydroksy-L-ornityny z łącznikiem TML oraz cząsteczką transportowaną.....	133
5.2.10. Synteza potencjalnych inhibitorów enzymatycznych szlaku biosyntezy L-metioniny.....	143

Literatura	156
Dorobek naukowy	174

Streszczenie

Oporność drobnoustrojów na antybiotyki stanowi jedno z najpoważniejszych wyzwań współczesnej medycyny. Coraz większa liczba bakterii i grzybów wykazuje wielolekooporność, co znacząco ogranicza dostępne możliwości terapeutyczne. Z tego względu niezbędne jest projektowanie i poszukiwanie nowych środków przeciwdrobnoustrojowych oraz doskonalenie tych już dostępnych. Wiele skutecznych inhibitorów enzymów mikroorganizmów nie wykazuje działania przeciwdrobnoustrojowego z powodu słabej penetracji przez błony komórkowe. Obiecującym rozwiązaniem tego problemu jest strategia prolekowa, która pozwala zwiększyć transport substancji aktywnej do wnętrza komórki patogenu. Jednym z jej wariantów jest tzw. strategia „Konia Trojańskiego”, która polega na transporcie leku w postaci koniugatu. Jest on połączeniem nośnika molekularnego i cząsteczki aktywnej, zazwyczaj uwalnianej w wyniku reakcji chemicznej lub enzymatycznej, co pozwalają jej na osiągnięcie celu molekularnego.

W niniejszej pracy opisano badania, których celem było opracowanie i synteza nowych związków o potencjalnym działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Obejmowało to projektowanie i otrzymanie koniugatów związków o strukturze aminokwasów z nośnikami molekularnymi, a także potencjalnych inhibitorów wybranych enzymów szlaku biosyntezy L-metioniny.

Na podstawie przedstawionych wyników można wysnuć wnioski, że zaproponowany syntetyczny siderofor hydroksamowy ω -N-acetylo- ω -N-hydroksy-L-ornityna (AHO) może służyć jako skuteczny nośnik molekularny w syntezie koniugatów potencjalnych chemoterapeutyków. Cząsteczka aktywna jest przyłączana do C- lub N-końca uproszczonego sideroforu na dwa sposoby: albo bezpośrednio, albo z użyciem rozszczepialnego łącznika „trimethyl lock” (TML). Koniugaty AHO:TML stanowią nowy typ układu prolekowego, przy czym są zdolne do skutecznego penetrowania komórek grzybowych z rodzaju *Candida*. Połączenia zawierające labilny łącznik TML wykazały, że są one łatwo rozkładane w bezkomórkowym ekstrakcie *C. albicans*, natomiast połączenia zawierające inhibitor przeciwgrzybowy – cispentacynę wykazały aktywność przeciwgrzybową.

Ponadto w ramach niniejszej pracy zaproponowano i przeprowadzono syntezę pięciu aminokwasów, jako potencjalnych inhibitorów wybranych enzymów szlaku biosyntezy L-metioniny. Dwa z tych związków, w tym N^4 -acetylowa pochodna kwasu 2,4-diaminobutanowego oraz 1,2-oksazol-5-on-2-ylowa pochodna alaniny, okazały się stosunkowo silnymi inhibitorami sulfhydrylasy *O*-acetylo-L-homoserynowej Met15p. Dodatkowo pochodna alaniny wykazuje aktywność przeciwgrzybową w wyniku hamowania aktywności enzymu Met15p.

Abstract

Microbial resistance to antibiotics represents one of the most serious challenges facing modern medicine. An increasing number of bacterial and fungal micro-organisms exhibit multidrug resistance, significantly limiting available therapeutic options. Therefore, it is essential to design and discover new antimicrobial agents, as well as to improve the existing ones. Many effective inhibitors of microbial enzymes do not exhibit antimicrobial activity due to the poor penetration through cell membranes. A promising solution to this problem is the prodrug strategy, which enables delivery of an active substance into pathogen cells. One variant of this approach is the so-called “Trojan Horse” strategy, in which a conjugate molecule consists of a molecular carrier and an active compound, which is usually released upon chemical or enzymatic reaction, enabling it to reach its molecular target.

This PhD thesis describes research aimed at the development and synthesis of novel compounds with potential antimicrobial activity. The research project involved design and synthesis of conjugates of amino acid-based compounds with molecular carriers, as well as potential inhibitors targeting specific enzymes in the L-methionine biosynthesis pathway.

The results obtained suggest that the synthetic hydroxamate siderophore ω -N-acetyl- ω -N-hydroxy-L-ornithine (AHO) can be utilized as an effective molecular carrier for the synthesis of compounds exhibiting antifungal activity. The AHO molecule can be directly attached to either the C- or N-terminus of the siderophore or via a cleavable “trimethyl lock” (TML) linker. AHO:TML conjugates represent a new type of prodrugs and can effectively penetrate fungal cells of the *Candida* spp. Conjugates featuring the labile TML linker were easily cleaved in cell-free extracts of *C. albicans*. Furthermore, conjugates containing the antifungal inhibitor cispentacin showed an antifungal activity.

Furthermore, in this study the synthesis of five amino acid structures as potential inhibitors of selected enzymes in the L-methionine biosynthetic pathway was proposed. Two of these compounds, including *N*⁴-acetyl derivative of 2,4-diaminobutanoic acid and 1,2-oxazol-5-on-2-yl alanine derivative, were found to be relatively potent inhibitors of *O*-acetyl-L-homoserine sulfhydrylase Met15p. Additionally, the alanine derivative exhibits antifungal activity by inhibiting the activity of Met15p enzyme.

Finansowanie

Badania zaprezentowane w tej rozprawie doktorskiej były częściowo finansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu nr „UMO-2020/39/B/NZ7/01519”



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Wsparcie finansowe realizacji niniejszych badań udzielone zostało również przez Politechnikę Gdańską w ramach grantu „DEC-9/2021/IDUB/I.3.3”, finansowanego z programu Argentum Triggering Research Grants – „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza”.

ARGENTUM TRIGGERING RESEARCH GRANTS

Znaczna część aparatury wykorzystanej podczas prowadzonych badań (Mikroskop konfokalny Zeiss LSM T-PMT, chromatograf cieczowy Teledyne CombiFlash NextGen 300+ oraz spektrometr mas Agilent Triple Quad LC/MS) została sfinansowana dzięki hojności Fundacji Foster i prof. Ryszarda Andruszkiewicza.



Wykaz stosowanych skrótów

Ac	acetyl
ADP	adenozyno-5'-difosforan
AHO	ω - <i>N</i> -acetylo- ω - <i>N</i> -hydroksy-L-ornityna
ATP	adenozynotrifosforan
Bn	grupa benzylowa
Boc	grupa <i>tert</i> -butoksykarbonylowa
bs	szeroki sygnał
Cbz	grupa benzyloksykarbonylowa
Cch	cytochalazyna D
CNTrp	4-cyjanotryptofan
CoA	koenzym A
CP	cispentacyna, kwas (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-2-aminocyklopentanokarboksylowy
CPP	peptydy penetrujące komórki
CPT	kamptotecyna
d	dublet
DAD	detektor z zestawem diod (<i>ang.</i> diode array detector)
DCC	<i>N,N</i> -dicykloheksylokarbodiimid
DCM	dichlormetan
DEPBT	3-dietoksyfosforyloksy-1,2,3-benzotriazyn-4(3 <i>H</i>)-on
DIAD	azodikarboksylanu diizopropylu
DIPEA	<i>N,N</i> -dizopropyluetyloamina
DMAP	4-dimetyloaminopirydyna
DMF	<i>N,N</i> -dimetyloformamid
DMSO	dimetylosulfotlenek
DNA	kwasu deoksyrybonukleinowy
EDCI	1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropylu)karbodiimid
EDTA	kwas (etylenodiamino)tetraoctowy
ESI	jonizacja typu elektrosprej
Et	grupa etylowa
FER	ferrichrom
HBTU	heksafluorofosforan benzotriazolu tetrametylouroniowego
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa
HSer	L-homoseryna
IE	inhibitor enzymatyczny
iPr	grupa izopropylowa
KR	kwas rodotorulowy
KSer	<i>O</i> -karbamoilo-D-seryna
LC	chromatografia cieczowa

m	multiplet
m/z	stosunek masy jonu do jego ładunku
MBP	szlak biosyntezy L-metioniny
Me	grupa metylowa
L-Met	L-metionina
MIC₅₀	minimalne stężenie hamujące wzrost drobnoustrojów w 50%
MIC₉₀	minimalne stężenie hamujące wzrost drobnoustrojów w 90%
MS	spektrometria mas
MSA	kwas metanosulfonowy
NADP⁺	fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NADPH	fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego w formie zredukowanej
NMR	jądrowy rezonans magnetyczny
PCC	chlorochromian(VI) pirydyny
PEG	glikol polietylenowy
PIDA	diacetoksyjodobenzen
PMB	grupa <i>para</i> -metylobenzylowa
PMF	siła protonomotoryczna
Ph	grupa fenylowa
q	kwartet
qi	kwintet
RNA	kwas rybonukleinowy
RPMI	<i>ang.</i> Roswell Park Memorial Institute
s	singlet
Ser	L-seryna
SF	sonda fluorescencyjna
L-GluONa	glutaminian sodu
t	tryplet
t_{1/2}	okres połowicznego rozpadu
TBDMS	grupa <i>tert</i> -butylodimetylosililowa
<i>t</i>Bu	grupa <i>tert</i> -butylowa
TFA	kwas trifluoroctowy
TFP	trifluoperazyna
TH-folian	5,6,7,8-tetrahydrofolian
THF	tetrahydrofuran
TLC	chromatografia cienkowarstwowa
TML	<i>ang.</i> trimethyl lock
Troc	grupa 2,2,2-trichloroetoksykarboksylowa
tt	temperatura topnienia
tw	temperatura wrzenia
YNB	<i>ang.</i> Yeast Nitrogen Base

1. Przegląd literaturowy

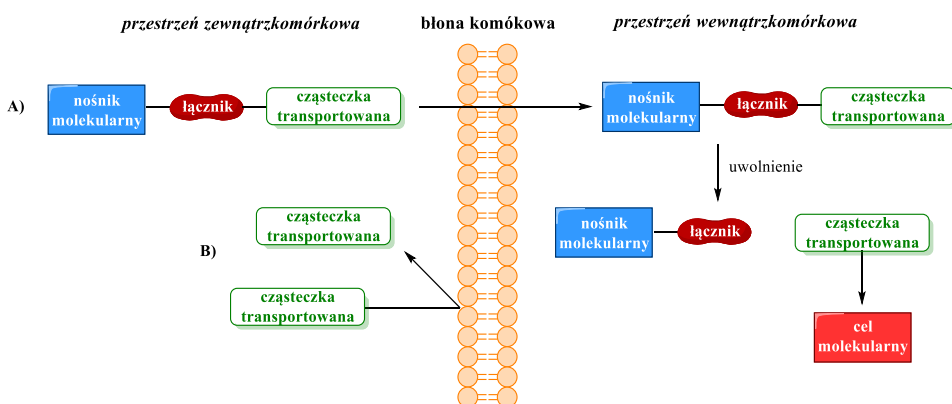
Oporność drobnoustrojów na antybiotyki stanowi obecnie jedno z głównych zagrożeń dla zdrowia publicznego na świecie. Ze względu na szybkie tempo rozprzestrzeniania zjawisko lekooporności może być w skutkach katastrofalne dla współczesnej medycyny i jej możliwości terapeutycznych. Stosowane antybiotyki mogą stać się nieskuteczne nawet w przypadku drobnych chorób zakaźnych, których leczenie stanowić będzie w przyszłości wyzwanie.¹ Warto zaznaczyć, że lekooporność zagraża również takim dziedzinom medycyny, jak transplantologia czy onkologia.

Do najbardziej niebezpiecznych drobnoustrojów chorobotwórczych charakteryzujących się często występującą lekoopornością można zaliczyć wielolekooporne bakterie Gram-ujemne, takie jak: *Acinetobacter*, *Pseudomonas* i *Enterobacteriae* oraz grzyby chorobotwórcze, w tym lekooporne *Candida albicans*, *Candida glabrata* i coraz częściej pojawiająca się *Candida auris*. Dodatkowo, drobnoustroje drożdżopodobne, np. z rodzaju *Candida*, wywołują grzybice układowe, które są szczególnie niebezpieczne dla pacjentów z obniżoną odpornością (np. cierpiących na choroby prowadzące do niedoborów odporności lub poddawanych terapiom immunosupresyjnym, takim jak terapia przeciwnowotworowa czy sterydowa).² Ze względu na późne rozpoznanie i bardzo ograniczony zestaw skutecznych leków przeciwgrzybiczych,³ leczenie grzybic układowych jest niezwykle trudne. Co więcej, stosowane klinicznie leki przeciwgrzybicze, takie jak flukonazol, kaspofungina czy 5-fluorocytozyna, mogą utracić skuteczność z powodu narastającego zjawiska wielolekooporności.

W przypadku wielolekoopornych bakterii Gram-ujemnych, białka błony zewnętrznej (poryny) ulegają ciągłym zmianom wskutek zwiększonej liczby mutacji.^{4,5} Zmniejszenie rozmiarów poryn ogranicza lub całkowicie uniemożliwia przenikanie antybiotyków przez zewnętrzną błonę komórkową, co dodatkowo zwiększa oporność bakterii. Podobnie, jak w przypadku lekoopornych grzybów chorobotwórczych – terapie kliniczne wykorzystujące aktualnie dostępne środki przeciwbakteryjne mogą nie wykazywać pożądaných rezultatów. Dlatego też istnieje potrzeba projektowania lub odkrywania nowych leków przeciwdrobnoustrojowych, a także udoskonalania już istniejących.

1.1. Strategia „Konia Trojańskiego” w projektowaniu nowych potencjalnych związków przeciwdrobnoustrojowych

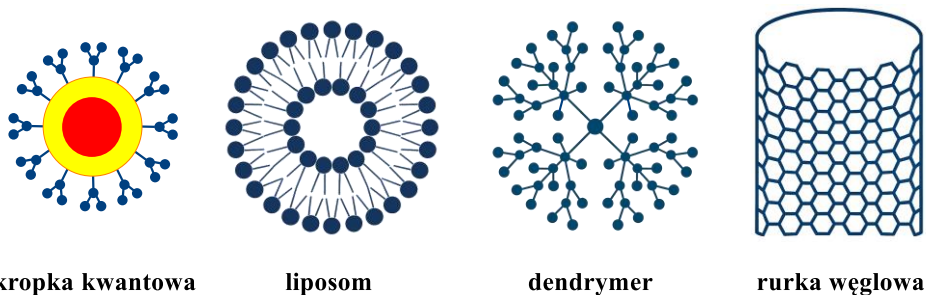
Wiele związków organicznych będących skutecznymi inhibitorami enzymów, katalizujących kluczowe reakcje w szlakach metabolicznych mikroorganizmów chorobotwórczych, nie wykazuje aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Przyczyną takiego zjawiska może być niewystarczająca penetracja inhibitorów enzymatycznych przez błony komórkowe drobnoustrojów. Jedną z najbardziej obiecujących strategii projektowania leków przeciwdrobnoustrojowych jest podejście prolekowe. Strategia ta pozwala na przewyższenie jednej z najbardziej niekorzystnych cech patogenów lekoopornych, a mianowicie zmniejszonej przepuszczalności błony komórkowej. W jednej z odmian tego podejścia, znanej jako strategia „Konia Trojańskiego”,⁶ cząsteczka proleku jest projektowana jako połączenie nośnika molekularnego oraz cząsteczki transportowanej (*ang.* cargo), zazwyczaj substancji aktywnej biologicznie, która oddziałuje z określonym celem wewnątrzkomórkowym. Oba komponenty mogą być połączone w sposób, który umożliwia uwolnienie cząsteczki transportowanej w pobliżu celu molekularnego w wyniku chemicznego lub enzymatycznego rozszczepienia koniugatu (Rys. 1.1).



Rys. 1.1 A) Schemat działania koniugatu zgodnie z ideą strategii „Konia Trojańskiego”. B) Brak transportu cząsteczki aktywnej przez błonę komórkową.

Istnieje szeroka gama łączników i nośników molekularnych,^{7,8} które znacznie różnią się pod względem budowy, jak i sposobem połączenia ze sobą. Wybór odpowiednich związków zależy od wielu czynników, zarówno wewnątrz- jak i zewnątrzkomórkowych. Jednakże dobór odpowiedniego nośnika, który jest rozpoznawalny i transportowany przez komórki bakteryjne czy grzybowe może pozwolić na przewyższenie zwiększonej lekooporności drobnoustrojów

chorobotwórczych. Jak dotąd, zaproponowano wiele rodzajów nośników molekularnych, w tym takie, które wykorzystują naturalnie występujące mechanizmy transportu transbłonowego u drobnoustrojów, jak np. wychwyt oligopeptydów⁹ lub systemy pozyskiwania jonów za pośrednictwem sideroforów.¹⁰ Wśród szerokiego spektrum dostępnych nośników można wyróżnić zarówno struktury nieorganiczne, jak i organiczne, zróżnicowane również rozmiarami – od form małocząsteczkowych po wielkocząsteczkowe układy (Rys. 1.2).



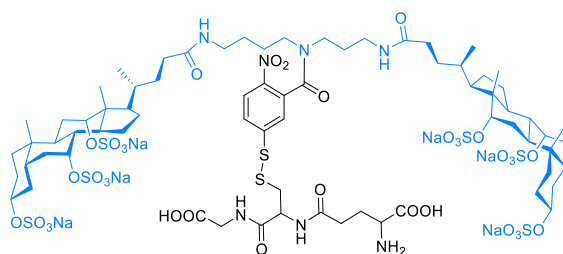
Rys. 1.2 Schematyczne przedstawienie struktur wybranych nośników molekularnych.

Nieorganiczne nośniki molekularne wykorzystywane do projektowania koniugatów zgodnie z ideą strategii „Konia Trojańskiego” to zazwyczaj wielkocząsteczkowe struktury połączone niekowalencyjnie z cząsteczką transportowaną. Przedstawicielami tej grupy nośników są m. in. kropki kwantowe oraz nanocząstki srebra, złota lub tlenku żelaza.¹¹⁻¹⁵ Mechanizm transportu nanocząstek oparty jest na dyfuzyjnym przenikaniu błon biologicznych wynikającym z ich niewielkich rozmiarów. Odpowiednia modyfikacja powierzchni takiego nośnika pozwala na przyłączenie związków aktywnych biologicznie, które następnie są transportowane do wnętrza żywych komórek. Kropki kwantowe (Rys. 1.2) to nanoskalowe struktury półprzewodnikowe, których właściwości fizykochemiczne pozwalają na monitorowanie lokalizacji koniugatów z ich udziałem w przestrzeni wewnątrzkomórkowej.¹⁶

Kolejną grupę nośników stanowią makromolekularne struktury organiczne, do których zalicza się m. in. nanorurki węglowe,¹⁷⁻²⁰ liposomy^{21,22} oraz dendrymery²³⁻²⁵ (Rys. 1.2). Ze względu na ich budowę można przeprowadzać ich modyfikację na drodze syntezy organicznej, co stanowi istotną przewagę nad nośnikami nieorganicznymi – metody syntetyczne charakteryzują się większą różnorodnością i elastycznością w projektowaniu funkcjonalnych systemów transportowych w porównaniu do metod syntezy związków nieorganicznych. Nanorurki węglowe to wydłużone, cylindryczne struktury zbudowane z atomów węgla o hybrydyzacji sp^2 , których powierzchnia może być funkcjonalizowana, co umożliwia przyłączenie cząsteczek transportowanych. Hydrofobowy charakter

tych nośników pozwala na przenikanie błon biologicznych bez ich uszkodzenia. Liposomy natomiast to fosfolipidowe pęcherzyki zdolne do transportu substancji umieszczonych w ich wnętrzu na drodze endocytozy. Dendrymery są zbudowane z wysoko rozgałęzionych polimerów o zdefiniowanej strukturze, zakończonych grupami funkcyjnymi podatnymi na modyfikacje. Podobnie jak liposomy, są zdolne do transportu związków aktywnych na drodze endocytozy.

W skład ostatniej, najliczniejszej grupy nośników molekularnych wchodzi związek organiczny o małej masie cząsteczkowej, często wykorzystujące specyficzne mechanizmy transportu transbłonowego drobnoustrojów. Głównymi reprezentantami tej grupy są peptydy penetrujące komórki (CPP),^{26,27} siderofory^{28,29} oraz parasole molekularne.^{30,31} Siderofory to naturalnie występujące substancje produkowane i wydzielane przez mikroorganizmy bakteryjne, grzybowe oraz roślinne w odpowiedzi na niedobór jonów żelaza (III) w przestrzeni pozakomórkowej.³² Są one zdolne do kompleksowania tych jonów i transportowania ich do wnętrza komórki. Peptydy penetrujące składają się z krótkich sekwencji 5-30 reszt aminokwasowych, z wyraźną przewagą aminokwasów zasadowych, takich jak arginina lub lizyna. Mechanizm transportu tych struktur do wnętrza komórki nie jest do końca znany, ale prawdopodobnie przenikają przez błony na drodze dyfuzji lub endocytozy.³³ Parasole molekularne (Rys. 1.3) to związki o charakterze amfifilowym, zbudowane z co najmniej dwóch reszt steroidowych, zazwyczaj kwasu cholowego lub deoksycholowego, które są połączone ze sobą za pomocą poliaminowego łańcucha (sperminy lub spermidyny). Amfifilowa natura parasoli molekularnych wymusza specyficzne zmiany konformacyjne struktury zależne od polarności otaczającego środowiska, co w efekcie pozwala na maskowanie polarnego charakteru cząsteczki transportowanej, umożliwiając jej przenikanie przez dwuwarstwę lipidową.



Rys. 1.3 Struktura koniugatu parasol molekularny – cząsteczka transportowana. Parasol zaznaczono na niebiesko.

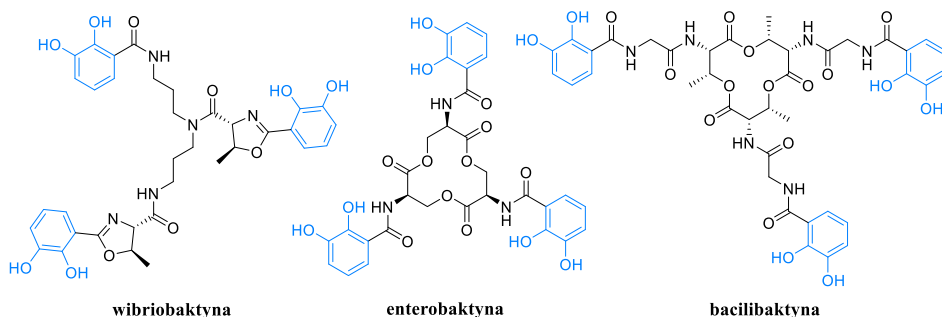
1.2. Siderofory jako małowcząsteczkowe organiczne nośniki molekularne

Żelazo jest niezbędnym elementem dla prawidłowego wzrostu i funkcjonowania zarówno organizmów eukariotycznych, jak i wielu prokariotycznych, biorącym udział w wielu istotnych procesach komórkowych, takich, jak oddychanie komórkowe, metabolizm aminokwasów czy biosynteza DNA i steroli.³⁴ Pomimo faktu, że pierwiastek ten jest szeroko rozpowszechniony w skorupie ziemskiej, jego biodostępność jest stosunkowo niska, gdyż obecność tlenu w atmosferze sprzyja powstawaniu trudno rozpuszczalnych w wodzie związków żelaza (III), np. wodorotlenków. W organizmach żywych żelazo występuje głównie w formie związanej z białkami (np. z ferrytyną, hemoglobina), co znacznie ogranicza jego dostępność dla mikroorganizmów chorobotwórczych. W odpowiedzi na te ograniczenia zarówno patogenne, jak i niepatogenne drobnoustroje wykształciły zaawansowane mechanizmy pozyskiwania żelaza z potoczenia.

Siderofory to związki o małej masie cząsteczkowej, które wykazują wysokie powinowactwo do jonów żelaza (III). W warunkach fizjologicznych, przy pH typowym dla surowicy ludzkiej, stężenie jonów żelaza (III) wynosi ok. 10^{-24} M, co jest wartością niewystarczającą do prawidłowego wzrostu i rozwoju patogennych mikroorganizmów, gdyż minimalne zapotrzebowanie na wewnątrzkomórkowe stężenie żelaza tych drobnoustrojów wynosi zazwyczaj 10^{-6} M.³² Zdolności chelatujące sideroforów, produkowanych i wydzielanych przez mikroorganizmy, umożliwiają tworzenie stabilnych kompleksów jonów żelaza (III), sprawiając, że stają się one biodostępne.³⁵ Kompleksy jonów żelaza (III) z sideroforami mogą być transportowane przez błony komórkowe, po czym w przestrzeni wewnątrzkomórkowej ulegają redukcji do kompleksów jonów żelaza (II), a następnie, w wyniku rozpadu kompleksów, dochodzi do uwolnienia tych jonów. Siderofory mają około 20-krotnie mniejsze powinowactwo do jonów Fe^{2+} niż do Fe^{3+} , co czyni redukcję skutecznym mechanizmem wewnątrzkomórkowego uwalniania żelaza.³⁶ Dotychczas w literaturze naukowej opisano już ponad 500 różnych struktur sideroforów, które zostały sklasyfikowane w cztery główne grupy, w zależności od rodzaju grup funkcyjnych odpowiedzialnych za chelatowanie jonów żelaza. Można wyróżnić: katecholany, kwasy hydroksamowe, karboksylany i „typy mieszane”, które zawierają kombinacje różnych grup koordynujących.³⁷

Siderofory typu katecholanowego są najczęściej wytwarzane przez organizmy bakteryjne, a przykładem takich związków są wibriobaktyna,³⁸ produkowana przez *V. cholerae*, enterobaktyna,³⁹ syntetyzowana przez *E. coli* czy

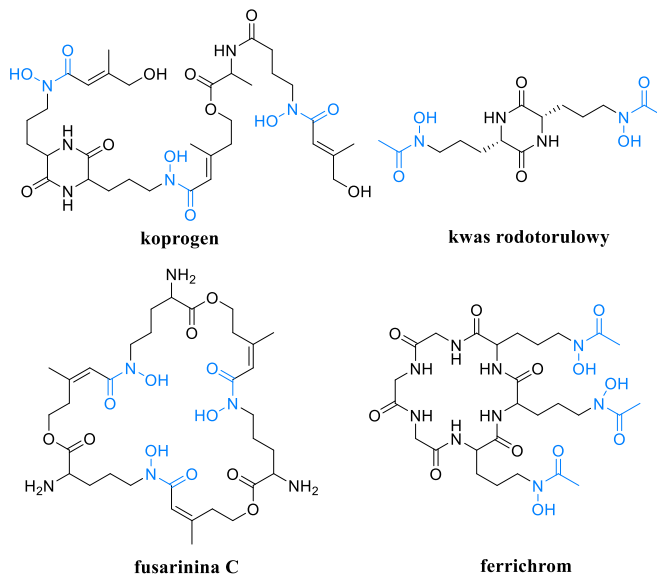
wytwarzana przez *B. anthracis* bacillibaktyna⁴⁰ (Rys. 1.4). Jedynym znanym sideroforem katecholowym produkowanym przez organizmy grzybowe jest pistilaryna znaleziona w komórkach grzyba *Penicillium bilaiae*.⁴¹ Siderofory typu katecholowego zawierają w swojej strukturze fragment 1,2-dihydroksyfenylu (katecholu), który pełni kluczową rolę w procesie kompleksowania jonów żelaza.



Rys. 1.4 Przykładowe struktury sideroforów typu katecholowego. Na niebiesko zaznaczono grupy katecholowe biorące udział w tworzeniu kompleksów.

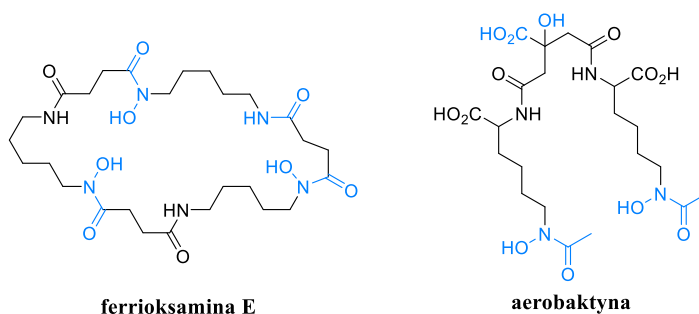
W przeciwieństwie do katecholanów, siderofory typu hydroksamowego dominują wśród organizmów grzybowych, choć są również wytwarzane przez niektóre gatunki bakterii glebowych, w tym organizmy z rodzaju *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Erwinia* lub *Nocardia*.³⁴ Grupa hydroksamowa odpowiada za zdolność tych związków do chelatowania żelaza. Struktury sideroforów hydroksamowych pochodzenia grzybowego oparte są na motywie ω -*N*-acylo- ω -*N*-hydroksy-L-ornityny i można je sklasyfikować ze względu na budowę na trzy główne grupy: fusarininy, koprogeny oraz ferrichromy. Dodatkowo wyróżnić można kwas rodotorulowy, który nie klasyfikuje się do żadnej z powyższych grup. Jest to najprostszy w budowie znany hydroksamowy siderofor, który dzięki swojej diketopiperazynowej strukturze stanowi potencjalnie użyteczny szkielet do tworzenia koniugatów o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Związek ten złożony jest z dwóch jednostek ω -*N*-acetylo- ω -*N*-hydroksy-L-ornityny połączonych ze sobą fragmentami aminokwasowymi tworząc pierścień diketopiperazynowy (Rys. 1.5). Natomiast fusarininy składają się z trzech cząsteczek ω -*N*-cis-anhydromewalonylo- ω -*N*-hydroksy-L-ornityny połączonych wiązaniami estrowymi utworzonymi pomiędzy grupą α -karboksylową ornityny a grupą ω -hydroksylową mewalonianu. Struktury te mogą być zarówno liniowe, jak i cykliczne. Koprogeny składają się z trzech tych samych jednostek co fusarininy, jednakże anhydromewalonian jest o konfiguracji *trans*. W przeciwieństwie do fusarinin, struktury koprogenów są zawsze liniowe, a dwie jednostki połączone są w sposób tworzący pierścień diketopiperazyny (Rys. 1.5). Ostatnia grupa omawianych związków hydroksamowych to ferrichromy, które można określić jako cykliczne

heksapeptydy zbudowane z trzech jednostek ω -*N*-acylo- ω -*N*-hydroksy-L-ornityny oraz trzech aminokwasów, gdzie zawsze jednym z nich jest glicyna. Grupą acylową obecną we fragmencie hydroksamowym może być acetyl, malonyl, czy podobnie jak w fusarynach i koprogenach, *cis*- lub *trans*-anhydromewalonyl.



Rys. 1.5 Przykładowe struktury sideroforów typu hydroksamowego. Na niebiesko zaznaczono grupy hydroksamowe biorące udział w tworzeniu kompleksów.

Wśród bakteryjnych sideroforów hydroksamowych przeważają przede wszystkim ferrioksaminy (np. ferrioksamina E), których struktura zawiera powtarzające się jednostki *N*-hydroksy-diaminoalkanu oraz kwasu bursztynowego (Rys. 1.6).³²

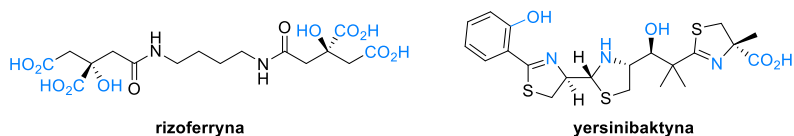


Rys. 1.6 Przykładowe struktury sideroforów typu hydroksamowego obecnych w organizmach bakteryjnych. Na niebiesko zaznaczono grupy funkcyjne biorące udział w tworzeniu kompleksów.

Innym przedstawicielem tej grupy jest aerobaktyna,³⁷ produkowana przez bakterie *E. coli*, jednakże jest rozpoznawana i pobierana również przez inne organizmy bakteryjne, m. in. z rodzaju *Pseudomonas*. Ze względu na obecność specyficznych

transporterów w błonach komórkowych bakterii zdolnych do rozpoznawania i wychwytu sideroforów hydroksamowych, związki te można uznać za dość uniwersalne.

Karboksylany to kolejna klasa sideroforów, wśród których wyróżnia się związki organiczne zawierające w swojej strukturze ugrupowania karboksylowe oraz hydroksykarboksylowe odpowiedzialne za kompleksowanie jonów żelaza. Siderofory karboksylowe są syntezowane raczej przez organizmy bakteryjne, a najbardziej znanym przedstawicielem tej grupy związków jest rizoferryna⁴² (Rys. 1.7). Ciekawym jest fakt, że jest to jedyny znany karboksylanowy siderofor wytwarzany przez komórki grzybowe.³⁷ Zarówno mikroorganizmy bakteryjne, jak i grzybowe są zdolne do jej produkcji, jednakże w komórkach grzybowych stwierdzono obecność wyłącznie *R,R*-rizoferryny, natomiast niektóre bakterie mogą tworzyć jej enancjomeryczną formę – *S,S*-rizoferrynę.⁴³



Rys. 1.7 Przykładowe struktury sideroforu karboksylanowego oraz sideroforu typu mieszanego. Na niebiesko zaznaczono grupy biorące udział w tworzeniu kompleksów.

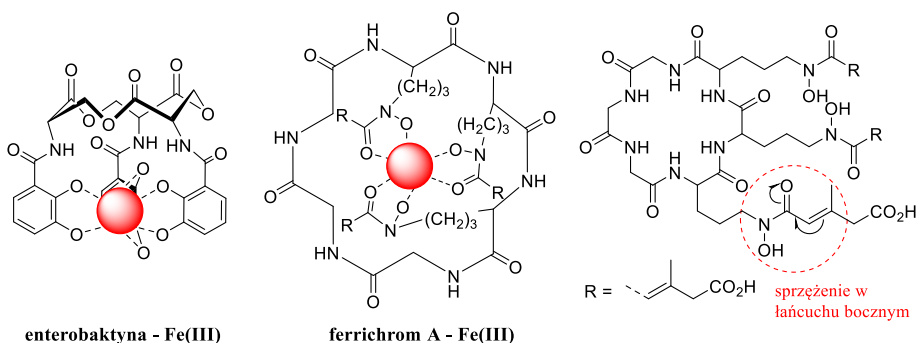
Siderofory typu „mieszanego” to wszystkie inne siderofory, które ze względu na grupy chelatujące nie mogą być jednoznacznie przyporządkowane do wcześniej omówionych grup. Przykładem takiego sideroforu jest yersinibaktyna⁴⁴ produkowana przez bakterie *K. pneumoniae* (Rys. 1.7). Wśród grup funkcyjnych obecnych w strukturze, które biorą udział w wiązaniu żelaza można znaleźć grupy karboksylowe oraz dwie hydroksylowe: alkoholową oraz fenolową. W tworzeniu kompleksów zaangażowane są również atomy azotu obecne w pierścieniach dehydrotiazolowych.

1.2.1. Właściwości chelatujące sideroforów

Zdolność sideroforów do tworzenia stałych kompleksów z jonami żelaza (III) wynika z obecności grup atomów donorowych wykazujących wysokie powinowactwo do tych jonów. Atomy tlenu, na których zlokalizowany jest ładunek ujemny, charakteryzują się najwyższym powinowactwem w efekcie tworząc silne oddziaływania. W związku z powyższym, w strukturach sideroforów najczęściej spotyka się grupy katecholowe, hydroksamowe lub α -hydroksykarboksylowe. Ponadto, grupy te są ligandami bidentnymi i zazwyczaj występują w liczbie trzech struktur w jednej cząsteczce, co sprawia, że żelazo wiązane jest w sześciu miejscach (taki siderofor nazywany jest ligandem heksadentnym), a tworzone kompleksy

posiadają oktaedryczną geometrię koordynacyjną. Taki układ przestrzenny połączenia pozwala na powstawanie termodynamicznie stabilnych kompleksów, gdzie ligandy rozłożone są wokół centralnego atomu żelaza przy minimalnym wzajemnym odpychaniu się. Dla sideroforów wykorzystujących inne atomy donorowe (jak atomy siarki czy azotu) geometria ta może być lekko zniekształcona.

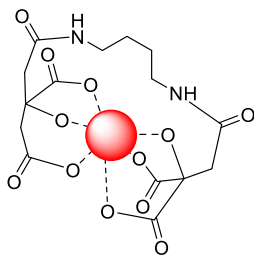
Przykładem ligandu heksadentnego jest enterobaktyna⁴⁵ (Rys. 1.8), która jest jednym z najsilniejszych znanych naturalnych chelatorów jonów żelaza (III),³⁴ a jej wysokie powinowactwo wynika z obecności *orto*-fenolanowych grup, zawierających atom tlenu o wysokiej gęstości elektronowej. Podobnie oddziałują wszystkie inne katecholanowe siderofory posiadające w swojej strukturze trzy jednostki katecholu (np. wibriobaktyna, bacillibaktyna).^{38,40}



Rys. 1.8 Struktury kompleksów sideroforów heksadentnych z jonem żelaza (III): kompleks enterobaktyny oraz ferrichromu A.

Innymi heksadentnymi ligandami są siderofory hydroksamowe takie jak koprogen, fusarinina C czy ferrichrom (Rys. 1.8). Grupy hydroksamowe są hybrydą dwóch struktur rezonansowych, czego konsekwencją jest wysoką gęstość elektronową na atomie tlenu grupy karbonylowej. W zależności od łańcuchów bocznych w otoczeniu grupy hydroksamowej może wystąpić zjawisko sprzężenia i w efekcie wzmocnienie delokalizacji ładunku zwiększając jeszcze gęstość elektronową na atomach tlenu.⁴⁶ Zjawisko to można zaobserwować dla kompleksów ferrichromu A (Rys. 1.8).

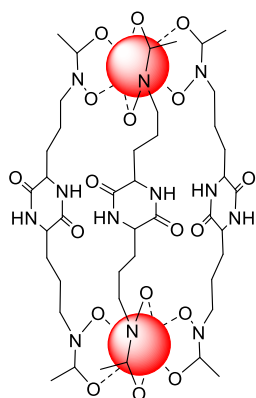
Wysokie powinowactwo do jonów żelaza wykazują również grupy α -hydroksykarboksylowe. Przykładem heksadentnego karboksylanu jest rizoferryina, której powinowactwo do żelaza jest dodatkowo zwiększone poprzez powstawanie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych (Rys. 1.9).⁴⁷ To zjawisko sprawia, że jony żelaza mogą z łatwością konkurować z protonami o wiązanie z grupami alkoksyłowymi, co w efekcie znacząco zwiększa selektywność tych grup względem żelaza.



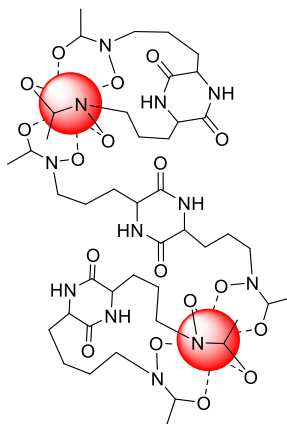
rizoferryna - Fe(III)

Rys. 1.9 Struktura kompleksu rizoferryny z jonem żelaza (III).

Niekiedy, w strukturze sideroforu występują grupy wiążące żelazo w inny sposób niż w sześciu miejscach. W przypadku ligandów heksadentnych i bidentnych tworzone kompleksy z jonem żelaza mają charakter monojądrowy, gdzie centrum kompleksu stanowi atom żelaza. Jednak dla ligandów tetradentnych lub tridentnych możliwym jest tworzenie kompleksów bi- lub wielojądrowych. Kwas rodotorulowy, będący ligandem tetradentnym, tworzy kompleksy w stosunku Fe_2KR_3 koordynując dwa atomy żelaza (KR – kwas rodotorulowy) (Rys. 1.10). Carrano i Raymond⁴⁸ zaproponowali geometrię cząsteczki kompleksu Fe_2KR_3 , jednakże w literaturze można także znaleźć model możliwej geometrii ligandu transportera sideroforowego FhuE w miejscach wiązania metalu w *E. coli*, opracowany przez Grinter'a i Lithgow'a⁴⁹ na podstawie obliczeń dokowania molekularnego.



kwas rodotorulowy - Fe (III)
model Carrano i Raymond'a

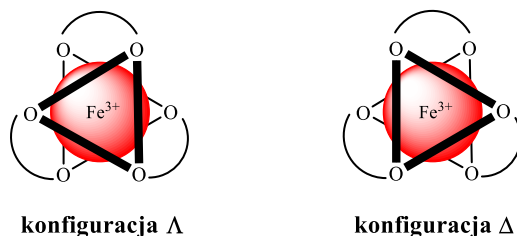


kwas rodotorulowy - Fe (III)
model Grinter'a i Lithgow'a

Rys. 1.10 Struktury kompleksu kwasu rodotorulowego z jonami żelaza (III) wg literatury.^{48,49}

Kompleksy ligandów symetrycznych heksadentnych (np. ferrichromu C) mogą występować w dwóch formach enancjomerycznych: lewoskrętnej formie lambda Λ oraz prawoskrętnej formie delta Δ (Rys. 1.11).⁴⁶ W przypadku asymetrycznych ligandów, takich jak grupy hydroksamowe, rozróżnia się izomery

zarówno geometryczne, jak i optyczne: Δ -*cis*, Δ -*trans*, Λ -*cis*, Λ -*trans*. Warto zaznaczyć, że zdecydowana większość heksadentnych ligandów hydroksamowych występuje wyłącznie w konfiguracji *cis*. Dla przykładu, spośród wymienionych powyżej struktur, kompleksy enterobaktyny⁴⁶ charakteryzują się konfiguracją Δ -*cis*, a ferrichromu A⁴⁶ wykazują konfigurację Λ -*cis*, podobnie jak kompleksy kwasu rodotorulowego.⁵⁰



Rys. 1.11 Dwie możliwe konfiguracje heksadentnych kompleksów.

1.2.2. Mechanizmy pobierania żelaza z wykorzystaniem sideroforów

Mechanizmy pobierania żelaza z wykorzystaniem sideroforów występują zarówno w organizmach bakteryjnych, jak i grzybowych. Pomimo analogicznej funkcji różnią się między sobą zarówno pod względem pobierania, jak i uwalniania żelaza z kompleksów. Najdokładniej przebadane i opisane w literaturze zostały systemy charakterystyczne dla bakterii Gram-ujemnych, obejmujące szczegółowo poznane struktury białkowych elementów biorących udział w bezpośrednim, jak i pośrednim transporcie kompleksów przez błony biologiczne. Niemniej jednak, mechanizmy transportu żelaza dla organizmów grzybowych również zostały zidentyfikowane, a wiedza na ich temat systematycznie się poszerza.

W literaturze opisano cztery możliwe mechanizmy transportu kompleksów żelazo-siderofor hydroksamowy przez błonę komórkową organizmów grzybowych.⁵¹ Pierwszy mechanizm, tzw. mechanizm „wahadłowy” opiera się na transporcie niezmienionego kompleksu siderofor-żelazo do wnętrza komórki grzybowej. Uwolnienie żelaza możliwe jest dzięki działaniu reduktaz lub poprzez bezpośrednią wymianę liganda, podczas której siderofor odbierający jon staje się cząsteczką magazynującą. Ligand oddający żelazo może być ponownie uwalniany w celu kompleksowania kolejnych cząsteczek żelaza. Mechanizm ten jest charakterystyczny dla transportu sideroforów z rodzaju koprogenów i ferrichromów.⁵²

Kolejnym typem jest mechanizm bezpośredniego transferu, zgodnie z którym kompleksy siderofor-żelazo nie wnikają bezpośrednio do komórki. Po zbliżeniu się do błony komórkowej następuje wymiana, za pośrednictwem błony,

między sideroforem znajdującym się na zewnątrz a wewnętrznym czynnikiem chelatującym. Proces ten nie ma charakteru redukcyjnego, a czynnik chelatujący pełni rolę związku magazynującego. Ten typ mechanizmu pobierania żelaza został opisany dla kwasu rodotorulowego występującego u niektórych gatunków grzybowych, np. *R. pilimanae*.⁵³

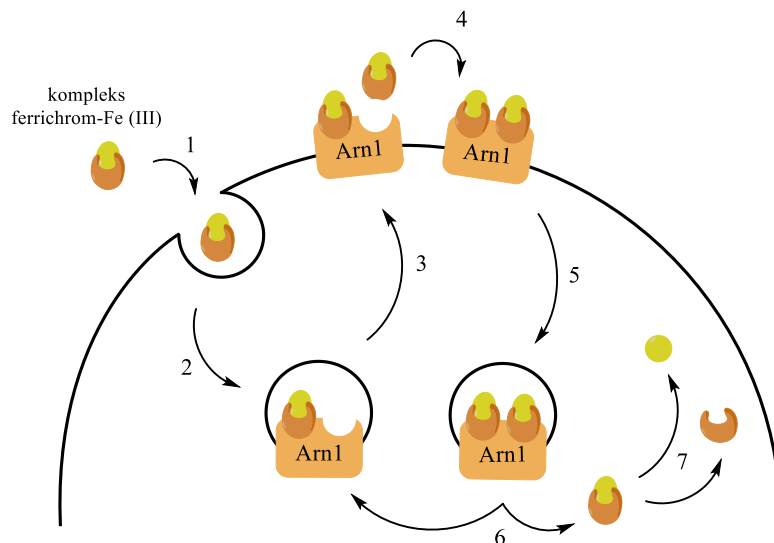
Mechanizm esterazo-reduktazowy jest charakterystyczny dla sideroforów posiadających wiązania estrowe w swojej strukturze, np. dla triacetylofusarininy *C*. Po pobraniu kompleksu następuje rozszczepienie wiązań estrowych liganda, a reszty fusarinowe są wydalane, podczas gdy jony żelaza ulegają redukcji i są magazynowane.⁵⁴

Ostatnim omawianym mechanizmem jest proces redukcyjny, który przebiega podobnie do mechanizmu bezpośredniego transferu, gdzie kompleks siderofor-żelazo nie jest pobierany do wnętrza komórki przez organizm grzybowy, tylko redukowany, a powstałe jony żelaza (II) są transportowane przez błonę komórkową. Mechanizm ten uczestniczy w transporcie niektórych ferrichromów i jest często wykorzystywany przez grzyby, które nie syntezują samodzielnie sideroforów.⁵⁵

Kluczową rolę w transporcie sideroforów pełnią struktury białkowe zlokalizowane w błonie komórkowej organizmów grzybowych.⁵⁶ Niektóre gatunki, np. *S. cerevisiae* pomimo braku zdolności syntezy własnych sideroforów, posiadają w swojej błonie sideroforowe transportery białkowe. Jak dotąd zidentyfikowano i scharakteryzowano cztery transportery sideroforów w komórkach *S. cerevisiae*: Arn1,⁵⁷ Taf1/Arn2,⁵⁸ Sit1/Arn3⁵⁹ oraz Enb1/Arn4.⁶⁰ Arn1 odpowiada za pobieranie ferrichromu i podobnych mu sideroforów posiadających reszty anhydromewalonylowe połączone z ω -*N*-hydroksy-L-ornityną – ferrirubiny oraz ferrirodiny. Homologi tego transportera zostały zlokalizowane m in. u *S. pombe*,⁶¹ czy u patogennego grzyba *C. albicans*.⁶² Białko Taf1/Arn2 bierze udział w transporcie triacetylofusarininy,⁵⁸ natomiast substratem Sit1/Arn3 jest ferrioksamina B.⁵⁹ W przeciwieństwie do omówionych transporterów, Enb1/Arn4 umożliwia pobieranie sideroforu katecholowego – enterobaktyny.⁶⁰

Pobieranie sideroforu przez Arn1 odbywa się mechanizmem „wahadłowym” (Rys. 1.12).⁶³ Transporter ten zlokalizowany jest w błonie komórkowej i posiada dwa miejsca wiążące ferrichrom. Zewnątrzkomórkowy kompleks siderofor-żelazo pobierany jest na drodze endocytozy płynów i wiąże się do miejsca o wysokim powinowactwie na powierzchni Arn1 zlokalizowanym w endosomie, w wyniku czego struktura białka ulega zmianom konformacyjnym i transporter przemieszcza się do błony komórkowej. Po relokalizacji druga cząsteczka kompleksu ferrichromu zostaje związana do miejsca o niskim

powinowactwie, co inicjuje kolejną zmianę konformacyjną skutkującą szybką endocytozą i przemieszczeniem kompleksu siderofor-żelazo do cytoplazmy. Niezmieniony kompleks ferrichromu odłącza się od transportera, po czym zostaje zredukowany, a Arn1 ulega w tym czasie recyklingowi.



Rys. 1.12 Mechanizm działania transportera białkowego Arn1.⁶³

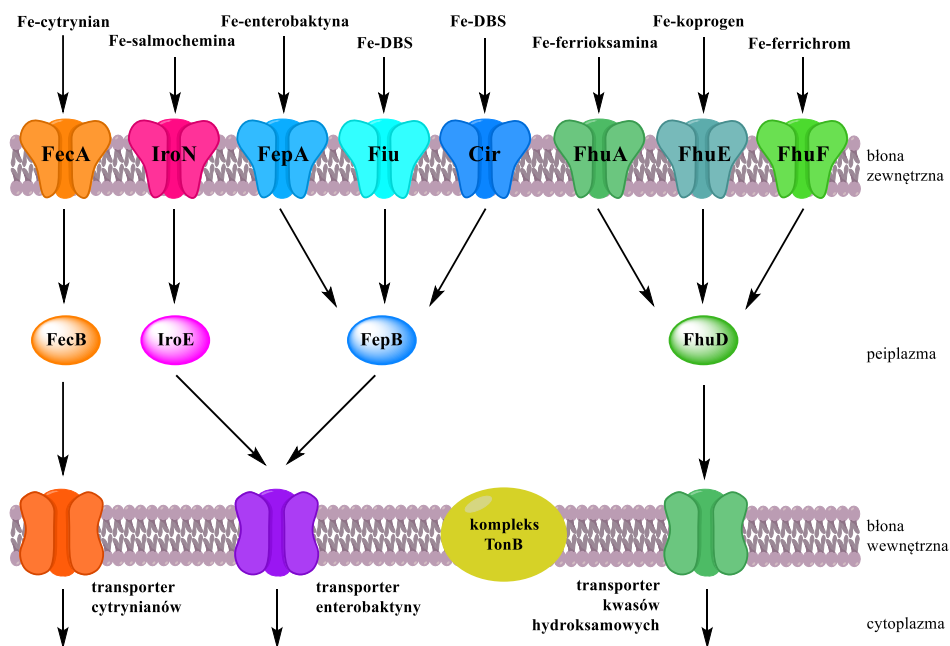
Poza transporterami błony komórkowej Arn, w pobieraniu kompleksów żelaza biorą udział również struktury białkowe zlokalizowane w ścianie komórkowej. Dla *S. cerevisiae* zidentyfikowano i opisano trzy takie białka – Fit1, Fit2 oraz Fit3.⁵⁶

Siderofory odgrywają kluczową rolę w wirulencji wielu patogennych drobnoustrojów, w tym patogenów człowieka. Przykładem jest *A. fumigatus*, który jest zdolny do produkowania i wydzielania fusarininy C oraz triacetylofusarininy C pełniących funkcję chelatora żelaza, a także ferriokrocyny oraz hydroksyferriokrocyny, odpowiedzialnych za magazynowanie pobranych jonów.^{64,34} Dla szczepu pozbawionego genu *sidA*, kodującego enzym niezbędny w szlaku biosyntezy sideroforów, obserwowano zaburzenie wzrostu w podłożu o niskiej zawartości żelaza. Szczep ten również nie rozwijał się w podłożu zawierającym ludzką surowicę, co wskazuje, że biosynteza sideroforów jest niezbędna dla wirulencji tego organizmu.⁵⁶

Kolejnym przykładem jest patogenny grzyb *C. albicans*, który nie jest zdolny do samodzielnej biosyntezy sideroforów, jednakże posiada on jeden, jak dotąd zidentyfikowany, transporter sideroforowy w swojej błonie komórkowej. Sit1/Arn1 jest zdolny do wychwytu i transportu sideroforów hydroksamowych, takich jak

ferrichrom⁶⁵ i może pełnić rolę w wirulencji tego organizmu grzybowego.⁶⁶ Ekspresja genu *SIT1/ARN1* była obserwowana dla szczepów znajdujących się w podłożu o niskiej zawartości żelaza, a transporter ten okazał się niezbędny dla wirulencji w modelu *in vitro* kandydozy jamy ustnej.⁶⁵ U innych gatunków *Candida*, np. *C. glabrata* homolog Sit1 jest jedynym sideroforowym transporterem i jest kluczowy dla przetrwania tego organizmu wewnątrz makrofagów.⁶⁷

Mechanizmy pozyskiwania żelaza charakterystyczne dla komórek bakteryjnych zostały najdokładniej zbadane i opisane dla Gram-ujemnych bakterii jelitowych takich jak *E. coli*, czy *S. typhimurium*.⁴⁶ Organizmy te posiadają dwie błony komórkowe, w których obecne są specyficzne transportery białkowe zdolne do wychwytu sideroforów. Dla bakterii *E. coli* i innych z rodzaju *Enterobacteriaceae* scharakteryzowano osiem rodzajów transporterów sideroforów. Struktury białkowe błony zewnętrznej wykazują wysokie powinowactwo do kompleksów siderofor – żelazo (1 – 50 nM), co umożliwia im skuteczne wiązanie tych kompleksów i przekazywanie do przestrzeni periplazmatycznej. W zależności od rodzaju sideroforu, zaangażowany jest specyficzny nośnik białkowy (Rys. 1.13).

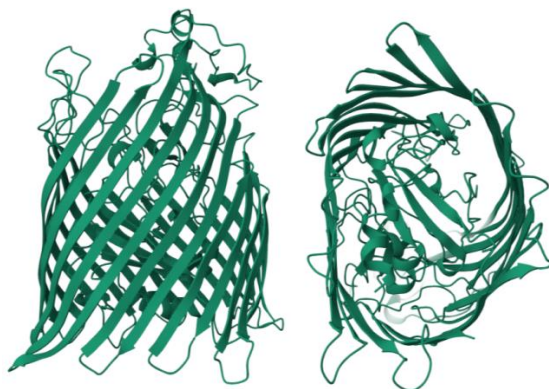


Rys. 1.13 Systemy transportu żelaza (III) w *E. coli* i innych *Enterobacteriaceae* z wykorzystaniem sideroforów.⁴⁶

Po przejściu kompleksu przez zewnętrzną błonę komórkową, jest on wiązany z odpowiednim białkiem transportowym, które przenosi go w okolice błony cytoplazmatycznej, gdzie zostaje on wychwycony i przeniesiony przez obecne

w błonie transportery typu ABC napędzane hydrolizą adenosynotryfosforanu (ATP).⁶⁸

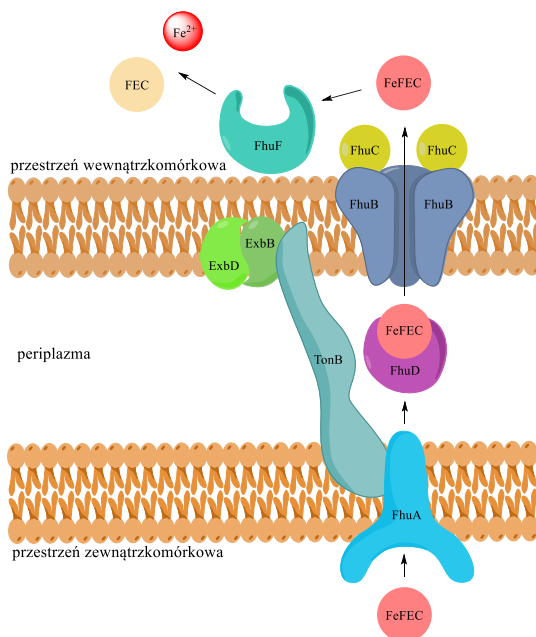
Niektóre białka transportowe, takie jak FecA, FepA, czy FhuA scharakteryzowano metodami krystalografii rentgenowskiej.⁶⁹ Nośniki te można opisać jako homologiczne struktury złożone z transbłonowej beczułki β zbudowanej z 22 nici β , która budową przypomina strukturę poryn bakteryjnych (Rys. 1.14). Wewnątrz beczułki znajduje się domena globularna zbudowana z połączenia struktur α -helikalnych oraz β -nici. Powierzchnię beczułki pokrywa domena zewnątrzkomórkowa, która jest całkowicie eksponowana na środowisko zewnętrzne. Domena zewnętrzna złożona jest z wielu hydrofobowych aromatycznych aminokwasów, co zapewnia prawidłowe umiejscowienie w błonie, natomiast wewnątrz struktury zawiera hydrofilowe i zjonizowane reszty aminokwasowe.⁷⁰ Kompleks wiąże się najpierw z zewnętrzną domeną, po czym przenika przez kanał utworzony pomiędzy globularną domeną a wewnętrzną powierzchnią beczułki. Proces ten obejmuje dwie zmiany konformacyjne. Najpierw zachodzi zmiana na obu końcach beczułki wywołana wiązaniem kompleksu do transportera, co prowadzi do „zamknięcia” kanału od strony zewnątrzkomórkowej oraz powstawaniem miejsca wiązania dla białka TonB od strony periplazmatycznej. Kolejna zmiana konformacyjna spowodowana jest wiązaniem białka TonB do transportera, co umożliwia utworzenie kanału przejściowego dla kompleksu. Warto zaznaczyć, że poszczególne transportery są selektywne względem konkretnych kompleksów siderofor-żelazo, np. białko FhuA wiąże kompleks żelazo-ferichrom, a FepA żelazo-entarobaktyne.⁴⁶



Rys. 1.14 Struktura transportera białkowego FhuA obecnego w błonie zewnętrznej *E. coli*. Struktura dostępna w RCSB *Protein Data Bank* (PDBID: 1BY3).

Białko TonB występuje zarówno w błonie wewnętrznej, jak i zewnętrznej, a jego głównym celem jest transport energii metabolicznej z błony cytoplazmatycznej do błony zewnętrznej, co umożliwia zmianę energetyczną

transportera sideroforowego, co pokazano na przykładzie wychwyty kompleksu ferrichrom-żelazo (Fe-FER, Rys. 1.15)^{70,71} We wszystkich bakteryjnych transporterach sideroforów obecna jest pentapeptydowa sekwencja konsensusu zwana „TonB box”, która uczestniczy w sprzężeniu z białkiem TonB zakotwiczonym w błonie zewnętrznej. Reszta białka TonB mostkuje przestrzeń periplazmatyczną kończąc się w błonie wewnętrznej. Integralne białka błonowe ExbB, ExbD oraz TonB współpracują, przekształcając siłę protonomotoryczną (PMF) błony cytoplazmatycznej w energię dla transportera FhuA (Rys. 1.15).⁷²



Rys. 1.15 Schemat procesu transportu kompleksu ferrichrom-żelazo (FeFRC) z udziałem białka TonB obecnego w komórkach bakteryjnych *E. coli*.

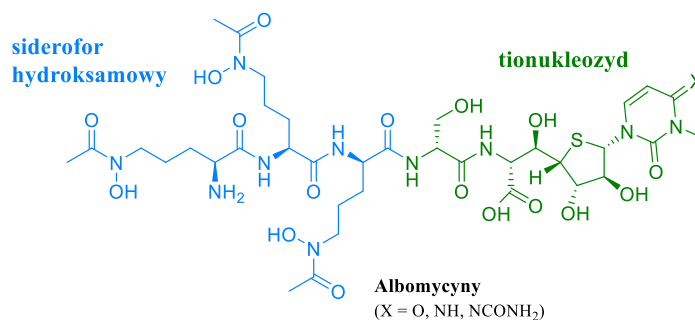
Po przekroczeniu pierwszej błony siderofor jest szybko przechwytywany przez odpowiednie białko wiążące, np. FhuD, który wykazuje szeroką specyficzność substratów dla sideroforów hydroksamowych, w tym koprogenu, ferrichromu, ferrioksaminy B czy kwasu rodotorulowego. FhuD transportuje związany siderofor do systemu transportowego ABC w błonie cytoplazmatycznej, składającego się z dwóch białek – FhuB (charakterystycznego dla pochodnych hydroksamowych) i FhuC. Pierwsze białko działa jako permeaza, a drugie hydrolizuje ATP, dostarczając energię niezbędną do transportu. Kompleks żelazo–siderofor jest uwalniany po stronie cytoplazmatycznej błony, a następnie żelazo jest szybko uwalniane z kompleksu poprzez redukcję. Kompleks FER-Fe³⁺ jest rozkładany przez reduktazę sideroforową FhuF, luźno związaną z błoną cytoplazmatyczną, a jon Fe²⁺ jest

przechwytywany przez inny ligand wewnątrzcząsteczkowy, pozostawiając wolny siderofor, który może zostać ponownie wydzielony przez mikroorganizm.⁷¹

Bakterie Gram-dodatnie nie posiadają dodatkowej błony komórkowej, jak i również nie występuje w nich przestrzeń periplazmatyczna. W przeciwieństwie do bakterii Gram-ujemnych, ich mechanizmy wychwytu żelaza nie są tak szczegółowo zbadane i opisane. Wiadomo jednak, że organizmy te posiadają zarówno lipoproteinowe receptory odpowiedzialne za rozpoznanie oraz wychwyt sideroforów, jak i sideroforowe transportery typu ABC podobne do tych obecnych w komórkach bakterii Gram-ujemnych. Receptory wykazują wysokie powinowactwo do kompleksów sideroforów, które po związaniu są następnie przenoszone do odpowiedniego transportera. W komórkach bakterii Gram-dodatnich nie występuje białko TonB.⁴⁶

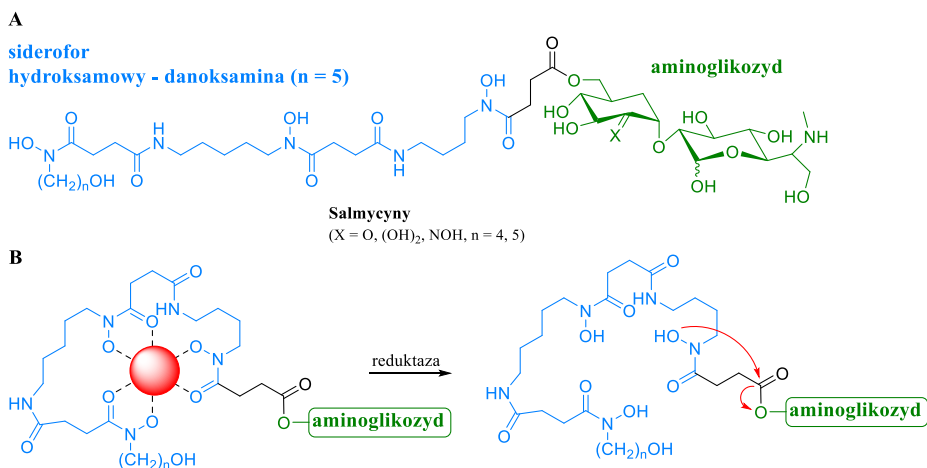
1.2.3. Połączenia siderofor-chemoterapeutyk

Pomysł wykorzystania idei „Konia Trojańskiego” jako efektywnej strategii prolekowej zapoczątkowały badania nad naturalnie występującymi sideromycynami, które wykorzystując bakteryjne, specyficzne transportery błonowe mogą wnikać do komórek bakteryjnych.^{73,74} Obecność sideroforowego elementu pozwala sideromycynom naśladować działanie tych chelatorów, wykorzystując specyficzne transportery białkowe i tym samym dostarczać chemoterapeutyki do wnętrza drobnoustrojów. Ich budowa jest zazwyczaj następująca: siderofor – linker – antybiotyk.⁷⁵ Braun *et al.*⁷³ wyizolowali oraz zaproponowali działanie albomycyn, zawierających w swojej strukturze podobny do ferrichromu siderofor hydroksamowy oraz tionukleozyd (Rys. 1.16) – antybakteryjny inhibitor syntetazy tRNA. Taki koniugat po przedostaniu się do wnętrza komórki ulega rozpadowi pod wpływem działania peptydaz, uwalniając chemoterapeutyk.



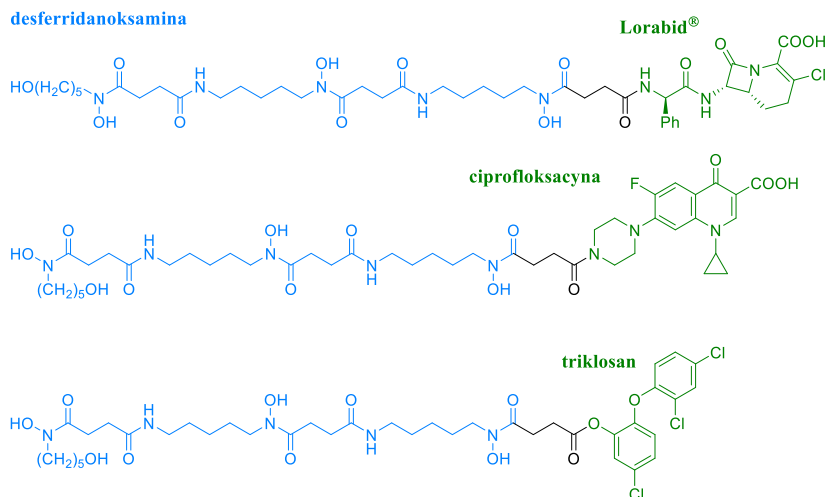
Rys. 1.16 Struktura albomycyn.

Kolejnymi naturalnymi sideromycynami są salmycyny, zawierające danoksaminę – siderofor z rodziny ferrioksamin oraz aminoglikozyd (Rys. 1.17A), których struktury opisał Vértesy *et al.*⁷⁶ Ten bakteryjny inhibitor syntezy białek zostaje uwolniony w wyniku wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji inicjowanej przez obecne w komórce reduktazy. W wyniku redukcji jonu żelaza (III), kompleks salmycyna-żelazo ulega rozpadowi, co pozwala na nukleofilowy atak grupy hydroksamowej sideroforu na wiązanie estrowe tworząc sześciocząłowy pierścień i uwalniając aminoglikozyd (Rys. 1.17B).



Rys. 1.17 A) Struktura salmicyny **B)** mechanizm uwalniania aminoglikozydu w salmicynach.

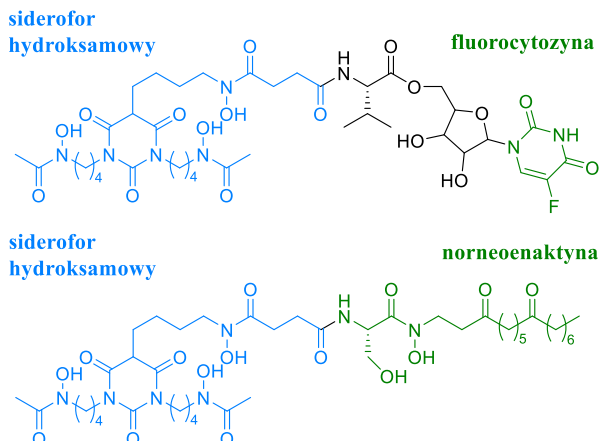
Sideromycyny są w stanie skutecznie pokonywać błony komórkowe bakterii Gram-ujemnych, przewyżczając narastający problem lekooporności. W związku z powyższym na podstawie ich struktur powstał szereg syntetycznych sideroforów i ich połączeń z antybiotykami, takimi jak ciprofloksacyna, lorabid czy triklosan.⁷⁴ Przykładem mogą być koniugaty zaproponowane przez Wenczewicza *et al.*^{74,77} będące połączeniem syntetycznej desferridanoksaminy (Rys. 1.18) z antybiotykiem przeciwbakteryjnym.



Rys. 1.18 Struktury koniugatów desferridanoksaminy z antybiotykami.

Badania potwierdziły, że uzyskane związki są transportowane do wnętrza drobnoustrojów, a ich skuteczność zależała od rodzaju wiązania pomiędzy sideroforem a chemoterapeutykami. Wiązanie amidowe osłabiało aktywność koniugatu, natomiast estrowe ją zwiększało lub pozostawiało bez zmian. Ta właściwość wskazywała na kluczowe znaczenie mechanizmu uwalniania leku na jego aktywność biologiczną. Co więcej, dobór odpowiedniego łącznika może zapewnić skuteczne uwalnianie i działanie antybiotyku w komórkach patogenów.

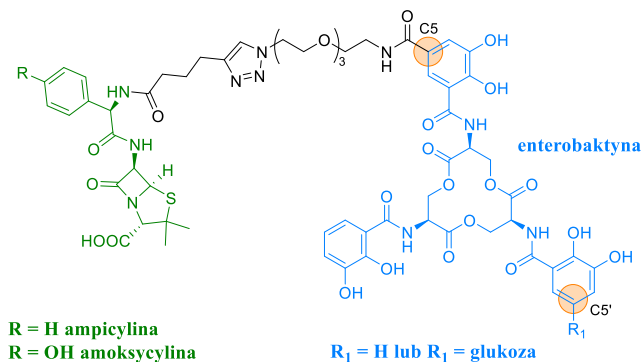
Inny przykład wykorzystania syntetycznego sideroforu hydroksamowego podają Ghosh i Miller,⁷⁸ opisując syntezę połączeń trihydroksamowego sideroforu opartego na izocyjanuranie z antybiotykami przeciwgrzybowymi: 5-fluorocytozyną oraz norneoenaktyną (Rys. 1.19). Kompleksy żelaza (III) obu koniugatów okazały się rozpoznawane i transportowane do wnętrza komórek grzybów z rodzaju *Candida*, a połączenie zawierające 5-fluorocytozynę wykazywało umiarkowaną aktywność wobec *C. albicans*. Koniugat ten wykazał również umiarkowaną aktywność inhibicyjną względem niektórych bakterii Gram-dodatnich (*Enterococcus*, *Staphylococcus*).



Rys. 1.19 Struktury koniugatów syntetycznego sideroforu trihydroksamowego z antybiotykami.

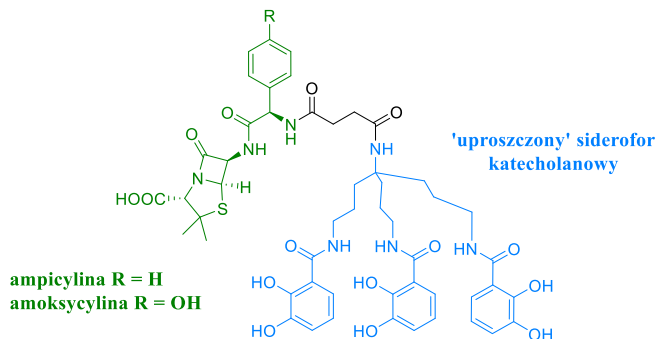
Wśród koniugatów naturalnych sideroforów z chemoterapeutykami można wyróżnić połączenia bakteryjnych sideroforów katecholanowych, w szczególności połączenia enterobaktyny. Siderofor ten okazał się obiecujący jako nośnik molekularny, co wykazano na serii jego połączeń z niewielkimi cząsteczkami organicznymi.⁷⁹ Badania nad właściwościami oraz metabolizmem tego związku w komórkach bakteryjnych pozwoliły na wyznaczenie „bezpiecznej” pozycji modyfikacji enterobaktyny, którą jest węgiel C5 w pierścieniu aromatycznym (Rys. 1.20).⁸⁰ Nolan *et al.*⁸¹ zsyntetyzowali dwa koniugaty enterobaktyny: jeden z ampicyliną, a drugi z amoksycyliną, oba połączone z nośnikiem molekularnym za pomocą łącznika polietylenoglikolowego. W porównaniu z samymi antybiotykami, koniugaty wykazały wyższą aktywność przeciwbakteryjną, lepszą selektywność i niższą cytotoksyczność wobec ludzkich komórek jelitowych.

Niedługo po ukazaniu się badań dotyczących koniugatów naturalnej enterobaktyny zaczęły pojawiać się doniesienia naukowe dotyczące połączeń zawierających zmodyfikowaną strukturę tego sideroforu. Zespół Nolan'a⁸² zaproponował chemoenzymatyczną syntezę połączeń glikozylowanej w pozycji C5' enterobaktyny z ampicyliną lub amoksycyliną, których przykłady są zaprezentowane na Rys. 1.20. Struktury te wykazały od 100 do 1000-krotne zwiększenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec niektórych badanych szczepów *E. coli*, w porównaniu z natywnymi antybiotykami β -laktamowymi w warunkach niedoboru żelaza.



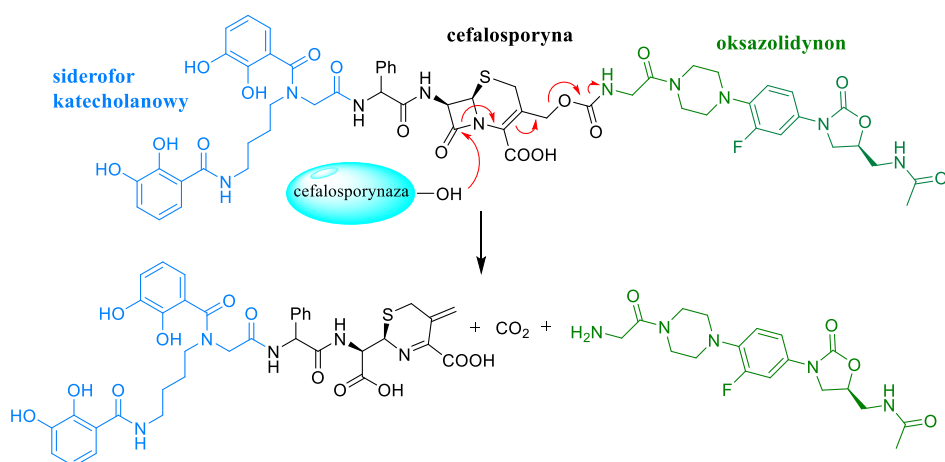
Rys. 1.20 Struktury połączeń enterobaktyny oraz C5'-glikozydowanej enterobaktyny z ampicyliną oraz amoksylicyną. Kolorem pomarańczowym oznaczono pozycję C5 i C5' pierścieni aromatycznych.

Dalsze prace nad połączeniami enterobaktyny wykazały, że receptory i transportery sideroforowe nie muszą rozpoznawać pełnych struktur tych chelatorów.⁸³ W przypadku enterobaktyny, szkielet trilaktonowy nie jest koniecznym do tego celu elementem. Co ważniejsze, może zostać zastąpiony inną strukturą. Jednak warunkiem koniecznym jest zachowanie ośrodka tris-katecholowego wiążącego żelazo oraz skoordynowanych z nim grup amidowych katecholu. Zespół Millera⁸⁴ zaprojektował i zsyntetyzował koniugaty ampicyliny i amoksylicyny oparte na uproszczonej enterobaktynie (Rys. 1.21). Uzyskane w ten sposób koniugaty wykazywały bardzo wysoką aktywność przeciwbakteryjną wobec dzikich szczepów *E. coli* i *P. aeruginosa* ($MIC_{90} > 0,05 \mu M$), podczas gdy same antybiotyki były niemal nieaktywne ($MIC_{90} > 100 \mu M$). Kolejnymi przykładami są koniugaty zawierające ciprofloksacynę,⁸⁵ jednakże były one mniej aktywne niż połączenia zawierające ampicylinę czy amoksylicynę. Zsyntetyzowano i przebadano także szereg koniugatów enterobaktyny zawierających łącznik polietylenoglikolowy (PEG3).^{81,86} Ponadto zgromadzone wyniki oraz analiza danych potwierdziły, że rodzaj łącznika ma wpływ na aktywność przeciwdrobnoustrojową koniugatów.⁸¹



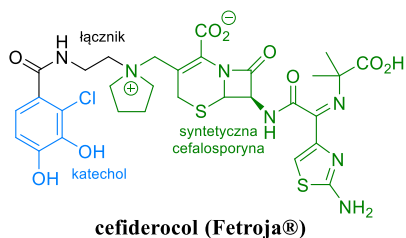
Rys. 1.21 Struktura połączenia sztucznego sideroforu katecholanowego z ampicyliną oraz amoksylicyną.

W literaturze można znaleźć wiele innych połączeń chemoterapeutyków z sideroforami katecholanowymi zarówno naturalnie pozyskanymi, jak i w pełni syntetycznymi, czy też modyfikowanymi. Coraz częściej pojawiają się propozycje nowych, uproszczonych struktur o charakterze sideroforów, co można zaobserwować w koniugacie zaproponowanym przez Liu *et al.*⁸⁷ Przedstawiony związek jest tzw. „podwójnym” koniugatem, gdyż siderofor połączony jest z cefalosporyną, do której z kolei dołączono oksazolidynon. Wykorzystany siderofor katecholanowy jest złożony tylko z dwóch jednostek katecholowych. Cefalosporyna odgrywa rolę łącznika, który uwalnia oksazolidynon pod wpływem działania β -laktamaz. To umożliwi dostarczanie antybiotyku przeciwko bakteriom Gram-dodatnim do komórek bakterii Gram-ujemnych (Rys. 1.22).



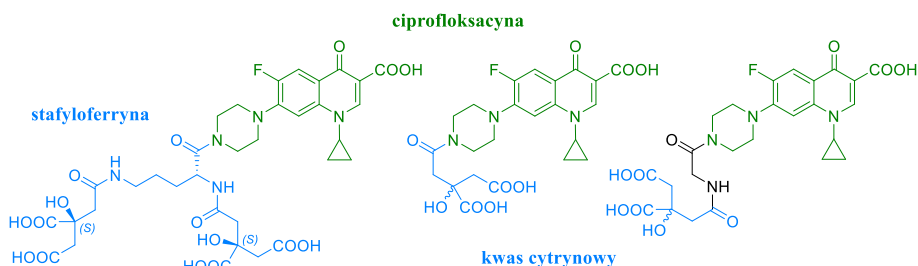
Rys. 1.22 Struktura podwójnego koniugatu sideroforu katecholanowego z cefalosporyną oraz oksazolidynonem. Czerwonymi strzałkami przedstawiono mechanizm uwalniania aktywowany działaniem cefalosporynaz.

Kolejnym przykładem związku utylizującego syntetyczny siderofor jest cefiderocol, znany również pod nazwą handlową Fetroja. Cefiderocol (Rys. 1.23) jest połączeniem syntetycznej cefalosporyny oraz syntetycznego sideroforu katecholanowego złożonego z jednej jednostki wiążącej żelazo. Jest dopuszczony do obrotu jako produkt leczniczy i wykazuje skuteczność przeciwko złośliwym, wielolekoopornym szczepom Gram-ujemnych bakterii, w tym z rodzaju *Pseudomonas*, *Klebsiella* oraz *Escherichia*.⁸⁸



Rys. 1.23 Struktura cefiderocolu, niebieskim kolorem oznaczono komponent będący syntetycznym analogiem sideroforu katecholowego.

Siderofory karboksylanowe również znalazły zastosowanie jako nośniki molekularne w prolekach inspirowanych ideą „Konia Trojańskiego”. Milner *et al.*^{89,90} wykorzystali stafyloferrynę A oraz pochodne kwasu cytrynowego do konstrukcji koniugatów zawierających ciprofloksacynę (Rys. 1.24). Niestety połączenia stafyloferryny nie wykazały znaczącej aktywności przeciwbakteryjnej. Pochodne kwasu cytrynowego zademonstrowały nieco lepszą aktywność inhibicyjną wobec niektórych szczepów bakterii Gram-ujemnych. Autorzy zaznaczają potrzebę wprowadzenia do struktury koniugatu labilnego linkera, aby umożliwić uwolnienie ciprofloksacyny w pobliżu celu molekularnego, tym samym zwiększając jej aktywność biologiczną.

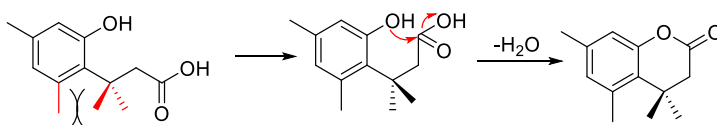


Rys. 1.24 Struktury koniugatu ciprofloksacyny ze stafyloferryną lub kwasem cytrynowym.

1.3. Układy „trimethyl lock” jako rozszczepialne łączniki organiczne

Jednym z najważniejszych wyzwań w projektowaniu nowych, ukierunkowanych proleków jest zapewnienie, aby cząsteczki aktywne biologicznie dotarły w okolice celu molekularnego oraz mogły być uwolnione w przestrzeni wewnątrzkomórkowej drobnoustroju. Proces ten zachodzi w wyniku działania określonego bodźca, np. specyficznego enzymu, który znajduje się wewnątrz komórki. Taka strategia prolekowa ma na celu zwiększenie działania biologicznego, poprawienie właściwości farmakokinetycznych oraz ograniczanie niepożądanych efektów ogólnoustrojowych.⁹¹

Układy „trimethyl lock” (TML) są dość uniwersalnymi łącznikami wykorzystywanymi przy tworzeniu proleków, obrazowaniu komórek czy opracowywaniu nowych narzędzi chemicznych.⁹² Mechanizm działania tych systemów bazuje na zwiększonej podatności do samorzutnej laktonizacji, jaką wykazują trimetylopodstawione pochodne kwasu 3-(2-hydrokso-4,6-dimetylofenylo)-3-metylobutanowego.⁹³ Obecność trzech grup metylowych znacząco przyspiesza proces cyklizacji ze względu na ich wzajemne steryczne oddziaływania (Rys. 1.25). Podstawniki te niejako blokują strukturę w określonej konformacji, co pozwala cząsteczce bezpośrednio osiągnąć stan przejściowy reakcji. W efekcie końcowym prowadzi to do zwiększenia tempa procesu laktonizacji. Szybkość tego procesu znacząco przewyższa szybkości reakcji laktonizacji dla analogów biomolekularnych i dorównuje, a niekiedy przekracza tempo reakcji katalizowanych enzymatycznie.⁹⁴ Proces ten inicjowany jest określonym bodźcem, a odpowiednie modyfikacje strukturalne pozwalają na wykorzystywanie wielu rodzajów ‘wyzwalaczy’ zarówno chemicznych, jak i enzymatycznych. W efekcie uwolniona zostaje cząsteczka transportowana, a układ TML jest przekształcany do pochodnej dihydrokumaryny (Rys. 1.25). Ze względu na ‘zablokowanie’ laktonizacji poprzez wprowadzenie odpowiedniego fragmentu na fenolowy atom tlenu oraz zaangażowanie trzech oddziałujących ze sobą przestrzenie grup metylowych w procesie uwolnienia cząsteczki transportowanej, łącznik nazywany jest układem ‘trimethyl lock’.

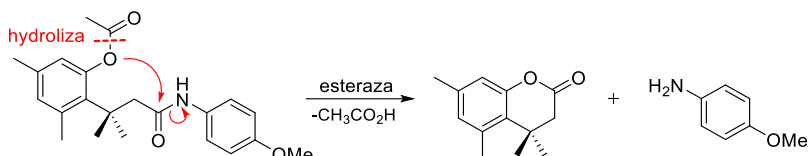


Rys. 1.25 Reakcja cyklizacji cząsteczki kwasu 3-(2-hydrokso-4,6-dimetylofenylo)-3-metylobutanowego z zaznaczeniem sterycznych oddziaływań pomiędzy istotnymi dla procesu trzema podstawnikami metylowymi.

1.3.1. Układy TML rozszczepiane za pomocą esteraz

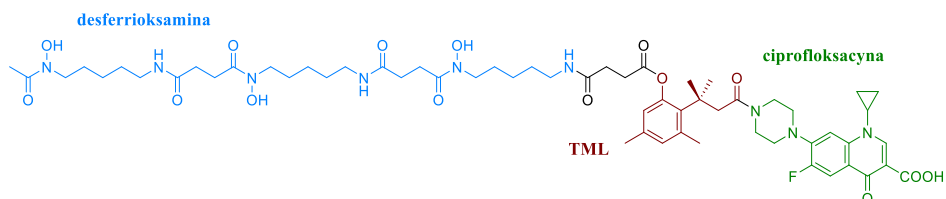
Układy TML, będące estrami fenylowymi, mogą zostać aktywowane za pomocą esteraz obecnych w komórkach drobnoustrojów. Enzymy te rozkładają obecne w strukturze wiązanie estrowe doprowadzając do spontanicznej laktonizacji i uwolnienia cząsteczek powiązanych z grupą karboksylową kwasu. Pomimo obecności esteraz w komórkach ludzkich, co może wskazywać na podatności układu na hydrolizę w warunkach fizjologicznych, połączenia tego typu wykazują znaczną odporność na ten proces. Zjawisko to jest spowodowane przeszkodami sterycznymi występującymi w estrach fenylowych TML, a hydroliza układu zachodzi dopiero po nagromadzeniu się cząsteczek w komórce.⁹¹

Pierwszy modelowy związek układu TML wrażliwego na esterazy został zaproponowany przez Wanga *et al.*⁹⁵ Część ta była amidem, który zawierał ugrupowanie acetylowe na fenolowym atomie tlenu. Co ciekawe, połączenie to okazało się dość stabilne w buforze fosforanowym ($t_{1/2} = 4039$ min). Dopiero po dodaniu esterazy z wątroby świni zaobserwowano rozszczepienie octanu i uwolnienie *p*-metoksyaniliny w wyniku następczej laktonizacji w ciągu kilku minut (Rys. 1.26).



Rys. 1.26 Mechanizm procesu laktonizacji *p*-metoksyanilidu kwasu 3-(*O*-acetylo-2-hydroksy-4,6-dimetylofenylo)-3-metylobutanowego katalizowanego przez esterazy.

Grupa hydroksylowa fenolu może być połączona z dowolnym związkiem organicznym pod warunkiem, że utworzy się wiązanie estrowe pomiędzy tymi elementami. Zależność tą wykorzystano do tworzenia połączeń układu TML z różnymi nośnikami molekularnymi, np. peptydami penetrującymi⁹⁶ czy sideroformami. Ji *et al.*⁹⁷ zaprezentowali połączenie desferrioksyminy B z esterazolabilnym układem TML oraz ciprofloksacyną (Rys. 1.27). Pomimo słabszego działania przeciwbakteryjnego w porównaniu do natywnego inhibitora, prolek wykazał dość dobrą aktywność biologiczną wobec wybranych szczepów bakteryjnych. Ponadto potwierdzono rozszczepianie łącznika TML pod wpływem esteraz i uwolnienie leku w komórkach drobnoustrojów.



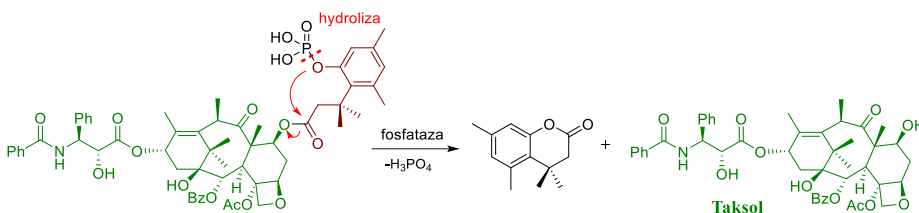
Rys. 1.27 Struktura koniugatu desferrioksyminy z ciprofloksacyną połączonych esterazolabilnym TML.

Prezentowane w literaturze koniugaty TML zazwyczaj zawierają wiązanie amidowe w łańcuchu bocznym, jednakże układ ten z powodzeniem również został zastosowany do tworzenia proleków o strukturze sulfidów.⁹⁸

1.3.2. Układy TML rozszczepiane za pomocą fosfatyz

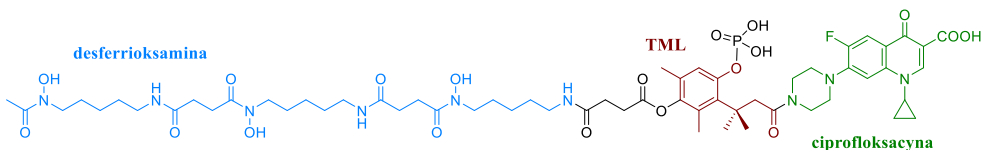
Kolejnym katalizatorem laktonizacji układów TML są fosfatazy, które rozpoznają i rozszczepiają ester fosforanowy utworzony na fenolowej grupie

hydroksylowej (Rys. 1.28). Fosforany, ze względu na swoją polarność i hydrofilowość, mogą być używane w połączeniach ze związkami słabo rozpuszczalnymi w wodzie. Wprowadzenie takiego ugrupowania znacznie zwiększa rozpuszczalność i pozwala na podawanie proleków drogą doustną. Rozszczepienie następuje dopiero w jelicie cienkim, gdyż właśnie w komórkach wyścielejających ten organ fosfatazy występują w dużych ilościach.⁹⁹ Niestety, zastosowanie tego rozwiązania jest ograniczone przez dwa zjawiska, a mianowicie specyficzność substratową fosfatazy oraz przenikalność proleku przez błony enterocytów w jelicie cienkim.^{100,101} Przykładem takiego zastosowania jest modyfikacja Taksolu – chemoterapeutyka wykorzystywanego w leczeniu przeciwnowotworowym. Wprowadzenie do struktury taksolu fosfatazo-labilnego układu TML (Rys. 1.28) znacząco poprawiło rozpuszczalność leku, a nie wpłynęło na jego aktywność biologiczną. Pozwoliło to na formułację bez stosowania dodatkowych solubilizatorów.¹⁰²



Rys. 1.28 Uproszczony schemat mechanizmu działania fosfatazo-labilnego układu TML na przykładzie koniugatu Taksolu.

Łącznik ten zastosowano również w połączeniu sideroforu – desferrioksaminy B z ciprofloksacyną (Rys. 1.29).⁹⁷ Niestety, w porównaniu z analogiem zawierającym esterazo-labilny TML był on nieaktywny, wobec tego samego zestawu szczepów bakteryjnych.

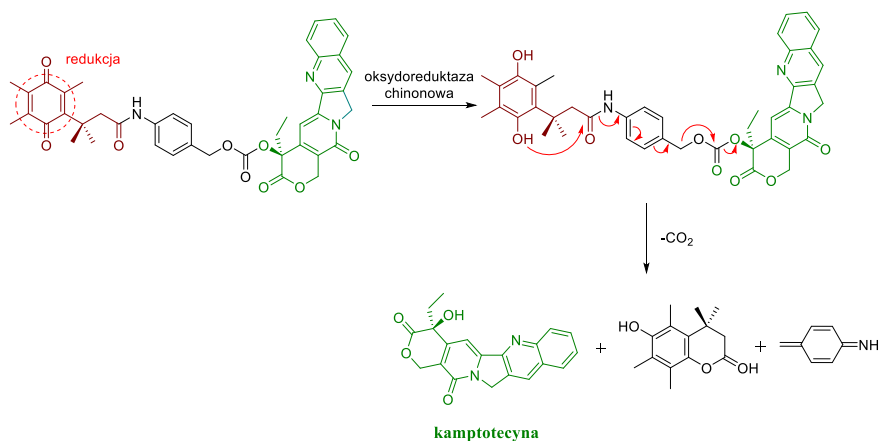


Rys. 1.29 Struktura koniugatu desferrioksaminy B z fosfatazo-labilnym łącznikiem TML oraz ciprofloksacyną.

1.3.3. Układy TML rozszczepiane za pomocą oksydoreduktazy chinonowej

Wśród systemów TML, w których zdolność do laktonizacji jest „zablokowana” należałoby wyróżnić utlenioną formę chinonową. Pierścień chinonowy jest redukowany na skutek działania oksydoreduktaz chinonowych

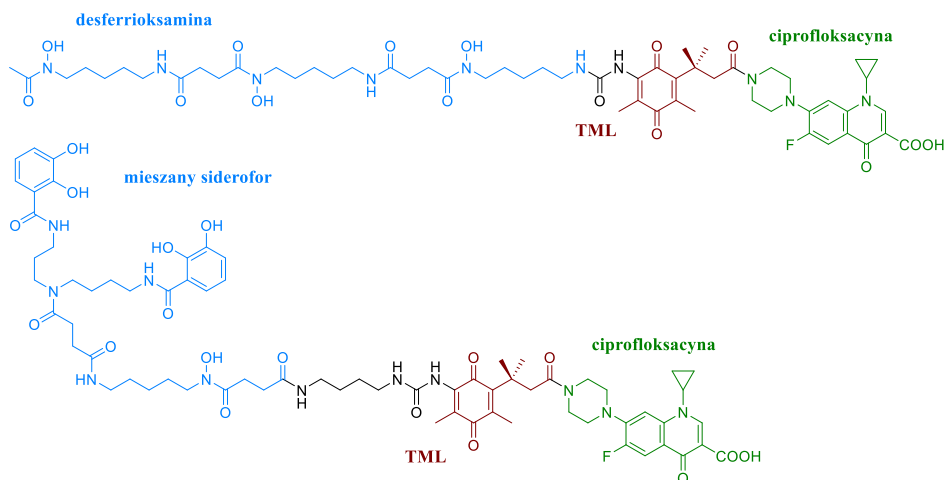
(NQO1), co umożliwia cyklizację układu (Rys. 1.30).¹⁰³ Układ chinonowy TML jest szczególnie wykorzystywany do obrazowania komórek nowotworowych oraz w systemach dostarczania do nich leków, gdyż obserwuje się nadekspresję enzymu NQO1 w niektórych typach nowotworów.¹⁰⁴ Opracowano wiele proleków przeciwnowotworowych opartych na systemach TML NQO1-labinyh takich, jak inhibitor angiogenezy zależnej od VEGF,¹⁰⁵ inhibitor transferazy farnezylowej¹⁰⁶ czy cytotoksynę Zerumbon.¹⁰⁷



Rys. 1.30 Mechanizm enzymatycznego uwalniania kamptotecyny z koniugatu zawierającego chinonowy układ TML.

Liu *et al.*¹⁰⁸ przedstawili przykład proleku kamptotecyny (CPT) – inhibitora topoizomerazy wykorzystujący chinonowy układ TML. Jako że inhibitor ten wykazuje silną fluorescencję, możliwym jest monitorowanie uwalniania leku podczas terapii przeciwnowotworowej. W formie chinonu układ pełni funkcję akceptora elektronów wzbudzonych cząsteczek fluorofora, co prowadzi do tłumienia fluorescencji. CPT zostało połączone z TML w sposób umożliwiający uwolnienie go w przestrzeni wewnątrzkomórkowej (Rys. 1.30).

Ji *et al.*¹⁰⁹ zaprojektowali oraz zsyntezowali dwa koniugaty zawierające chinonowy TML połączone z sideroforem oraz ciprofloksacyną (Rys. 1.31). Pierwsza struktura zawiera desferrioksyaminę, natomiast druga zawiera sztuczny siderofor mieszanego typu. Pomimo potwierdzenia, że lek zostaje uwalniany w komórkach drobnoustrojów pod wpływem działania oksydoreduktazy, działanie inhibicyjne obydwóch koniugatów było słabsze w porównaniu do natywnej ciprofloksacyny.

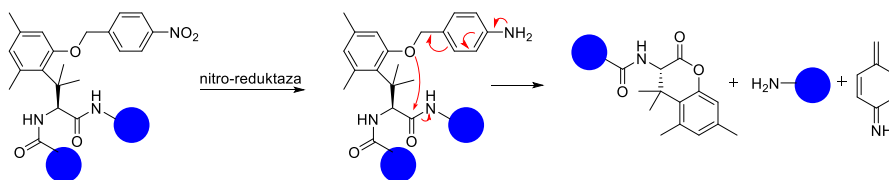


Rys. 1.31 Struktury koniugatów ciprofloksacyny z chinonowym TML oraz desferrioksaminy lub sztucznym, mieszanym sideroforem.

Z uwagi na wrażliwość chinonowych układów TML na oksydoreduktazy, łączniki tego typu mogą być także rozkładane przy zastosowaniu wyzwalaczy elektrochemicznych.¹¹⁰

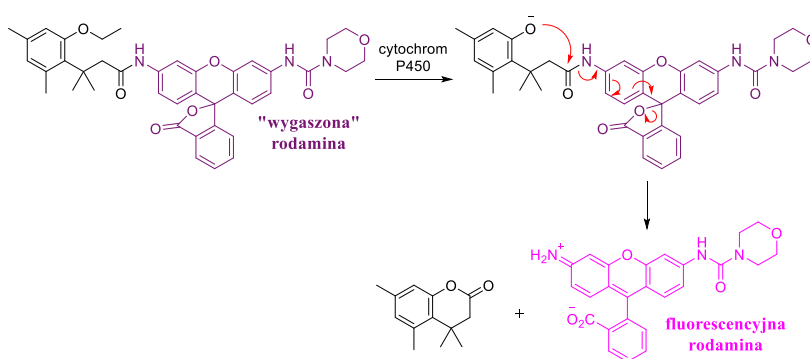
1.3.4. Pozostałe układy TML

Spośród wielu systemów TML opisanych w literaturze warto wyróżnić także te rozkładane pod wpływem działania nitro-reduktazy, cytochromu-P450 czy glutationu. Układy TML wykorzystujące nitro-reduktazy jako wyzwalacze muszą posiadać w swojej strukturze odpowiednie azotowe grupy funkcyjne, takie jak nitrowe, nitrozowe czy hydroksyaminowe. Enzym ten występuje w dużych ilościach w komórkach nowotworowych,¹¹¹ jednakże można go też zaobserwować w niektórych organizmach bakteryjnych.¹¹² Mechanizm działania przedstawiono na przykładzie koniugatu opisanego przez Shigenagę *et al.*¹¹³ (Rys. 1.32). W wyniku redukcji grupy nitrowej zlokalizowanej w estrze *p*-nitrobenzylowym dochodzi do uwolnienia fenolowego atomu tlenu i cyklizacji z utworzeniem pochodnej dihydrokumaryny.



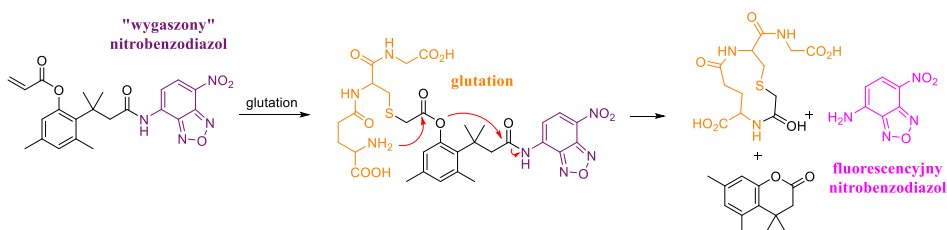
Rys. 1.32 Mechanizm aktywowania procesu laktonizacji z udziałem nitroreduktazo-labilnego TML.

Cytochrom P450 jest przedstawicielem rodziny enzymów odpowiedzialnych za oksydacyjny metabolizm wielu związków organicznych, w tym chemoterapeutyków czy toksyn.¹¹⁴ Szczególnie podatne na działanie tego enzymu są etery etylowe, które ulegają hydroksylacji w pozycji α do atomu tlenu tworząc hemiacetal. Yatzeck *et al.*¹¹⁵ wykorzystali tę zależność projektując połączenie rodaminę C z łącznikiem TML aktywowanym cytochromem P450. *N*-Acylowanie rodaminę tłumy jej fluorescencję, jednakże w wyniku działania enzymu zachodzi laktonizacja i uwolnienie wskaźnika fluorescencyjnego (Rys. 1.33).



Rys. 1.33 Mechanizm aktywowania procesu laktonizacji z udziałem łącznika TML wrażliwego na działanie cytochromu P450

Podobne rozwiązanie zastosowali Zhou i współpracownicy,¹¹⁶ wykorzystując system TML do tłumienia fluorescencji nitrobenzodiazolu. Modyfikacja na fenolowym atomie TML pozwoliła na aktywowanie układu po wpływie działania glutationu (Rys. 1.34). W wyniku addycji Michaela atomu siarki glutationu do akrylanu następuje atak grupy aminowej na wiązanie estrowe fenolu, co umożliwia laktonizację, a więc uwolnienie i aktywację wskaźnika fluorescencyjnego.



Rys. 1.34 Mechanizm aktywowania procesu laktonizacji łącznika TML wrażliwego na działanie glutationem.

Kolejnymi ciekawymi rozwiązaniami wydają się łączniki TML wrażliwe na promieniowanie UV. Takie układy zawierają fotorozszczepialne grupy ochronne (np. *o*-nitrobenzylową) połączone z fenolową grupą hydroksylową, blokując proces

laktonizacji. Po wzbudzeniu takich ugrupowań światłem UV zachodzą reakcje rekombinacji rodnikowej oraz przegrupowań prowadząc do uwolnienia atomu tlenu i następczego procesu cyklizacji.¹¹⁷

1.4. Projektowanie nowych, potencjalnych inhibitorów enzymatycznych w oparciu o nowe cele molekularne

Tak jak już wspomniałam, mimo stale rosnącego zagrożenia dla zdrowia i życia człowieka spowodowanego pojawianiem się wielolekoopronych szczepów grzybów oraz bakterii istnieją ograniczone opcje terapeutyczne. W leczeniu klinicznym dostępny jest wąski repertuar chemoterapeutyków, którego nadużycie zwiększa tylko tempo pojawiania się lekooporności u drobnoustrojów. Stosowanie strategii prolekowych umożliwia dostarczanie leków do komórek patogenów, jednakże niekiedy i te rozwiązania nie przynoszą pożądanych rezultatów. Innym podejściem do przezwyciężenia narastającej lekooporności jest projektowanie oraz synteza nowych, potencjalnych chemoterapeutyków.

W przypadku farmaceutyków przeciwgrzybowych zasób dostępnych leków jest szczególnie ograniczony.¹¹⁸ Jednym z powodów tego zjawiska jest niewielka liczba poznanych celów molekularnych dla chemoterapeutyków przeciwgrzybowych. Optymalnym celem byłaby cząsteczka o kluczowym znaczeniu dla wzrostu, rozwoju i zjadliwości patogennych grzybów, która jest nieobecna w komórkach ssaków. Najczęściej, warunek ten spełniony jest przez enzymy, które biorą udział w procesach biochemicznych niezachodzących w komórkach ludzkich. Selektywne zahamowanie działania takiego enzymu mogłoby skutkować w uzyskaniu nowych chemoterapeutyków o ukierunkowanym działaniu na patogeny ludzkie. Niestety, podobieństwo procesów metabolicznych organizmów grzybowych oraz ssących znacznie ogranicza liczbę dostępnych i skutecznych celów molekularnych.

Jedną z atrakcyjnych opcji jest wykorzystanie enzymów szlaku biosyntezy aminokwasów egzogennych, która zachodzi w komórkach grzybowych. Jako że komórki ludzkie nie są zdolne do produkcji egzogennych aminokwasów, wiele enzymów biorących udział w biosyntezie tych związków organicznych jest w nich nieobecna. Zahamowanie działania wspomnianych enzymów nie powinno więc wpływać na metabolizm człowieka. Takie inhibitory enzymatyczne mogą zatem charakteryzować się wysoką selektywnością oraz niską toksycznością dla komórek gospodarza, a jednocześnie blokować biosyntezę związków niezbędnych do prawidłowego rozwoju patogennych organizmów grzybowych. Ponadto inhibitory omawianych enzymów mogą działać jako antymetabolity, czyli związki naśladujące naturalne metabolity komórkowe. Dzięki ich strukturalnemu podobieństwu do tych związków są one słabiej rozpoznawane i usuwane przez białka obecne

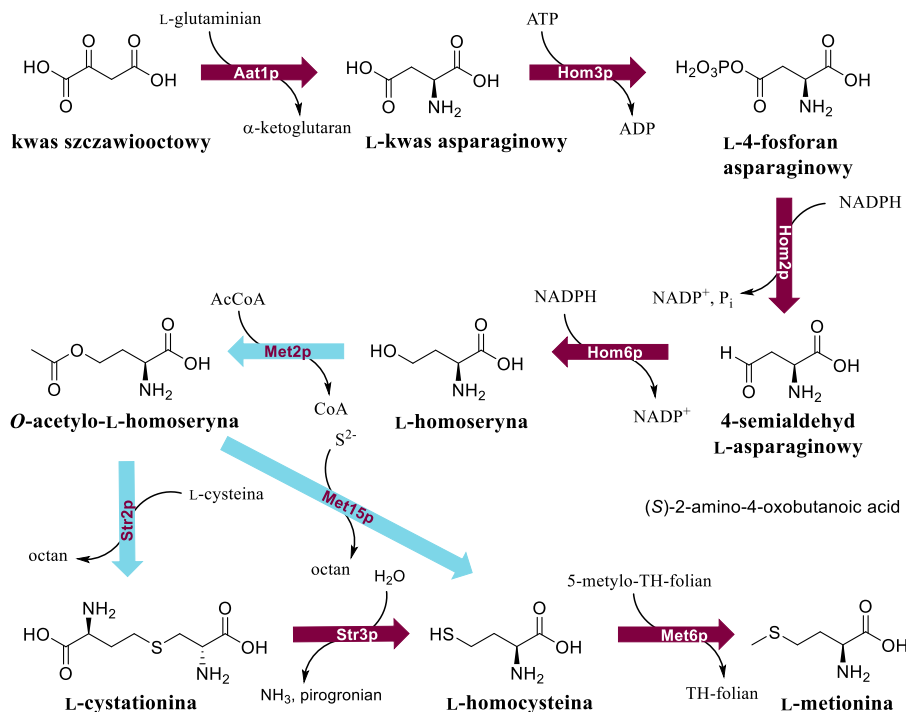
w komórkach szczepów wielolekoopornych. Niekiedy, skuteczność takich inhibitorów wobec szczepów opornych może być wyższa niż w przypadku szczepów wrażliwych.¹¹⁹

Chociaż proponowane enzymy szlaków biosyntezy aminokwasów nie występują w komórkach ssaków, to jednak niektóre aminokwasy i peptydy są obecne w surowicy ssaczek w ilościach wystarczających do prawidłowego wzrostu komórek grzybów chorobotwórczych. Znacznie zawęża to zakres poszukiwań nowych grzybowych celów molekularnych w obrębie szlaków metabolicznych aminokwasów. Najlepszymi kandydatami są szlaki biosyntezy metioniny oraz tryptofanu, ponieważ stężenie tych dwóch aminokwasów w surowicy jest szczególnie niskie.¹²⁰⁻¹²²

1.4.1. Szlak biosyntezy L-metioniny

L-Metionina należy do pięciu proteogennych aminokwasów zaliczanych do tzw. rodziny asparaginianowej, do której należy również kwas asparaginowy, asparagina, treonina i izoleucyna. Wszystkie aminokwasy z tej grupy powstają z jednego wspólnego prekursora – szczawiooctanu. Biotransformacja szczawiooctanu w L-homoserynę (Rys. 1.35) zachodzi w czterech etapach z udziałem m. in. adenosynotrifosforanu (ATP) oraz dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego w formie zredukowanej (NADPH).

Szlak biosyntezy L-metioniny (ang. *L-methionine biosynthesis pathway*, MBP) z L-homoseryny występuje zarówno u bakterii, grzybów, jak i u roślin, jednak jego przebieg różni się w zależności od organizmu.¹²² W najczęściej spotykanym wariacie grzybowego MBP (Rys. 1.35) L-homoseryna ulega najpierw O-acetylowaniu w reakcji katalizowanej przez transacetylazę L-homoseryny Met2p. W organizmach bakteryjnych na tym etapie powstaje O-bursztynylhomoseryna, natomiast u roślin lądowych (*Viridiplantae*) grupa hydroksylowa L-homoseryny jest O-fosforylowana.¹²³ W kolejnym kroku wprowadzany jest atom siarki, którego źródłem może być L-cysteina lub nieorganiczny siarczek. U części grzybów atom siarki, pochodzący z siarczku, wbudowywany jest przez sulfhydrylazę O-acetylhomoseryny Met15p, prowadząc do powstania L-homocysteiny. Niektóre mikroorganizmy katalizują tę reakcję za pomocą bifunkcyjnego enzymu sulfhydrylasy O-acetyloseryny/O-acetylhomoseryny. Jon siarczkowy, dostarczany do tej reakcji, powstaje z siarczanu w szeregu biotransformacji poprzez siarczynowy związek przejściowy.



Rys. 1.35 Szlak biosyntezy L-metioniny w komórkach grzybowych.

Istnieje również alternatywny szlak, obecny m.in. u gatunków *Aspergillus*, w którym L-homocysteina syntetyzowana jest w dwóch etapach. Najpierw γ -syntaza cystationiny Str2p katalizuje powstanie cystationiny z *O*-acetylo-L-homoseryny i L-cysteiny, a następnie β -liaza cystationiny Str3p przekształca cystationinę w L-homocysteinę.

Ostatni etap biosyntezy, wspólny dla wszystkich grzybów, polega na S-metylowaniu L-homocysteiny katalizowanej przez syntazę metioniny Met6p. Donorem grupy metylowej w tej reakcji jest 5-metylo-5,6,7,8-tetrahydrofolian (5-metylo-TH-folian).

1.4.2. Enzymy szlaku biosyntezy L-metioniny jako nowe potencjalne cele molekularne

Dotychczas przebadano jedynie dwa enzymy MBP jako potencjalne cele molekularne nowych leków przeciwgrzybiczych. Nazi *et al.*¹²⁴ w swojej pracy wskazali na znaczenie Met2p jako enzymu niezbędnego do prawidłowego wzrostu *Cryptococcus neoformans*. Autorzy wykazali, że delecja genu *MET2*, kodującego Met2p, prowadzi do auktotrofii metioninowej w warunkach niedoboru tego aminokwasu. Szczepy pozbawione *MET2* były zdolne do wzrostu dopiero przy

stężeniu L-metioniny powyżej 60 μM , czyli znacznie wyższym od fizjologicznego poziomu w surowicy (20–25 μM). Co więcej, udowodniono, że obecność *MET2* jest niezbędna dla zjadliwości *C. neoformans* w modelu infekcji oddechowej u myszy. Niemniej jednak, zidentyfikowany inhibitor Met2p – CTCQC – nie wykazywał efektu przeciwgrzybiczego, prawdopodobnie z powodu nieskutecznego transportu lub metabolizmu wewnątrzkomórkowego.¹²⁵

Drugim proponowanym celem molekularnym MBP była L-metioninowa syntaza Met6p, gdyż szczepy *Candida albicans* z usuniętymi obydwoma kopiami genu *MET6* nie były zdolne do wzrostu w minimalnym składzie podłoża odżywczego.¹²⁶ Ponadto Tsai i współpracownicy¹²⁷ przedstawili dowody, że dehydrogenaza homoseryny Hom6p również może być rozważana jako potencjalny cel terapeutyczny. Delecja *HOM6* powodowała poważne zaburzenia wzrostu szczepu mutanta *C. albicans* oraz silnie obniżała jego zdolność adhezji. Co więcej, specyficzny inhibitor Hom6p, kwas (S)-2-amino-4-okso-5-hydrokspentanowy, znany także jako antybiotyk RI-331, hamował wzrost wielu patogennych grzybów zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*.¹²⁸

Kolejnym enzymem, który może być rozważany jako potencjalny cel molekularny jest Met15p. Azoksybacylina jest potencjalnym chemoterapeutyką przeciwgrzybową, którego aktywność *in vitro* prawdopodobnie wiąże się z wpływem na ekspresję genów biorących udział w asymilacji siarczanów, dostarczających jonu siarczkowego niezbędnego w reakcji katalizowanej właśnie przez Met15p.¹²⁹ Jednakże u szczepów *C. albicans* z podwójną delecją *MET15* obserwowano zdolność do wzrostu w podłożu pozbawionym metioniny, choć był on istotnie spowolniony w porównaniu z komórkami typu dzikiego.¹³⁰ Podobną metioninową prototrofię stwierdzono u szczepów *Aspergillus nidulans* z defektem sulfhydrylasy *O*-acetyloseryny/*O*-acetylhomoseryny.¹³¹ Brak pełnej aukstotrofii metioninowej w tych przypadkach tłumaczy się istnieniem alternatywnego szlaku prowadzącego od *O*-acetylhomoseryny do homocysteiny, najprawdopodobniej z udziałem cystationiny i enzymów Str2p oraz Str3p.

Opisano również inne przykłady inhibitorów enzymów grzybowego szlaku MBP, jednak w żadnym przypadku nie stwierdzono bezpośredniej korelacji między hamowaniem aktywności enzymatycznej a efektem przeciwgrzybiczym.^{132,133}

2. Cel i zakres pracy

Głównymi celami badań, których wyniki opisano w niniejszej rozprawie doktorskiej, było:

- 1) wykorzystanie związków o strukturze aminokwasów o potencjalnym działaniu przeciwgrzybowym oraz zaprojektowanie ich koniugatów z nośnikami molekularnymi,
- 2) zbadanie możliwości syntezy potencjalnych inhibitorów szlaku biosyntezy L-metioniny będącymi inhibitorami enzymów drobnoustrojowych zlokalizowanych w cytoplazmie docelowych komórek.

Otrzymane w wyniku badań inhibitory MBP stanowią potencjalne nowe związki o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, podobnie jak koniugaty wykorzystujące nośnik molekularny. Osiągnięcie sformułowanych powyżej celów głównych było możliwe dzięki realizacji następujących celów szczegółowych:

- Wybór inhibitorów enzymatycznych wykorzystywanych w koniugatach oraz ich strukturalna modyfikacja w wybranych, niektórych przypadkach.
- Wybór i synteza znaczników fluorescencyjnych umożliwiających otrzymanie fluorescencyjnych analogów tworzonych koniugatów.
- Wybór i opracowanie metody syntezy uproszczonego sideroforu hydroksamowego, który zostanie wykorzystany jako nośnik.
- Zbadanie możliwości połączenia otrzymanego sideroforu, będącego nośnikiem molekularnym z cząsteczkami transportowanymi.
- Opracowanie metody syntezy połączenia sideroforu z cząsteczkami transportowanymi.
- Wybór oraz synteza rozszczepialnego łącznika typu „trimethyl lock” oraz zbadanie możliwości połączenia łącznika TML z wybranym nośnikiem molekularnym.
- Opracowanie metody syntezy połączenia siderofor-TML i zbadanie możliwości otrzymania koniugatów tego połączenia z cząsteczkami transportowanymi.
- Wybór struktur aminokwasowych jako potencjalnych inhibitorów MBP oraz opracowanie metod ich syntezy.
- Identyfikacja otrzymanych związków z wykorzystaniem technik spektralnych (NMR, MS) i chromatograficznych (TLC, LC, HPLC).

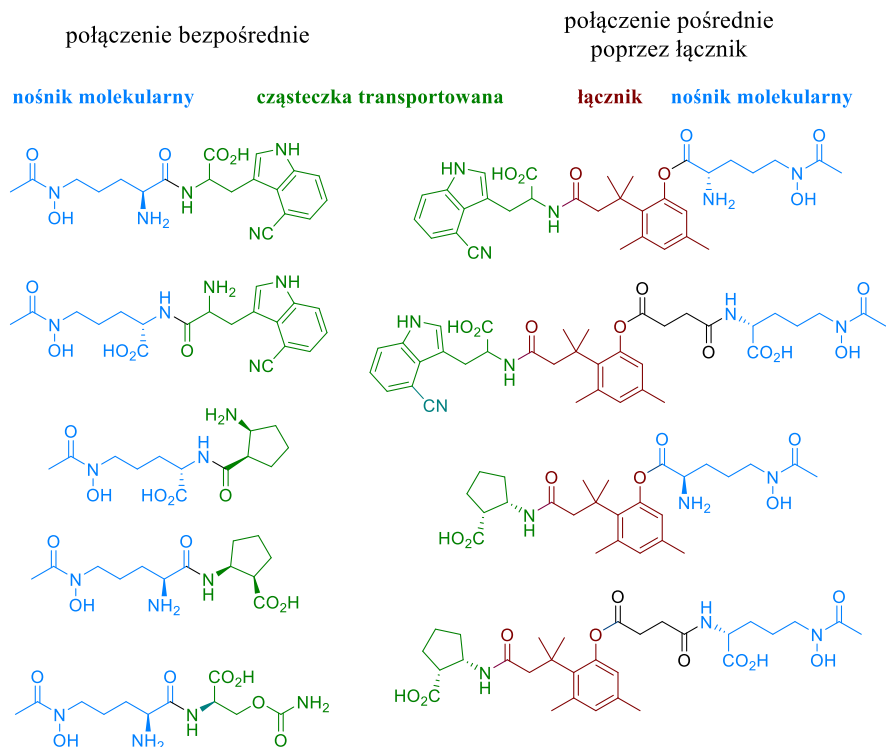
Połączenia zawierające sondy fluorescencyjne zostały przeznaczone do badania efektywności wnikania koniugatów do komórek drobnoustrojów,

natomiast dla połączeń zawierających inhibitory enzymatyczne została określona ich aktywność przeciwdrobnoustrojowa. Aktywność biologiczna potencjalnych inhibitorów MBP została zbadana dla wybranych enzymów szlaku MBP.

Druga strategia, którą zastosowałam w projektowaniu i syntezie cząsteczek o potencjale przeciwgrzybowym, zakłada wybór oraz zaprojektowanie syntezy związków o strukturze aminokwasów w oparciu o nowe cele molekularne. Działanie proponowanych cząsteczek jest ukierunkowane na wybrane enzymy szlaku biosyntezy L-metioniny, które mogą być uznawane za potencjalne cele molekularne, co opisałam w części literaturowej (str. 47).

3.1. Planowanie struktur i dobór składników koniugatów sideroforów

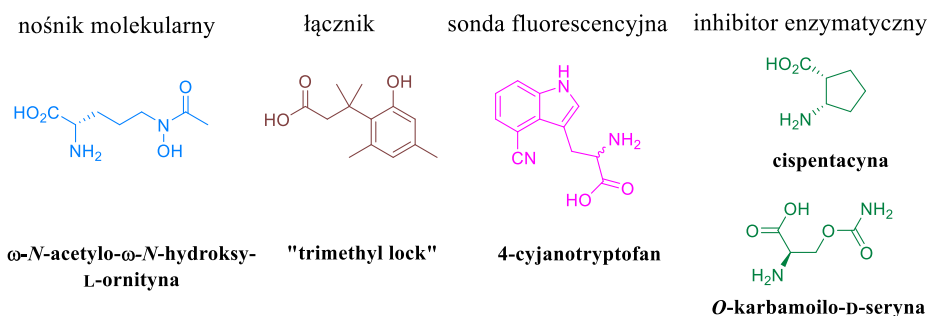
Proponowane struktury proleków można podzielić na koniugaty będące bezpośrednim połączeniem nośnika molekularnego z cząsteczką transportowaną oraz połączenia wykorzystujące łącznik pomiędzy tymi dwoma elementami. Na Rys. 3.2 przedstawiłam struktury otrzymanych związków.



Rys. 3.2. Struktury dwóch rodzajów proponowanych połączeń siderofor – cząsteczka transportowana: połączenia bezpośrednie oraz pośrednie, zawierające w swojej strukturze łącznik.

Nośnikiem molekularnym wykorzystywanym w proponowanych przeze mnie połączeniach jest uproszczony siderofor hydroksamowy - ω -N-acetylo- ω -N-hydroksy-L-ornityna (AHO). Dla połączeń zawierających w swojej strukturze

Łącznik zastosowałam rozszczepialny układ „trimethyl lock” (TML), co umożliwia uwolnienie natywnej formy cząsteczki transportowanej (leku lub związku fluorescencyjnego) w pobliżu celu molekularnego. Cząsteczką transportowaną w proponowanych strukturach jest związek fluorescencyjny SF (4-cyjanotryptofan) albo inhibitor enzymatyczny IE, będący antymetabolitem bakteryjnym (*O*-karbamoilo-D-seryna) lub grzybowym (cispentacyna). Struktury poszczególnych elementów przedstawiłam na Rys. 3.3.



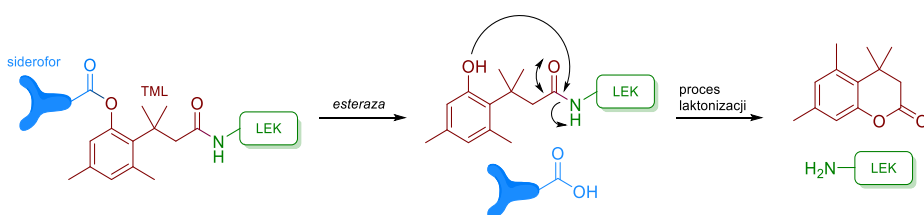
Rys. 3.3. Struktury poszczególnych elementów wykorzystywanych do konstrukcji koniugatów.

Cispentacyna (CP) jest β -aminokwasem, który jako inhibitor enzymatyczny jest dość skuteczny przeciwko zakażeniom układowym wywołanym przez grzyby z rodzaju *Candida* oraz *Cryptococcus neoformans*.¹³⁴ Działanie tego inhibitora związane jest z kompetytywym blokowaniem jednego z enzymów grzybowych (syntazy Ile-tRNA^{Ile}). Polarna i prosta budowa cząsteczki sprawiła, że zdecydowałam się wykorzystać cispentacynę jako cząsteczkę transportowaną w proponowanych koniugatach. Założyłam, że utworzone proleki zwiększą transport cispentacyny do wnętrza komórek, co przełoży się na wzrost jej aktywności przeciwgrzybowej. Ponadto, aby sprawdzić czy koniugaty wykorzystujące hydroksamowy siderofor jako nośnik molekularny mogą być również rozpoznawane przez organizmy bakteryjne wykorzystałam *O*-karbamoilo-D-serynę (KSer) jako cząsteczkę transportowaną. Z kolei, ten inhibitor hamuje syntezę ściany komórkowej bakterii jako antagonist D-alaniny, co zaobserwowano dla organizmów bakteryjnych z gatunku *B. subtilis* oraz *S. aureus*.¹³⁵ Podobnie, jak w przypadku cispentacyny, zdecydowałam się wykorzystać inhibitor, którego struktura jest polarna i relatywnie prosta. W celu zbadania transportu koniugatów do wnętrza komórek patogennych grzybów postanowiłam wykorzystać koniugaty niebieskiego znacznika fluorescencyjnego 4-cyjanotryptofanu (CNTrp), który jest pochodną endogennego aminokwasu. Ponadto, odznacza się silną fluorescencją, dobrą fotostabilnością oraz widmem emisyjnym w zakresie światła widzialnego.¹³⁶ Cechy te sprawiły, że CNTrp jest wykorzystywany w obrazowaniu biologicznym w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*. Uzyskane koniugaty tej sondy fluorescencyjnej

zostały poddane badaniom z wykorzystaniem techniki mikroskopii fluorescencyjnej.

Zdecydowałam, że nośnikiem molekularnym będzie siderofor. Z całej gamy tego typu związków moją uwagę skupiłam na kwasie rodotorulowym z kilku powodów.⁵⁰ Po pierwsze jest zbudowany z pochodnych aminokwasów. Ponadto, jest sideroforem zawierającym ugrupowania hydroksamowe, a właśnie tego typu jonofory są zdecydowanie częściej produkowane i wydzielane przez komórki grzybowe. Były to przesłanki, aby wykorzystać fragment kwasu rodotorulowego do uproszczenia struktury nośnika molekularnego. Proponowany przeze mnie nośnik sideroforowy jest strukturą „uproszczoną”, składającą się z grupy aminokwasowej oraz grupy hydroksamowej zlokalizowanej w łańcuchu bocznym aminokwasu (Rys. 3.3). „Uproszczenie” struktury w tym przypadku oznacza wykorzystanie tylko pojedynczej jednostki wiążącej jony żelaza, czyli w przypadku sideroforów hydroksamowych jest to pojedyncza grupa hydroksamowa. Zaproponowana przeze mnie struktura oparta została na idei uproszczonego ‘sideroforu’ występującego w strukturze komercyjnie dostępnego leku cefiderocolu (str. 39, Rys 1.23). Obecny w cząsteczce katecholanowy siderofor nie występuje naturalnie w środowisku oraz posiada pojedynczą jednostkę zdolną do wiązania jonów żelaza – fragment katecholanowy. Na podstawie tego fragmentu w analogiczny sposób zaplanowałam strukturę sideroforu hydroksamowego, którą wykorzystałam jako nośnik molekularny.

Dla koniugatów wykorzystujących łącznik pomiędzy nośnikiem molekularnym a cząsteczką transportowaną zastosowałam rozszczepialny układ „trimethyl lock”, który rozpada się pod wpływem esteraz obecnych w cytoplazmie zgodnie z mechanizmem przedstawionym na Rys. 3.4.

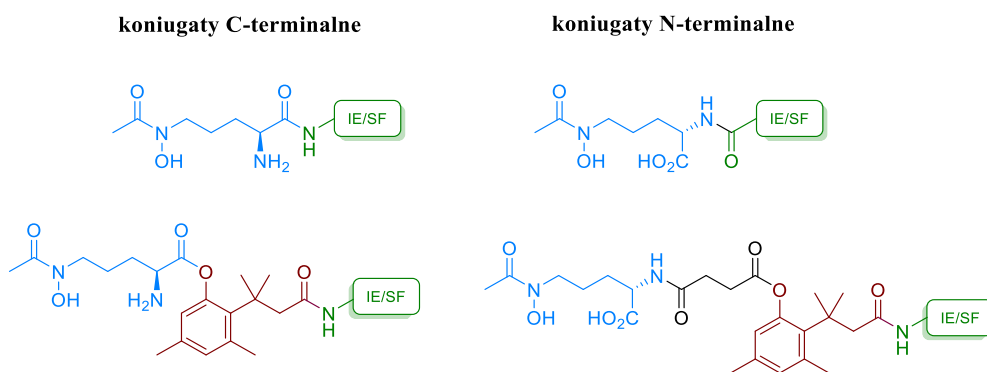


Rys. 3.4 Mechanizm uwalniania leku połączonego z TML-nośnik.

W wyniku hydrolizy enzymatycznej uwolniona zostaje fenolowa grupa hydroksylowa, która atakuje elektrofilowy atom węgla karbonylowego wiązania amidowego utworzonego pomiędzy układem TML a cząsteczką transportowaną. W wyniku tego ataku cząsteczka transportowana zostaje uwolniona i powstaje cykliczny produkt uboczny. Ze względu na strukturę fragmentu TML zdecydowałam się na połączenie inhibitorów enzymatycznych lub sondy fluorescencyjnej

z łącznikiem w dwojaki sposób poprzez grupę: karboksylową oraz fenolową układu TML.

Jako, że wybrany nośnik molekularny ma strukturę aminokwasu, postanowiłam zsyntezować koniugaty łącząc cząsteczkę transportowaną zarówno poprzez aminową, jak i karboksylową grupę sideroforu. Ogólną ideę struktury tworzonych koniugatów – z wykorzystaniem łącznika TML lub połączonych ze sobą bezpośrednio zamieściłam na Rys. 3.5. Tworząc połączenia poprzez różne grupy funkcyjne nośnika molekularnego chciałam sprawdzić, czy uzyskane proleki będą w tym samym stopniu rozpoznawane i transportowane do wnętrza komórek grzybów.



Rys. 3.5 Struktury koniugatów C- oraz N-terminalnych połączonych bezpośrednio z cząsteczką transportowaną albo z zastosowaniem rozszczepialnego łącznika TML.

Ze względu na nukleofilowy charakter grupy hydroksylowej TML, w przypadku połączeń poprzez aminową grupę sideroforu, wymagane było zastosowanie dodatkowego krótkiego łącznika. W tym celu wybrałam kwas bursztynowy. Jego prosta budowa (brak chiralnych atomów węgla czy dodatkowych grup funkcyjnych, m. in. aminowych, hydroksylowych) pozwala na łatwe wprowadzenie struktury do cząsteczki łącznika, a także zastosowanie ortogonalnej grupy ochronnej dla reszty karboksylowej. Ponadto zapewnione jest wiązanie estrowe z grupą fenolową, co jest kluczowe dla prawidłowego uwalniania cząsteczki transportowanej. W większości koniugatów cząsteczkę transportowaną przyłączyłam poprzez jej ugrupowanie nukleofilowe, czyli poprzez jej grupę aminową. Dla koniugatów bezpośrednio połączonych poprzez grupę aminową sideroforu logicznym wydawało się wykorzystanie elektrofilowego ugrupowania cząsteczek transportowanych.

Synteza koniugatów opierała się na idei otrzymania oraz łączenia poszczególnych jego elementów – sideroforu jako nośnika molekularnego, łącznika TML (jeśli występował w koniugacie) oraz IE lub SF jako cząsteczki transportowanej. Zarówno nośnik – siderofor, jak i łącznik TML oraz cząsteczki

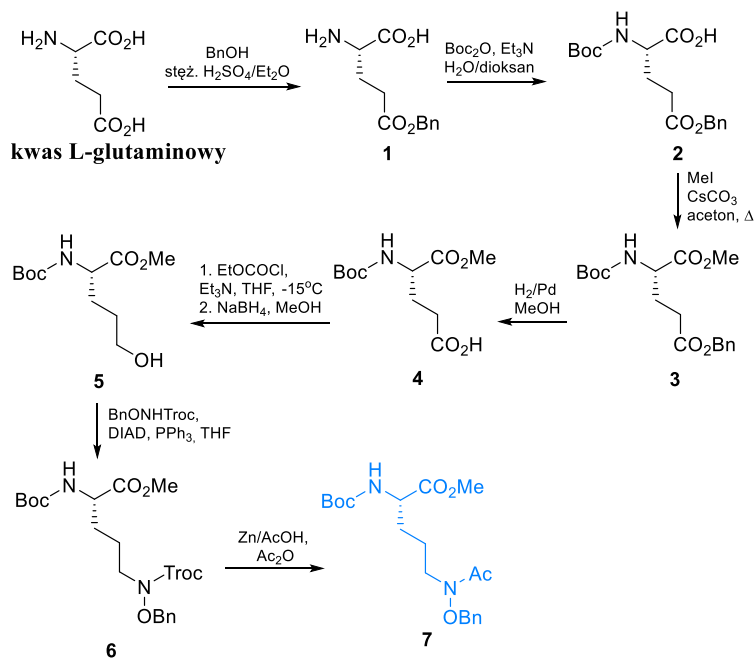
transportowane: CNTrp oraz KSer syntezowałam *de novo* z prostych i komercyjnie dostępnych odczynników chemicznych. Największym wyzwaniem podczas projektowania struktur koniugatów oraz ich syntezy było dobranie odpowiednich i ortogonalnych względem siebie grup ochronnych. Dodatkowym wymaganiem była ich stabilność w warunkach przeprowadzanych kolejnych przemian chemicznych. Jako że ugrupowanie hydroksamowe obecne w nośniku molekularnym jest silnie nukleofilowe oraz jest w stanie tworzyć kompleksy z jonami żelaza, uznałam, że jest to grupa funkcyjna, która musi zostać uwolniona w możliwie najpóźniejszym etapie syntezy. Aby to umożliwić zdecydowałam się na konstrukcję sideroforu w taki sposób, aby hydroksylowa grupa była w formie benzyłowego eteru. Zaletą tego ugrupowania jest stabilność w warunkach kwaśnych, zasadowych oraz łagodnie redukcyjnych. Resztę grup ochronnych doбираłam tak, aby możliwym było ich usuwanie bez naruszenia ochrony grupy hydroksylowej.

Dla koniugatów typu C-terminalnego, nośnik molekularny najpierw połączyłam z łącznikiem TML, po czym zmodyfikowałam jego łańcuch boczny, aby finalnie wprowadzić cząsteczkę transportowaną do struktury. Dla koniugatów typu N-terminalnego na początku przyłączyłam cząsteczkę transportowaną do układu TML zawierającego dodatkowy krótki łącznik, po czym do uzyskanej struktury wprowadziłam siderofor. Struktury otrzymanych w ten sposób koniugatów zostały potwierdzone z wykorzystaniem trzech metod badań strukturalnych: ^1H oraz ^{13}C NMR, a także MS. Dodatkowo dla każdego końcowego, chiralnego produktu sprawdziłam skręcalność właściwą. Na związkach zawierających CNTrp została sprawdzona zdolność koniugatów do przenikania i akumulacji w komórkach grzybowych z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej. Związki zawierające CP i KSer zostały przekazane do zbadania ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Ponadto połączenia CP zawierające łącznik TML poddałam hydrolizie enzymatycznej w celu sprawdzenia efektywności uwalniania cząsteczki transportowanej.

3.1.1. Synteza nośnika molekularnego – sideroforu hydroksamowego ω -N-acetylo- ω -N-hydrokso-L-ornityny

Zaproponowana przeze mnie droga syntezy sideroforu hydroksamowego ω -N-acetylo- ω -N-hydrokso-L-ornityny (AHO) została oparta na syntezie kwasu rodotorulowego opisanej przez Nakao i współpracowników.¹³⁷ Zdecydowałam się użyć opisaną metodę, stosując modyfikacje niektórych etapów. Decyzję o wykorzystaniu tej drogi syntezy uzasadniłam kilkoma argumentami. Po pierwsze, autorzy rozpoczynają syntezę wykorzystując ester γ -benzyłowy kwasu L-glutaminowego, który można otrzymać na wiele sposobów z kwasu L-glutaminowego jako substratu. Aminokwas ten jest także komercyjnie dostępny

oraz tani. Ważnym argumentem jest to, że zawiera już w swojej strukturze odpowiednią konfigurację na stereogenicznym atomie węgla C α . Kolejnym powodem jest dogodne wprowadzanie grupy hydroksamowej do cząsteczki i to w pożądaną przeze mnie formie eteru benzyłowego. Ponadto wykorzystywane podczas syntezy grupy ochronne, a mianowicie ugrupowania: *tert*-butoksykarbonyłowe (Boc), 2,2,2-trichloroetoksykarbonyłowe (Troc), ester metyłowyy oraz eter benzyłowy są względem siebie ortogonalne. Taka sytuacja umożliwiła mi utworzenie połączeń zarówno od strony grupy aminowej, jak i karboksylowej sideroforu z wykorzystaniem tego samego substratu. Schemat syntezy nośnika molekularnego przedstawiłam na Rys. 3.6.



Rys. 3.6 Synteza chronionej ω -N-acetylo- ω -N-hydroksyj-L-ornityny 7.

Pierwszym etapem syntezy jest tworzenie estru benzyłowego na grupie karboksylowej umiejscowionej w łańcuchu bocznym aminokwasu. Zdecydowałam się na przeprowadzenie prostej estryfikacji metodą Fishera¹³⁸ z wykorzystaniem alkoholu benzyłowego w środowisku kwasu siarkowego. Czysty produkt **1** uzyskałam po wykonaniu dwóch krystalizacji: pierwszą przeprowadziłam z mieszaniny etanol-pirydyna w 0°C, a następną w wodzie z dodatkiem pirydyny. Pomimo tego, że wydajność reakcji nie przekracza 60%, jako że kwas glutaminowy jest tanim i dobrze dostępnym odczynnikiem chemicznym, nie stanowiło to większego problemu. Ester kwasu glutaminowego **1** próbowałam również uzyskać stosując metodę kompleksowania grup aminokwasowych jonami miedzi Cu²⁺,

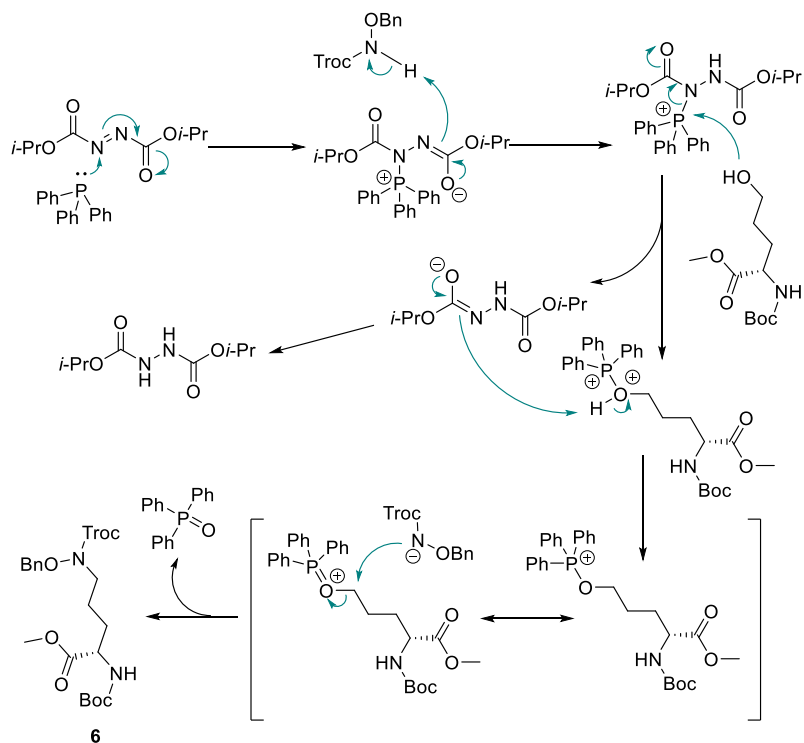
w której grupy α -aminokwasowe są dezaktywowane poprzez utworzenie stabilnych kompleksów z jonami miedzi Cu^{2+} , co pozwala na modyfikację łańcucha bocznego. Wprowadzenie do aminokwasu CuCl_2 wraz z alkoholem benzylovym w podwyższonej temperaturze pozwala na estryfikację grupy ω -karboksylowej bez obecności kwasu. Prawdopodobny mechanizm tej reakcji został opisany przez Ma i współpracowników.¹³⁹ Wydajność procesu była podobna do estryfikacji metodą Fisher'a, co było zapewne spowodowane dodatkowym procesem usuwania jonów miedzi z pochodnej aminokwasu **1** z wykorzystaniem EDTA.

Po uzyskaniu estru benzylovego **1** kolejnymi etapami syntezy było wprowadzenie grup ochronnych na ugrupowania: aminowe oraz α -karboksylowe. Po zastosowaniu klasycznej ochrony *tert*-butyloksykarbonylowej na atomie azotu, utworzyłam ester metylowy przy użyciu jodku metylu.¹⁴⁰ W opisie syntezy przeprowadzonej przez Nakao¹³⁷ etap estryfikacji oparty jest na metodzie Steglich'a, gdzie odczynnikiem sprzęgającym jest chlorowodorek EDC w obecności katalitycznej ilości DMAP. Pomimo tego, że metoda ta jest wydajna to ze względu na ilość substratu, dla której musiałam wykonać estryfikację nie była ona ekonomicznie faworyzowana. Ester metylowy **3** uzyskałam działając jodkiem metylu na pochodną **2** w środowisku bezwodnego acetonu oraz węglanu cezu. Na tym etapie niezbędnym było oczyszczenie produktu **3** cieczą chromatografią kolumnową, co w efekcie skutkowało wydajnością reakcji ok 85%.

W kolejnym kroku otrzymałam pochodną **4** z wolną grupą ω -karboksylową umiejscowioną w łańcuchu bocznym aminokwasu. Zdjęcie estru benzylovego przeprowadzałam w standardowych warunkach reakcji redukcji wodorem na katalizatorze palladowym. Jako, że reakcja ta zachodzi ilościowo a powstający produkt jest chemicznie czysty, po odsączeniu katalizatora oraz odparowaniu rozpuszczalników do suchej pozostałości uzyskałam czysty kwas karboksylowy **4**. Następnie związek **4** poddałam reakcji redukcji grupy ω -karboksylowej, co skutkowało utworzeniem ugrupowania hydroksymetylenowego. Tym sposobem pozyskałam dogodny substrat do przeprowadzenia reakcji Mitsunobu, w wyniku której do cząsteczki wprowadziłam strukturalny prekursor pożądanej grupy hydroksamowej. Redukcję kwasu **4** przeprowadziłam dwuetapowo. W pierwszym etapie przekształciłam związek **4** w mieszaną bezwodnik, działając chloromrówczanu etylu, a w drugim – zastosowałam borowodorek sodowy jako właściwy reduktor. Kontrola TLC wykazała brak substratu po godzinie od rozpoczęcia reakcji. Czynniki redukujące NaBH_4 należy do łagodnych reduktorów, zdolnych do selektywnej redukcji grup karbonylowej oraz karboksylowej względem estrów lub amidów. Autorzy¹³⁷ przeprowadzają redukcję w środowisku wodnym i uzyskują produkt z wydajnością 89%. Stosując takie same warunki otrzymywałam produkt **5** z wydajnościami co najwyżej 40%, co na tym etapie jest czynnikiem dość

ograniczającym. Uznałam, że dodatek wody, pomimo stosowania niskiej temperatury doprowadza do hydrolizy pewnych ilości utworzonego bezwodnika zanim zostanie on zredukowany, co w efekcie skutkuje znacznym obniżeniem wydajności. Dlatego też zdecydowałam się zastosować metanol¹⁴¹ jako rozpuszczalnik, co spowodowało zwiększeniem wydajności do 64%. Ponadto, borowodurek wprowadzałam w dwóch porcjach w odstępie 30 min w obniżonej temperaturze. Po zakończeniu reakcji wyizolowałam czysty produkt **5** stosując cieczerową chromatografię kolumnową i tak otrzymany alkohol **5** poddałam reakcji Mitsunobu w celu wprowadzenia grupy hydroksyaminowej do cząsteczki.

Reakcja Mitsunobu wykorzystuje trifenylofosfinę oraz azozwiązki, np. azodikarboksylanu diizopropylu DIAD do przekształcenia alkoholi pierwszo- lub drugorzędowych w obecności ugrupowań o charakterze nukleofilowym do różnorodnych związków organicznych, takich jak estry, aminy, etery czy sulfidy. Jest ona szeroko stosowana w syntezie produktów naturalnych, a jej mechanizm przedstawiłam na przykładzie związku **5** na Rys. 3.7.¹⁴² Reakcję rozpoczyna atak trifenylofosfiny na atom azotu azozwiązku, w tym przypadku DIAD. Kolejno, utworzony produkt przejściowy odrywa proton sprzężonego z nukleofilem kwasu, który stosuje się w reakcji. Jako prekursor grupy hydroksamowej zastosowałam Troc chronioną *O*-benzylohydroksyloaminę (BnONHTroc), którą uprzednio otrzymałam z *O*-benzylohydroksyloaminy. Wiele czynników utwierdziło mnie w decyzji zastosowania pochodnej benzylowej, w tym fakt, że została ona już z powodzeniem zastosowana w tej konkretnej syntezie.¹³⁷ Dodatkowym atutem jest odporność eteru benzylowego na niskie pH, warunki hydrolizy zasadowej czy łagodnej redukcji. W następnym etapie wolna para elektronowa umiejscowiona na atomie tlenu alkoholu atakuje atom fosforu, przy czym opuszczająca grupa azozwiązku odbiera atom wodoru grupy hydroksylowej. W efekcie tworzy się addukt alkohol-fosfina, który charakteryzuje się zmniejszoną gęstością elektronową na atomie węgla sąsiadującym z grupą hydroksylową, czyniąc go dobrym centrum elektrofilowym podatnym na ataki odczynników nukleofilowych. Po ataku chronionej hydroksyloaminy otrzymałam związek **6** oraz produkt uboczny w postaci tlenku trifenylofosfiny (Rys. 3.7).



Rys. 3.7 Mechanizm reakcji Mitsunobu przedstawiony na kwasie (S)-2-amino-5-hydroksypentanowym w środowisku DIAD, Ph₃P oraz *N*-Troc-*O*-benzylohydroksyloaminy.

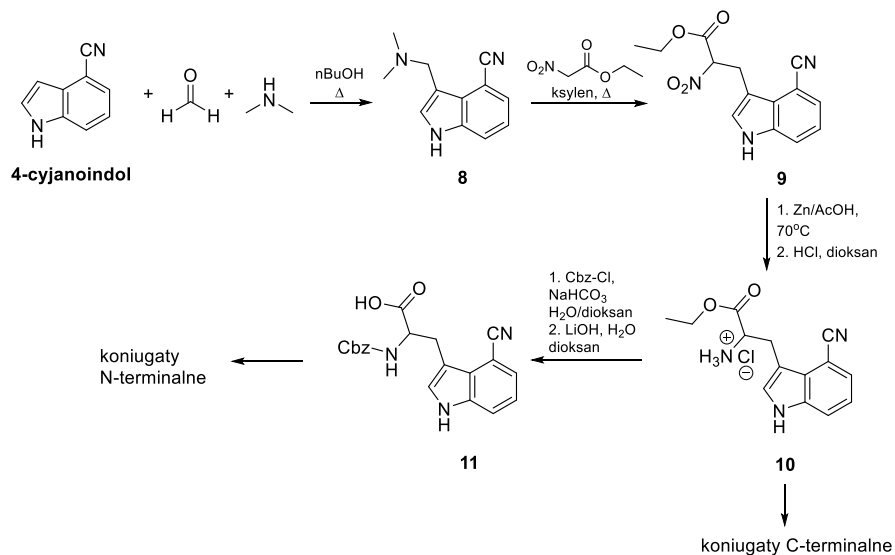
Ze względu na charakter reakcji należy ograniczyć występowanie innych niż BnONHTroc odczynników nukleofilowych, dlatego też jako rozpuszczalnik stosowałam świeżo destylowany THF. Ponadto w trakcie procesu powstaje produkt uboczny hydrazyno-1,2-dikarboksylan diizopropylu, który również może zaatakować centrum elektrofilowe. Z tego względu DIAD wprowadzałam do mieszaniny reakcyjnej powoli wkraplając jego roztwór w THF. Wydajność tego procesu zazwyczaj przekraczała 85%, a pozyskany produkt należy oczyścić na drodze cieczowej chromatografii kolumnowej.

W ostatnim kroku syntetycznym przygotowania sideroforowego elementu usunęłam grupę ochronną Troc z atomu azotu znajdującym się w łańcuchu bocznym i w jej miejsce wprowadziłam grupę acetylową. W ten sposób utworzyłam ugrupowanie hydroksamowe w chronionej na atomie tlenu formie. W reakcji Mitsunobu można również wykorzystać wolną *O*-benzylohydroksyloaminę bez osłony Troc, jednakże izolacja produktu z zastosowaniem chromatografii kolumnowej zachodzi zdecydowanie trudniej. Usunięcie grupy Troc prowadziłam w warunkach łagodnej redukcji z użyciem cynku w kwasie octowym. W tych warunkach pozostałe grupy ochronne – Boc, eter benzylowy lub ester metylowy nie zostają naruszone. Podczas prowadzenia reakcji redukcji dodatek bezwodnika

octowego pozwala na jednoczesne usunięcie grupy Troc i wprowadzenie w to miejsce grupy acetylowej. Po odsączeniu cynku i usunięciu rozpuszczalników produkt oczyściłam stosując standardową metodę chromatografii kolumnowej. Otrzymany tym sposobem siderofor **7** mogłam wykorzystać do tworzenia połączeń bezpośrednio z inhibitorami enzymatycznymi czy wskaźnikiem fluorescencyjnym lub do tworzenia połączeń wykorzystujących labilny łącznik TML. Jako że wszystkie pozostałe w produkcie **7** grupy ochronne są ortogonalne mogłam usunąć selektywnie metylowy ester lub grupę Boc, aby sprzęgać siderofor na dwa możliwe sposoby. Jak już wcześniej wspomniałam, eter benzylowy musiał pozostać w strukturze do końca syntezy, ponieważ ugrupowanie hydroksamowe jest reaktywną grupą funkcyjną i mogłoby ulegać niepożądanym przemianom chemicznym podczas dalszych kroków syntetycznych.

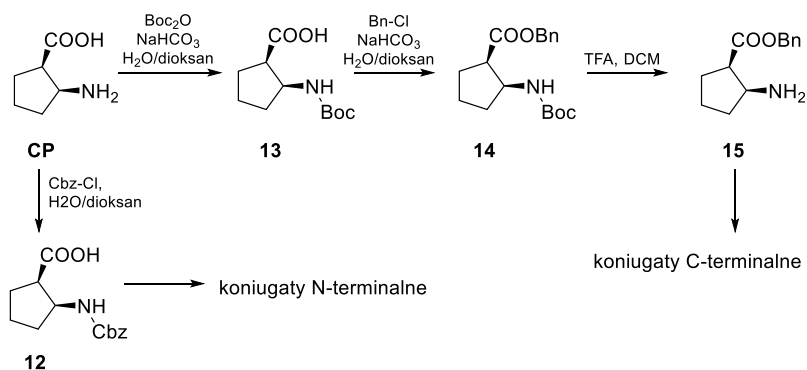
3.1.2. Synteza pochodnych przeciwwgrzybowych i przeciwbakteryjnych inhibitorów enzymatycznych oraz markera fluorescencyjnego

Aby otrzymać planowane koniugaty na początku musiałam uzyskać odpowiednio zmodyfikowane struktury inhibitorów enzymatycznych lub związków fluorescencyjnych. Do konstrukcji sond fluorescencyjnych wykorzystywałam substrat w postaci 4-cyjanotryptofanu CNTrp, który otrzymałam korzystając z procedury zamieszczonej w literaturze patentowej.¹⁴³ Synteza zaczyna się od reakcji Mannicha, która wykorzystuje 4-cyjanoindol, formaldehyd oraz *N,N*-dimetyloaminę jako substraty (Rys. 3.8). Tak powstała 4-cyjanograminę **8**, w następnym kroku syntetycznym, poddałam reakcji kondensacji z nitrooctanem etylu. Tworzy się pochodna nitrowa **9**, którą przekształciłam w warunkach łagodnej redukcji w ester etylowy 4-cyjanotryptofanu i wyodrębniłam w postaci soli **10**. Warto zaznaczyć, że tym sposobem uzyskuje się mieszaninę racemiczną, co oznacza, iż otrzymane przeze mnie koniugaty CNTrp z cząsteczkami zawierającymi centra stereogeniczne są mieszaniną diastereoizomerów. Fakt ten jednak nie stanowił dla mnie problemu, gdyż stosowałam CNTrp jako wskaźnik fluorescencyjny, którego zadaniem było pokazanie wnikania koniugatów do wnętrza komórek drobnoustrojów z zastosowaniem metody mikroskopii fluorescencyjnej. Konfiguracja absolutna chiralnego węgla CNTrp nie powinna w żaden sposób na ten proces wpływać. Ponadto dla bezpośrednich *N*-terminalnych połączeń z sideroforem hydroksamowym uzyskałam m. in. pochodną **11**, która może tworzyć amidowe wiązanie z wykorzystaniem wolnej grupy karboksylowej. Wiedząc, że ostatnim etapem syntezy koniugatów sideroforów jest usunięcie eteru benzylowego z zastosowaniem katalitycznej redukcji wodorem, starałam się dobierać pozostałe grupy funkcyjne tak, aby można je było usunąć równocześnie (Rys. 3.8).



Rys. 3.8 Synteza 4-cyjanotryptofanu oraz jego pochodnych.

Do konstrukcji koniugatów będących potencjalnymi chemoterapeutykami o działaniu przeciwrzybowym wykorzystałam cispentacynę CP jako cząsteczkę transportowaną. CP jest aminokwasem, co pozwoliło na utworzenie połączeń z sideroforem lub łącznikiem poprzez grupę aminową albo karboksylową z zastosowaniem uprzednio przygotowanych pochodnych **12** i **15** jako substraty (Rys. 3.9).

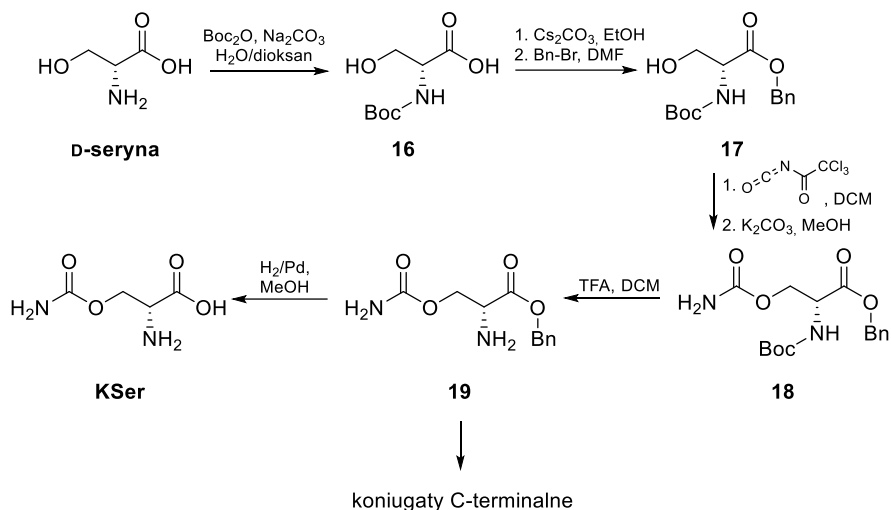


Rys. 3.9 Syntezy pochodnych cispentacyny.

Związek **12** – substrat do tworzenia bezpośrednich N-terminalnych połączeń z nośnikiem molekularnym, otrzymałam przez wprowadzenie grupy Cbz do cząsteczki CP. Drugi z substratów, ester benzyłowy **15** zsyntezowałam w trzech etapach. Obejmowały one przygotowanie Boc-CP **13**, której grupa Boc jest ortogonalna względem estru benzyłowego. Następnie zstryfikowałam grupę

karboksylową, a aminową uwolniłam przy użyciu TFA. Związek **15** wykorzystałam do syntezy C-terminalnych koniugatów bezpośrednio łączonych z nośnikiem oraz koniugatów zawierających łącznik TML (Rys. 3.9).

Kolejny chemoterapeutyk, który wykorzystałam w swoich badaniach to *O*-karbamoilo-D-cykloseryna. Substrat w tej syntezie, D-serynę, przeprowadziłam w pochodną Boc **16**, a następnie w ester benzyłowy **17**, stosując standardowe warunki tak, jak przedstawiałam na poniższym schemacie (Rys. 3.10).



Rys. 3.10 Synteza *O*-karbamoilo-D-seryny **KSer**

Łańcuch boczny zmodyfikowałam stosując izocyjanian trichloroacetylu, który reagując z grupą hydroksylową alkoholu tworzy trichloroacetylokarbaminian.¹⁴⁴ Podatny na hydrolizę produkt pośredni przeprowadziłam w karbaminian **18** za pomocą węglanu potasu w metanolu. Jako że chciałam uzyskać C-terminalne połączenia z nośnikiem molekularnym, usunęłam grupę ochronną Boc uzyskując ester benzyłowy **19**. Synteza wolnej KSer wymagała pozbycia się pozostałych grup ochronnych, co przeprowadziłam stosując standardowe metody.

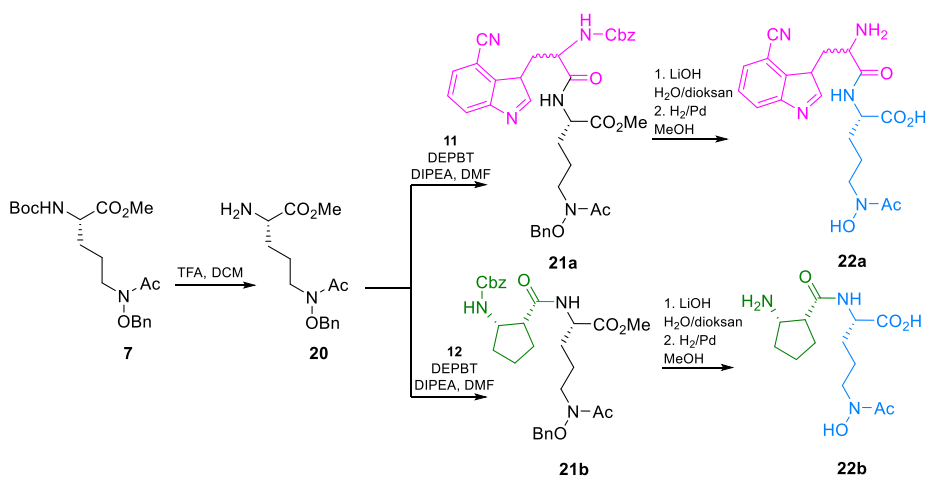
3.1.3. Synteza bezpośrednich połączeń siderofor hydroksamowy-cząsteczka transportowana

Po otrzymaniu nośnika molekularnego oraz odpowiednio zmodyfikowanych cząsteczek inhibitorów albo związków fluorescencyjnych, postanowiłam je połączyć za pomocą wiązania amidowego. Wydawało mi się to naturalne ze względu na charakter budowy obydwu elementów. Wykorzystując grupę aminową albo karboksylową sideroforu AHO mogłam wybrać kompatybilną grupę aminokwasową cząsteczek transportowanych, tak aby utworzyć wiązanie. Koniugaty, w których wiązanie amidowe utworzyłam angażując grupę

karboksylową AHO nazywam połączeniami C-terminalnymi, natomiast jeśli zaangażowaną grupą w tworzone wiązanie była grupa aminowa AHO, to takie połączenia noszą nazwę N-terminalnych.

Synteza N-terminalnych połączeń sideroforu ω -N-acetylo- ω -N-hydroksy-L-ornityny z cząsteczką transportowaną

N-Terminalne bezpośrednie koniugaty składają się z nośnika molekularnego AHO, który związany jest kowalencyjnie poprzez grupę aminową z CNTrp albo CP. Tym samym końcowe produkty posiadają wolną grupę karboksylową AHO oraz aminową pochodzą od CP lub CNTrp. Drogę syntezy poszczególnych połączeń przedstawiłam na schemacie Rys. 3.11.



Rys. 3.11 Synteza N-terminalnych bezpośrednich połączeń AHO z 4-cyjanotryptofanem **22a** oraz cispentacyną **22b**.

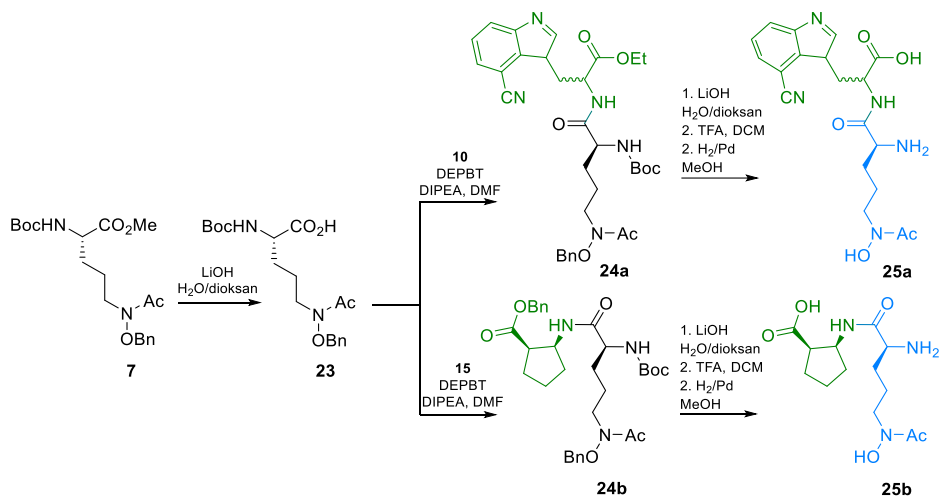
Syntezę rozpoczęłam od usunięcia ochrony grupy aminowej z uprzednio przygotowanego sideroforu hydroksamowego **7**. Kolejno, utworzyłam odpowiednie połączenia związku **20** z pochodną 4-cyjanotryptofanu **11** lub cispentacyny **12** stosując metodę estrów aktywnych DEPBT. Wybrałam ten odczynnik sprzęgający ze względu na jego wyjątkowo niskie ryzyko racemizacji w trakcie tworzenia wiązania peptydowego, które przebiega z wysoką wydajnością. Po utworzeniu estru aktywnego, zawsze oczyszczałam go stosując cieczową chromatografię kolumnową i dopiero do tak przygotowanego, czystego produktu pośredniego wprowadzałam siderofor **20**. Reakcję prowadziłam stosując bezwodny DMF jako rozpuszczalnik w obecności DIPEA jako zasady. Powstałe koniugaty **21ab** również oczyszczałam stosując tę samą technikę, jak w przypadku estrów aktywnych. Końcowe związki **22ab** otrzymałam po usunięciu grup ochronnych, kolejno estru metylowego za pomocą zasadowej hydrolizy oraz grupy Cbz i eteru benzyłowego stosując

katalityczną redukcję wodorem. Struktury czystych produktów zostały potwierdzone za pomocą spektroskopii ^1H oraz ^{13}C NMR, a także spektrometrią mas MS. Ponadto, dla finalnej struktury z CP zmierzyłam skręcalność właściwą. Związek **22a** przekazałam do sprawdzenia efektywności pobierania cząsteczek koniugatu do wnętrza komórek grzybowych z rodzaju *Candida* z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej. Natomiast związek **22b** został przekazany do badań aktywności przeciwgrzybowej na wybrane szczepy z rodzaju *Candida*.

Synteza C-terminalnych połączeń sideroforu ω -N-acetylo- ω -hydroksy-L-ornityny z cząsteczką transportowaną

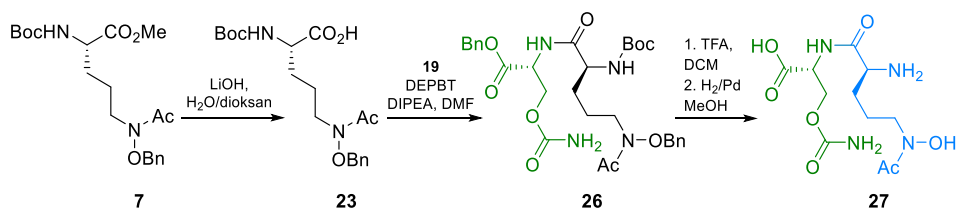
Drugi typ bezpośrednich połączeń AHO z cząsteczkami biologicznie aktywnymi zsyntezowałam za pośrednictwem jej grupy karboksylowej uzyskując koniugaty C-terminalne. Podobnie jak w przypadku N-terminalnych pochodnych, substratami były odpowiednio chronione aminokwasy CNTrp oraz CP. Chciałam porównać uzyskane struktury pod względem zdolności do akumulacji koniugatów w komórkach patogennych drobnoustrojów (połączenia CNTrp) oraz aktywności przeciwgrzybowej (połączenia CP). Ewentualne różnice mogą wynikać z obecności różnych wolnych grup aminokwasowych sideroforu, podczas gdy jedna z nich jest zaangażowana w tworzenie wiązania amidowego.

Synteza takich połączeń, której drogę podałam na schemacie poniżej (Rys. 3.12), jest analogiczna do otrzymywania koniugatów N-terminalnych. Po usunięciu estru metylowego korzystając z metody estrów aktywnych DEPBT połączyłam odpowiednio ochronioną AHO **23** z estrami: etylowym **10** lub benzylowym **15**. Podobnie jak w przypadku syntezy N-terminalnych pochodnych, aby przeprowadzić reakcję sprzęgania najpierw oczyściłam otrzymany ester aktywny kwasu **23**. Koniugat zawierający w strukturze związek fluorescencyjny poddałam kolejno hydrolizie zasadowej w celu usunięcia estru etylowego, acydolizie, aby pozbyć się grupy Boc oraz katalitycznej redukcji wodorem, by uzyskać wolną grupę hydroksylową. Zdolność końcowego produktu **25a** do akumulacji w komórkach grzybowych z rodzaju *Candida* została sprawdzona za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej, podobnie jak w przypadku związku **22a**. Analogicznie, związek **25b** został przekazany do badań na aktywność przeciwgrzybową.



Rys. 3.12 Synteza bezpośrednich C-terminalnych połączeń AHO z CNT **25a** oraz CP **25b**.

Sugerując się wynikami badań biologicznych postanowiłam również otrzymać C-terminalne połączenie nośnika molekularnego z chemoterapeutykami przeciwbakteryjnymi, aby sprawdzić, czy uproszczony siderofor hydroksamowy AHO mógłby być również rozpoznawany i pobierany przez organizmy bakteryjne. Aby odpowiedzieć na tak postawiony problem, przeprowadziłam syntezę połączenia AHO z KSer, którą zaprezentowałam na poniższym schemacie (Rys. 3.13).



Rys. 3.13 Synteza bezpośrednich C-terminalnych połączeń AHO z KSer.

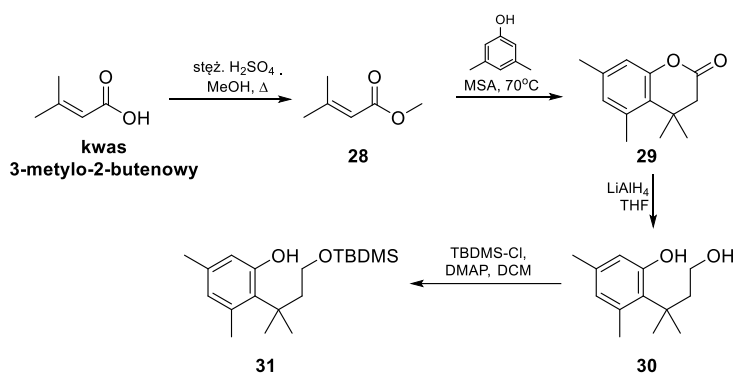
Połączenie nośnika molekularnego z KSer utworzyłam stosując metodę DEPBT, po czym usunęłam grupę ochronną Boc oraz eter benzylowy ze struktury **26**, co pozwoliło mi uzyskać produkt **27**.

Aby sprawdzić możliwość akumulacji C-terminalnych połączeń AHO w komórkach bakteryjnych przekazałam związek **25a** na badania z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej, które tym razem przeprowadzono na szczepach *B. subtilis*. Natomiast aktywność przeciwbakteryjna koniugatu **27** została zbadana na szczepach *B. subtilis*, *S. aureus* oraz *E. coli*.

3.1.4. Synteza rozszczepialnego łącznika „trimethyl lock”

Kolejne struktury połączeń AHO, które zostały przeze mnie zaplanowane, składają się z trzech elementów: nośnika molekularnego, łącznika oraz cząsteczki transportowanej. Zdecydowałam się wykorzystać rozszczepialny łącznik TML, który pod wpływem działania esteraz uwalnia cząsteczkę, np. inhibitora enzymatycznego w przestrzeni cytoplazmatycznej komórki. Szczegółowo omówiłam działanie łącznika TML oraz innych wybranych przykładów rozszczepialnych łączników oraz ich połączeń, w tym z sideroforami w części literaturowej.

Rdzeń TML, który wykorzystywałam w dalszej syntezie otrzymałam metodą opisaną w literaturze przez Amsberry’ego i Borchardta.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ Drogi syntezы prekursora rdzenia łącznika TML przedstawiałam na Rys. 3.14.



Rys. 3.14 Synteza prekursora rdzenia „trimethyl lock”.

W pierwszym kroku otrzymałam ester metylowy kwasu 3-metylo-2-butenowego stosując klasyczną estryfikację Fishera przy użyciu metanolu oraz kwasu siarkowego (VI) jako katalizatora. Kolejno, powstały ester **28** poddałam reakcji kondensacji z 3,5-dimetylofenolem w obecności katalizatora – kwasu metanosulfonowego. Następnie lakton **29** zredukowałam do alkoholu działając glinowodorkiem litu w bezwodnym THF. Powstałą fenolową pochodną **30** przeprowadziłam w eter silylowy **31** wykorzystując chlorek *tert*-butyldimetylosilylowy w obecności DMAP. Selektywna ochrona pierwszorzędowej grupy hydroksylowej pozwoliła mi na prowadzenie dalszych modyfikacji na fenolowym atomie tlenu związku **31**, co wykorzystałam w kolejnych syntezach.

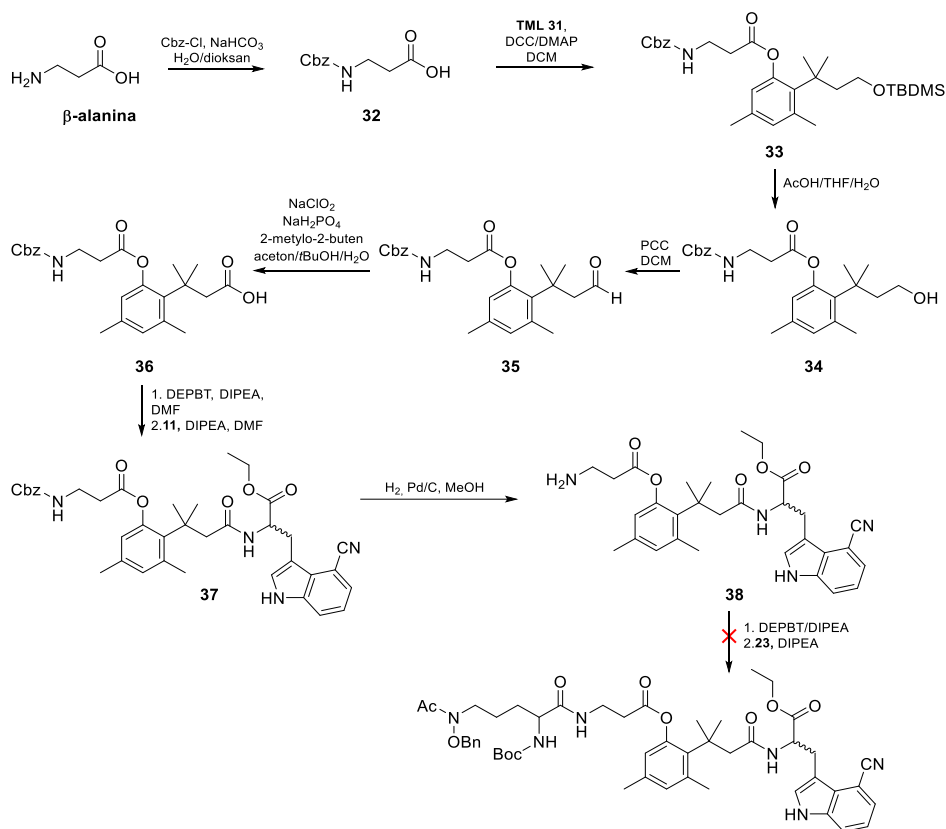
3.1.5. Synteza połączeń siderofor-inhibitor enzymatyczny z wykorzystaniem rozszczepialnego łącznika TML

Koniugaty sideroforów wykorzystujące łącznik TML, podobnie jak w przypadku koniugatów bezpośrednich, postanowiłam zsyntezować wykorzystując grupę aminową lub karboksylową nośnika molekularnego. W tym przypadku siderofor AHO musiał być związany z TML poprzez fenolowy atom tlenu w taki sposób, aby umożliwić enzymatyczny rozpad koniugatu. To skutkowałoby spontaniczną cyklizacją układu, w wyniku której zostaje uwolniona cząsteczka związku transportowanego. Jako że w swojej pracy wykorzystuję rozszczepialny pod wpływem esteraz łącznik, fenolowy atom tlenu TML musiał tworzyć wiązanie estrowe. Zaplanowanie syntezy C-terminalnych połączeń sideroforu z TML było dość oczywiste, jednakże większy problem stanowiły połączenia N-terminalne. Ponieważ niemożliwym jest połączenie dwóch nukleofilowych fragmentów bezpośrednio ze sobą, zdecydowałam się na wykorzystanie dodatkowego łącznika. W syntezie tego typu połączeń największym wyzwaniem było dobranie odpowiednich grup ochronnych, które będą względem siebie ortogonalne oraz stabilne w warunkach poszczególnych etapów syntezy.

Synteza C-terminalnych połączeń sideroforu ω -N-acetylo- ω -N-hydroksy-L-ornityny z cząsteczką transportowaną z wykorzystaniem łącznika TML

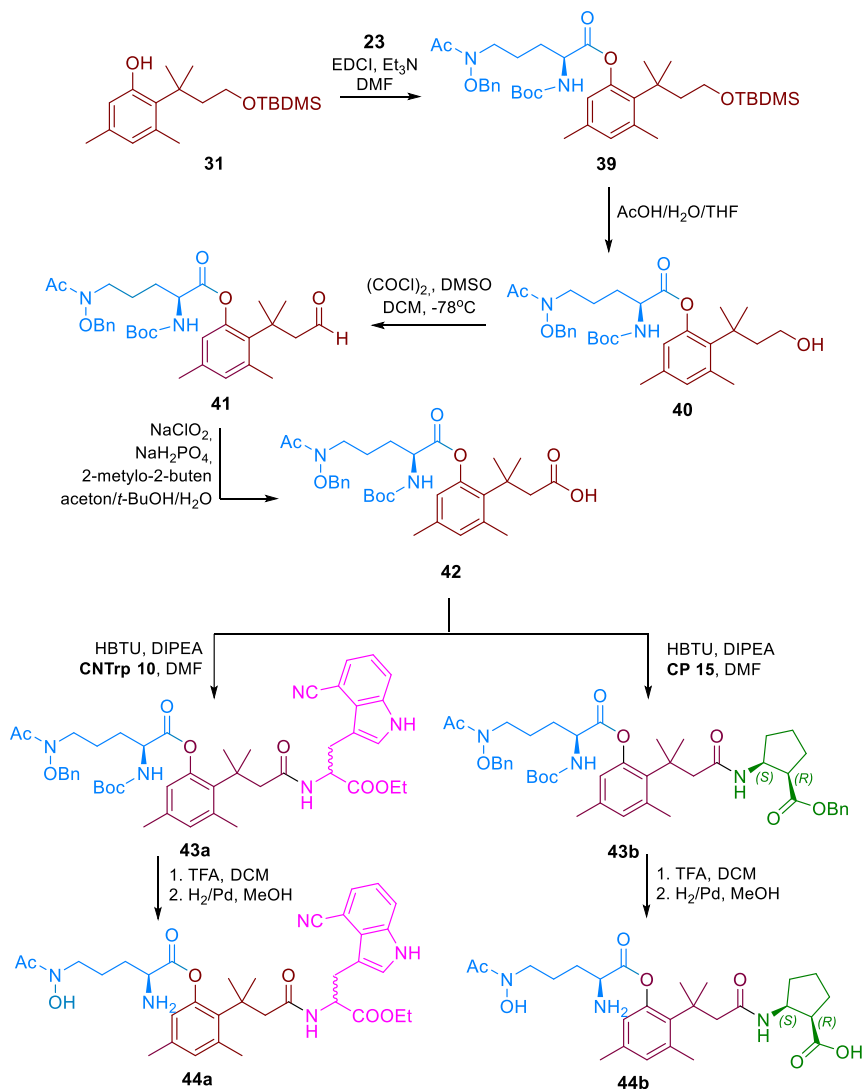
Planując syntezę połączeń zawierających łącznik TML pierwotnie zakładałam, że struktury C-terminalnych oraz N-terminalnych koniugatów będą jak najbardziej zbliżone budową. Dlatego też chciałam utworzyć połączenia C-terminalne wykorzystując jak najkrótszy łącznik pomiędzy strukturą TML a sideroforem, podobnie jak w analogach N-terminalnych. Moje zainteresowanie skierowałam w stronę β -alaniny. Jednak moje badania skończyły się połowicznym sukcesem. Udało mi się uzyskać połączenie β -alaniny z TML oraz związkami fluorescencyjnym **11**, które otrzymałam zgodnie z drogą syntezy przedstawioną na poniższym schemacie (Rys. 3.15). W pierwszym etapie przeprowadziłam β -alaninę w pochodną benzyloksykarbonylową,¹⁴⁸ aby kolejno w dogodny sposób połączyć otrzymany związek **32** z fenolową pochodną TML **31**. W tym celu zdecydowałam się na użycie DCC w obecności DMAP, co jest klasyczną metodą sprzęgania wykorzystywaną w syntezie wiązań typu peptydowego. W następnym kroku usunęłam ze struktury **33** ochronną grupę silylową stosując mieszaninę AcOH/THF/woda.¹⁴⁹ Ten zabieg umożliwił mi dalszą modyfikację łańcucha bocznego TML w ten sposób, aby uzyskać grupę karboksylową – miejsce wiązania z cząsteczką transportowaną. Utlenianie grupy hydroksylowej przeprowadziłam w dwóch etapach, najpierw stosując chlorochromian pirydyny otrzymałam aldehyd

35, który po oczyszczeniu na drodze chromatografii kolumnowej zostały poddany utlenianiu Pinnicka z zastosowaniem chlorynu sodu, diwodorofosforanu sodu oraz 2-metylo-2-butenu. Po oczyszczeniu uzyskanego związku **36** połączyłam go ze związkiem fluorescencyjnym **11** stosując metodę estrów aktywnych DEPBT. Podobnie jak w poprzednich przypadkach, najpierw wyizolowałam czysty chromatograficznie ester aktywny, po czym przeprowadziłam sprzężanie w środowisku bezwodnego DMF oraz DIPEA. Ostatnim etapem było redukcyjne usunięcie grupy ochronnej Cbz z łącznika za pomocą katalitycznej redukcji wodorem. Uzyskany, chromatograficznie czysty, produkt **38** postanowiłam połączyć z sideroforem **23** stosując metodę estrów aktywnych DEPBT. Niestety pomimo kilku prób, w których próbowałam zmienić warunki prowadzenia reakcji, np. rozpuszczalnik, stosowaną zasadę, czas czy temperaturę nie udało mi się uzyskać produktu. Z tym samym problemem spotkał się dr inż. M. G. Nowak, który w swojej dysertacji opisał prawdopodobny mechanizm rozpadu połączenia **38** w warunkach prowadzenia reakcji sprzężenia.¹⁵⁰



Rys. 3.15 Synteza połączeń TML z CNTrp oraz sideroforem AHO z wykorzystaniem β -alaniny jako dodatkowego łącznika.

Podjęwając kolejną próbę uzyskania C-terminalnych koniugatów zdecydowałam się nie stosować dodatkowego łącznika i bezpośrednio połączyć nośnik molekularny do TML. Tym sposobem uzyskałam dwa produkty, jeden z CNTrp oraz jeden z CP. Drogę syntezy przedstawiłam na poniższym schemacie (Rys. 3.16).



Rys. 3.16 Synteza C-terminalnych koniugatów sideroforu AHO z CNTrp (**44a**) oraz CP (**44b**) z wykorzystaniem łącznika TML.

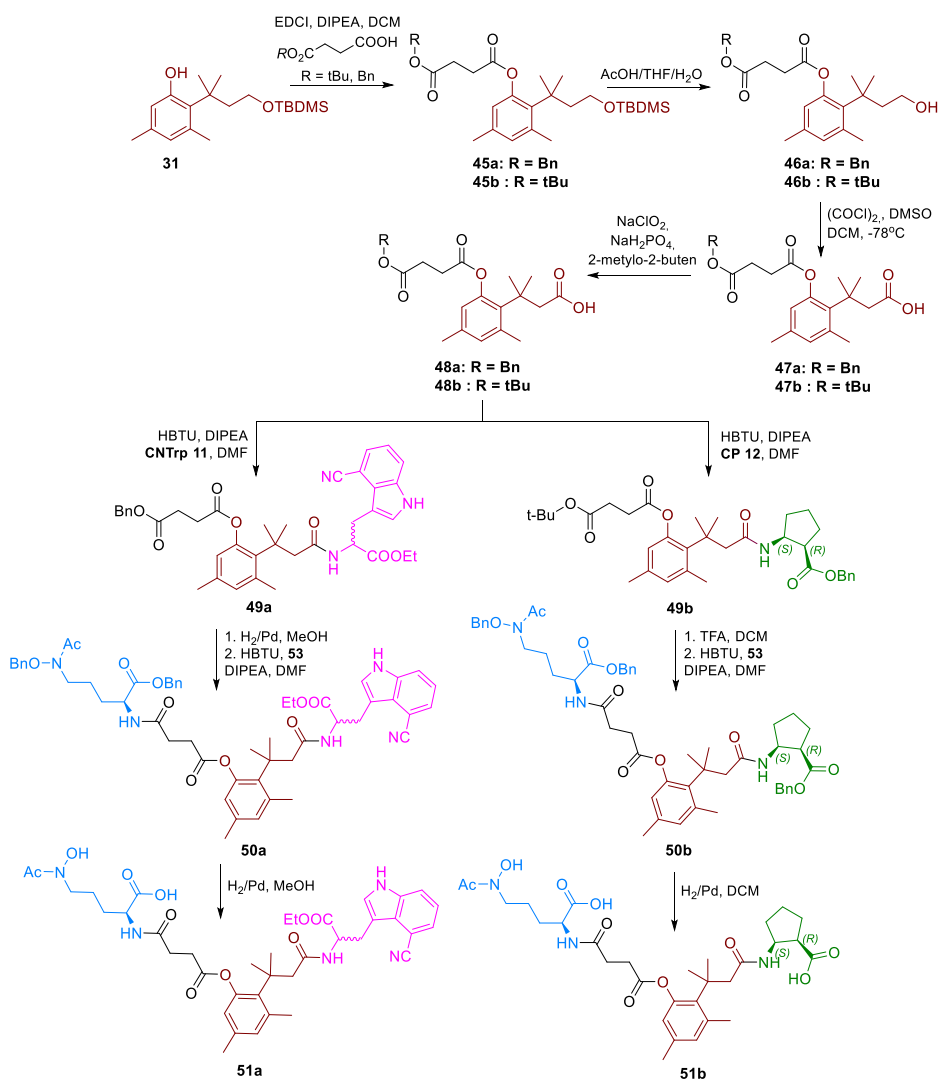
Do sprzęgnięcia fenolowego atomu tlenu TML ze związkiem **23** zastosowałam odczynnik EDCI zamiast DCC, mając nadzieję na uzyskanie lepszej wydajności. Jako, że jest to wieloetapowa synteza, gdzie siderofor wprowadzam już na pierwszym etapie bardzo zależało mi na jak najmniejszych stratach. Szczególną

zaletą użycia EDCI jest możliwość odmycia wodą powstałej mocznikowej pochodnej, co przekłada się na wydajniejszą izolację produktu podczas rozdzielania chromatograficznego. Następnie uzyskany produkt **39** poddałam podobnym przemianom, jak podczas syntezy połączenia β -alaniny z TML. Po usunięciu eteru silylowego utleniałam dwuetapowo grupę hydroksylową do karboksylowej. Nie zdecydowałam się jednak na utlenianie chlorochromianem pirydyny ze względu na konieczność zastosowania techniki cieczonej chromatografii kolumnowej po zakończeniu reakcji. Alkohol przeprowadziłam w aldehyd stosując utlenianie Swerna, co jest zdecydowanie łagodniejszą wersją tego typu procesu oraz nie wykorzystuje się w niej toksycznych chlorochromianów. Ponadto otrzymany aldehyd **41** po ekstrakcji był wystarczająco czysty, aby przeprowadzić kolejny etap bez dodatkowej izolacji produktu. Kolejnym krokiem było utlenienie grupy aldehydowej stosowaną wcześniej metodą Pinnicka, po czym produkt **42** oczyściłam na drodze chromatografii kolumnowej. W kolejnym kroku starałam się połączyć kwas **42** z cząsteczką CNTrp albo CP. Pierwotnie zastosowałam do sprzęgania metodę estrów aktywnych DEPBT, gdyż była już ona przeze mnie stosowana i dawała zamierzone rezultaty z zadowalającymi wydajnościami. Niestety w przypadku omawianych C-terminalnych połączeń z TML, pomimo powstawania produktów, wydajności reakcji sprzęgania nie przekraczały 50%. Dlatego też zastosowałam inny odczynnik sprzęgający HBTU, stosując te same warunki reakcji, tj. bezwodny DMF jako rozpuszczalnik oraz DIPEA jako zasadę. Wydajności reakcji sprzęgania w tych warunkach osiągały ponad 80%. Ostatnim etapem syntezy było pozbycie się pozostałych w strukturze grup ochronnych. Najpierw acydolitycznie usunęłam ochronę grupy aminowej (Boc), a następnie hydrogenolitycznie w obecności katalizatora Pd/C estry i etery benzytowe. W przypadku koniugatu z CNTrp w strukturze pozostał ester etylowy. Jako że w łańcuchu TML obecne jest wrażliwe na hydrolizę zasadową wiązanie estrowe, to na tym etapie, nie było możliwości usunięcia tej osłony. Pomimo tego, jako że związek **44a** przeznaczony był do oceny możliwości wnikania koniugatu do wnętrza komórek grzybowych nie stanowiło to większego problemu. Podobnie, jak w przypadku pozostałych koniugatów CNTrp, związek **44a** przekazałam do sprawdzenia przenikania cząsteczek koniugatu do wnętrza komórek grzybowych z rodzaju *Candida* z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej. Natomiast związek **44b** został przekazany do badań aktywności przeciwgrzybowej na wybrane szczepy z rodzaju *Candida*.

Struktury wszystkich omówionych związków potwierdziłam spektroskopią ^1H oraz ^{13}C NMR, a także spektrometrią mas. Dla optycznie czynnego produktu **44b** wyznaczyłam skręcalność właściwą. Czystość produktów potwierdziłam stosując metodę wysokosprawnej chromatografii cieczonej (HPLC) z detektorem absorpcji światła (DAD).

Synteza N-terminalnych połączeń sideroforu ω -N-acetylo- ω -N-hydroksy-L-ornityny z cząsteczką transportowaną z wykorzystaniem łącznika TML

N-Terminalne połączenia, jak już wcześniej wspomniałam, wymagały użycia dodatkowego łącznika, który umożliwił związanie grupy aminowej sideroforu oraz utworzenie wiązania estrowego z fenolowym atomem tlenu, co jest istotne dla prawidłowego mechanizmu uwalniania układu TML. Wybrany przeze mnie dodatkowym łącznikiem był kwas bursztynowy, który wprowadziłam do struktury TML w pierwszych krokach syntezy koniugatów (Rys. 3.17).

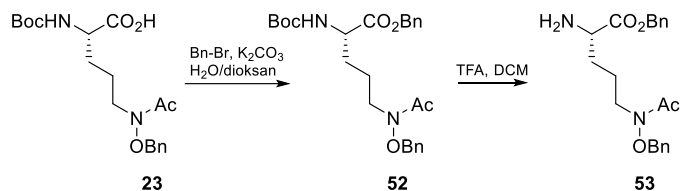


Rys. 3.17 Schemat syntezy N-terminalnych koniugatów sideroforu AHO z CNT (51a) oraz CP (51b) z wykorzystaniem łącznika TML.

Na fenolowy atom tlenu związku **16** działałam monoestrem wybranego kwasu w obecności odczynnika sprzęgającego EDCI oraz diizopropylaminy jako zasady. W syntezie połączenia z CNTrp zastosowałam monoester benzyłowy kwasu bursztynowego,¹⁵¹ gdyż można go bezpiecznie i wydajnie usunąć ze struktury końcowej. Natomiast dla połączenia z CP użycie tego estru jest niemożliwe, gdyż w cząsteczce **12** znajduje się już taka grupa ochronna. Ze względu na brak możliwości selektywnego zdjęcia grupy benzyłowej z łącznika bursztynowego musiałam zastosować inny ester i zdecydowałam się na monoester *tert*-butyłowy.¹⁵² Jest on ortogonalny względem estru benzyłowego oraz można go łatwo i wydajnie usunąć acydolitycznie.

W przeciwieństwie do C-terminalnych połączeń, w pierwszej kolejności wprowadzałam do łącznika TML cząsteczkę transportowanego związku, np. CNTrp, a dopiero później uzyskany związek łączyłam z nośnikiem molekularnym. Rozwiązanie to wydawało mi się bezpieczniejsze, gdyż mogłam przeprowadzić modyfikacje boczne łańcucha TML nie narażając struktury sideroforu na ewentualne zmiany w środowisku prowadzenia kolejnych reakcji. W przypadku C-terminalnych połączeń nie miałam takiej możliwości, jako że w pierwszej kolejności należało utworzyć wiązanie estrowe pomiędzy nośnikiem a układem TML.

Przed rozpoczęciem syntezy N-terminalnych połączeń zastąpiłam obecny w AHO ester metylowy estrem benzyłowym (Rys. 3.18). Po sprzężeniu TML z nośnikiem molekularnym usunięcie estru metodą hydrolizy zasadowej jest niemożliwe ze względu na wrażliwość łącznika TML. Dlatego wybrałam ester benzyłowy, który można rozłożyć hydrogenolitycznie. Dodatkowo, w ostatnim etapie syntezy grupy ochronne związku **53** usuwa się jednocześnie z ochroną benzyłową grupy karboksylowej CP.



Rys. 3.18 Schemat syntezy estru benzyłowego sideroforu hydroksamowego **53**.

Modyfikacje łańcucha bocznego przeprowadziłam analogicznie do połączeń TML z β -alaniną. W pierwszym etapie ze struktur związków **45ab** usunęłam siliolową grupę ochronną stosując mieszaninę AcOH/THF/woda (Rys. 3.17). W kolejnym kroku dwuetapowo utleniałam uwolnioną grupę hydroksylową w grupę karboksylową. Dokonałam tego zaczynając od utleniania metodą Swerna do aldehydu, a następnie metodą Pinnicka do kwasu karboksylowego. Tak

przygotowane pochodne **48ab** łączyłam z pochodnymi aminokwasów **11** albo **12** stosując metodę estrów aktywnych HBTU w obecności DIPEA jako zasady. Po izolacji i oczyszczeniu produktów metodą cieczowej chromatografii kolumnowej, z otrzymanych związków **49ab** usunęłam ochronne grupy za pomocą katalitycznej redukcji wodorem – w przypadku estru benzyłowego lub acydolitycznie – w przypadku estru *tert*-butyłowego. Wolne grupy karboksylowe poddałam reakcji sprzęgania z odpowiednio przygotowanym sideroforem hydroksamowym **53** stosując ponownie estry aktywne HBTU. Po katalitycznej redukcji wodorem otrzymałam chromatograficznie czyste produkty **51ab**. Analogicznie do innych koniugatów, związek **51a** został przekazany do pomierzenia zdolności penetracji błony komórkowej patogennych komórek grzybowych, natomiast związek **51b** – do badań aktywności przeciwgrzybowej na wybrane szczepy z rodzaju *Candida*.

Struktury wszystkich omówionych związków potwierdziłam spektroskopią ¹H oraz ¹³C NMR, a także spektrometrią mas. Dla optycznie czynnego produktu **51b** wyznaczyłam skręcalność właściwą. Czystość produktów potwierdziłam stosując metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detektorem absorpcji światła (DAD).

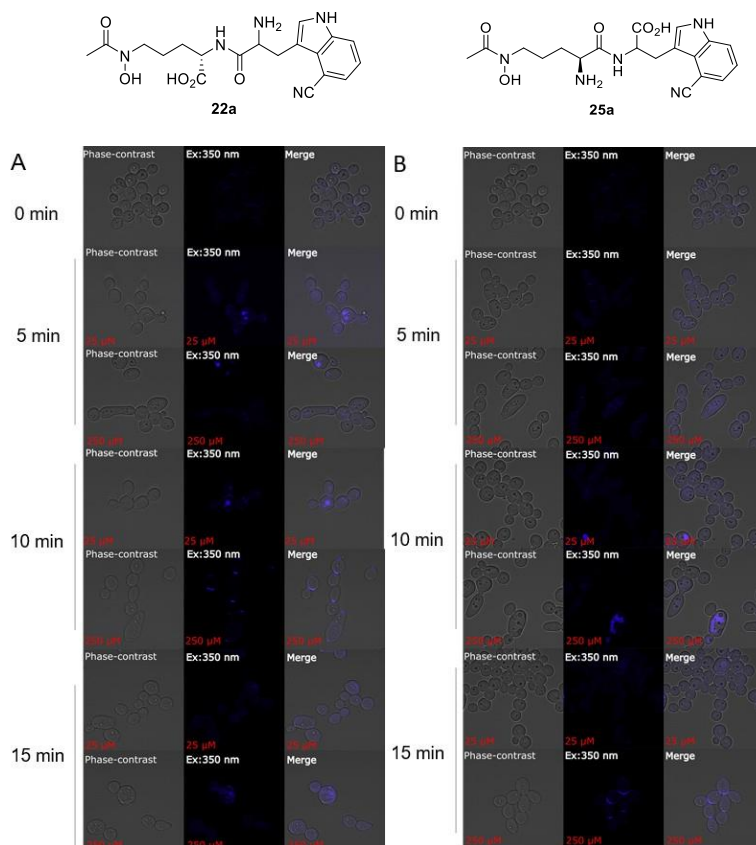
3.2. Wyniki badania właściwości biologicznych otrzymanych koniugatów sideroforów

Otrzymane przeze mnie koniugaty sideroforów poddane zostały analizie właściwości biologicznych, obejmujących pomiar aktywności przeciwdrobnoustrojowej *in vitro* oraz transportu i akumulacji w komórkach. Badania aktywności przeciwgrzybowej i/lub przeciwbakteryjnej wobec modelowych szczepów grzybów z rodzaju *Candida* oraz bakterii *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* zostały wykonane w Katedrze Technologii Leków i Biochemii przez dr hab. inż. Piotra Szwedę, dr inż. Justynę Górską oraz Hirę Zahoor Rajput, MSc. Badania z wykorzystaniem metod mikroskopii fluorescencyjnej zostały wykonane przez dr inż. Natalię Maciejewską. Analizę rozkładu enzymatycznego koniugatów w układzie modelowym przez esterazę z wątroby świni wykonałam wraz z Hirą Zahoor Rajput z wykorzystaniem systemu HPLC-DAD-MS, pod kierunkiem dr inż. Katarzyny Kozłowskiej-Tylingo.

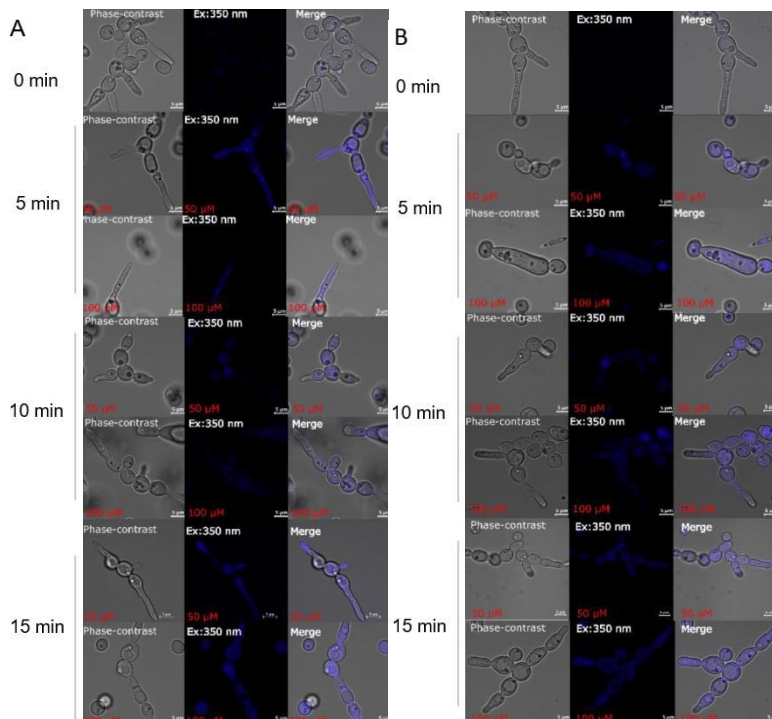
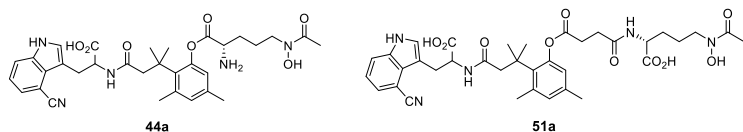
3.2.1. Badanie wnikania koniugatów sideroforów do wnętrza komórek drobnoustrojów

Cztery koniugaty zawierające CNTrp: **22a**, **25a**, **44a** oraz **51a** zostały przekazane w celu weryfikacji ich zdolności do wnikania oraz akumulacji w komórkach grzybowych z rodzaju *Candida* (m. in. *C. glabrata* i *C. albicans*) oraz *A. niger*, a także w komórkach bakteryjnych *E. coli*, *B. subtilis* oraz *S. aureus*.

Akumulację znaczników fluorescencyjnych obserwowano przy użyciu metody mikroskopii konfokalnej w przedziale czasowym 0–15 minut. Obrazy dokumentujące proces pobierania i gromadzenia koniugatów zawierających sondę fluorescencyjną w komórkach *C. albicans* przedstawiłam na Rys. 3.19 i 3.20.



Rys. 3.19 Wychwył i akumulacja koniugatów **22a** (A) i **25a** (B) w komórkach *C. albicans*. Koniugat dodano do zawiesiny komórek w podłożu RPMI-1640 w określonym stężeniu. Próbkę pobraną w odstępach czasu poddano mikroskopii konfokalnej przy powiększeniu $\times 63$, $\lambda_{ex} = 350$ nm, $\lambda_{em} = 430$ nm.



Rys. 3.20 Wychwył i akumulacja koniugatów **44a** (A) i **51a** (B) w komórkach *C. albicans*. Koniugat dodano do zawiesiny komórek w podłożu RPMI-1640 w określonym stężeniu. Próbkę pobraną w odstępach czasu poddano mikroskopii konfokalnej przy powiększeniu $\times 63$, $\lambda_{ex} = 350$ nm, $\lambda_{em} = 430$ nm.

Uzyskane wyniki sugerują, że wszystkie cztery koniugaty AHO zawierające CNTrp były skutecznie transportowane i akumulowane w komórkach *C. albicans* w sposób zależny od czasu i stężenia. Co ciekawe, w przypadku koniugatów **22a** i **25b** niebieska fluorescencja pochodząca z CNTrp wydaje się związana z niezidentyfikowanymi organellami wewnątrzkomórkowymi lub błoną komórkową (Rys. 3.19), podczas gdy równomierne rozmieszczenie wewnątrz komórek poddanych działaniu koniugatów **44a** i **51a** (Rys. 3.20) wskazuje na akumulację sondy fluorescencyjnej w cytozolu. W komórkach *C. glabrata* również zaobserwowano transport i akumulację wszystkich czterech koniugatów, jednakże koniugat **25a** był wychwytywany i akumulowany w wyraźnie wolniejszym tempie niż pozostałe związki. U *A. niger* nie zaobserwowano wewnątrzkomórkowej akumulacji sond fluorescencyjnych. Wyniki uzyskane dla *C. krusei*, *C. parapsilosis* i *C. tropicalis* były niejednoznaczne. Wyniki badań mikroskopowych wskazują, że komórki *C. tropicalis* nie pobierały koniugatów **44a** i **51a**, podczas gdy dla *C. krusei*

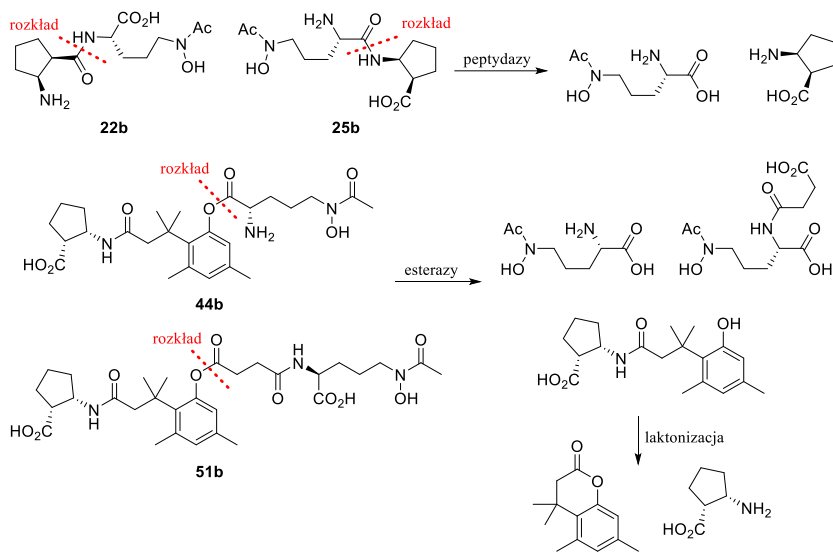
i *C. parapsilosis* zaobserwowano pewną akumulację sond fluorescencyjnych, ale szybkość ich transportu i akumulacji w cytozolu wydaje się stosunkowo niska. Różnice w efektywności transportu do komórek grzybowych wydają się wynikać z obecności lub braku indukowalnego systemu transportu sideroforów hydroksamowych u danego gatunku. Niewątpliwie *C. albicans* i *C. glabrata* posiadają system Sit1/Arn1, aktywowany w warunkach ograniczonej dostępności żelaza.^{153,154} Z drugiej strony, obecność takiego systemu u *A. niger* nie została opisana, a ponadto wiadomo, że grzyb ten wydziela cytrynian i posiada odpowiedni system do pobierania kompleksów cytrynian:Fe(III).¹⁵⁵ W literaturze brakuje danych dotyczących systemów pozyskiwania żelaza u *C. krusei*, *C. parapsilosis* i *C. tropicalis*, jednak wyniki naszych badań sugerują, że przynajmniej *C. tropicalis* nie dysponuje prawdopodobnie żadnym systemem transportu sideroforów hydroksamowych.

Kierując się ciekawością, czy koniugaty zawierające uproszczony siderofor hydroksamowy mogą być rozpoznawane i pobierane przez mikroorganizmy bakteryjne, postanowiliśmy sprawdzić zdolność wnikania koniugatu **44a** do wybranych komórek bakteryjnych. Przeprowadzone badania z użyciem mikroskopii konfokalnej wykluczyły możliwość transportu i akumulacji sondy fluorescencyjnej, gdyż nie zaobserwowano chociażby śladowej fluorescencji wewnątrzkomórkowej w komórkach *Bacillus subtilis* i *Escherichia coli* poddanych działaniu tego koniugatu w stężeniu 100 µM przez 15 minut.

Stwierdzony brak aktywności przeciwbakteryjnej związku **27**, czyli koniugatu AHO i karbamoiloseryny, wobec *E. coli* i *B. subtilis* wydaje się potwierdzać niemożność transportu i akumulacji koniugatów AHO w komórkach bakteryjnych. Nie jest to jednak zaskakujące, gdyż wiadomo, że bakterie niemal wyłącznie wykorzystują siderofory katecholowe, a nie hydroksamowe, do pozyskiwania żelaza.³²

3.2.2. Badanie rozkładów enzymatycznych koniugatów sideroforów

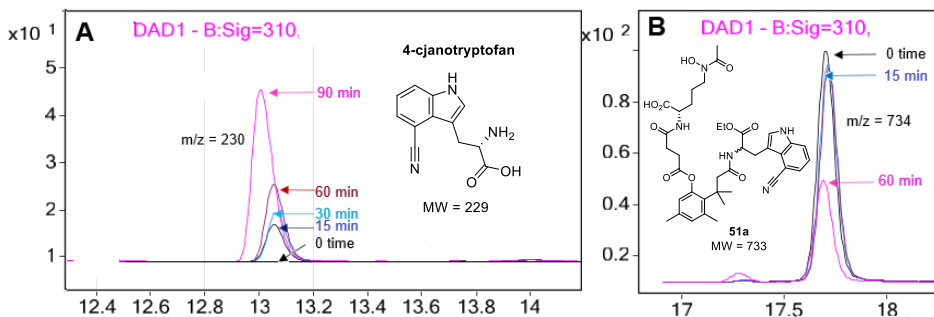
Aby cząsteczka transportowana mogła skutecznie oddziaływać z wewnątrzkomórkowym celem molekularnym, konieczne jest uwolnienie kowalencyjnie związanej grupy aminokwasowej z koniugatu w cytozolu komórkowym. Założyłam, że wiązanie peptydowe łączące AHO i CP w związkach **22ab** oraz **25ab** może być hydrolizowane przez wewnątrzkomórkowe peptydazy, podczas gdy koniugaty zawierające łącznik TML **44ab** i **51ab** powinny być rozszczepiane przez esterazę (esterazy) obecne w cytozolu. W koniugatach **44ab** reszta acylowa tworząca wiązanie estrowe pochodzi od AHO, natomiast w koniugatach **51ab** – od mostka bursztynylowego (Rys. 3.21).



Rys. 3.21 Schematyczne przedstawienie produktów rozpadów enzymatycznych koniugatów cispentacycny

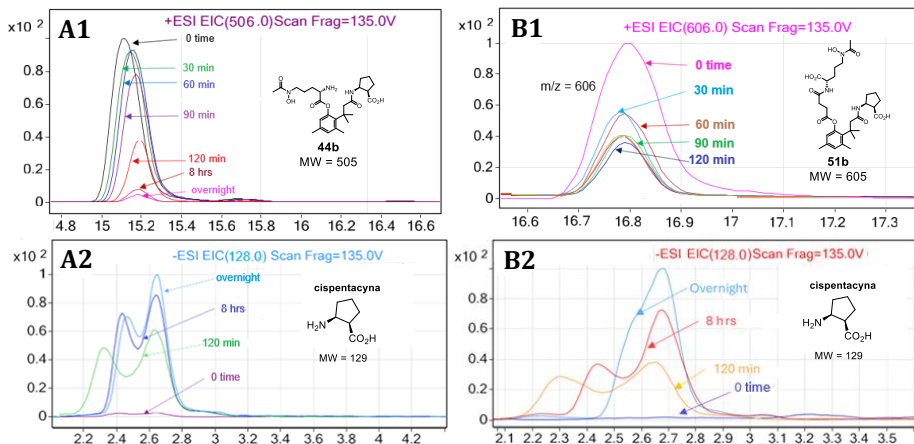
Wrażliwość koniugatów na hydrolizę enzymatyczną została przetestowana w układzie modelowym z użyciem esterazy z wątroby wieprzowej (tylko koniugaty zawierające TML) oraz w ekstrakcie bezkomórkowym z komórek *C. albicans*. Zależne od czasu zanikanie substratu (koniugatu) i pojawianie się produktów rozszczepienia, w szczególności CNTrp lub CP, monitorowano za pomocą analizy HPLC-DAD-MS.

Rozszczepienie enzymatyczne połączeń zawierających TML postanowiłam najpierw przeprowadzić na związkach **44a** i **51a**, gdyż można było łatwo monitorować postęp rozkładu za pomocą detekcji DAD. Wynikało to z obecności układu chromoforowego absorbującego promieniowanie UV, znajdującego się zarówno w CNTrp, jak i koniugacie go zawierającym. Skanowanie MS (tryb dodatniej jonizacji ESI) potwierdziło tożsamość poszczególnych pików. Wyniki analizy HPLC-DAD rozszczepienia enzymatycznego przedstawiłam na przykładzie związku **51a** (Rys. 3.22). Zgodnie z uzyskanymi danymi, koniugat **51a** uległ szybkiemu rozszczepieniu w reakcji katalizowanej esterazą. Po 60 minutach można zaobserwować, że pozostało mniej niż 40% nienaruszonego substratu, (Rys. 3.22 B) co korelowało ze wzrostem ilości uwolnionego produktu rozpadu (Rys. 3.22 A). Obecność CNTrp jako produktu reakcji rozkładu katalizowanej esterazą wskazuje, że dwa wiązania estrowe obecne w związku **51a** (ester TML oraz etylowy) są hydrolizowane przez enzym. Równie szybki proces rozkładu enzymatycznego zaobserwowałam dla związku **44a**.



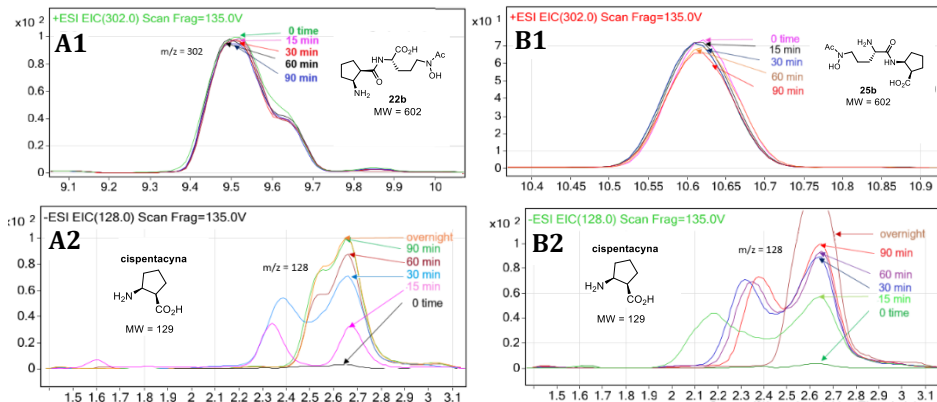
Rys. 3.22 Zależny od czasu rozkład enzymatyczny związku **51a** katalizowany przez esterazę z wątroby wieprzowej. Próbkę analizowano metodą HPLC-DAD-MS. Przedstawiono piki odpowiadające produktowi (A) oraz substratowi (B), które wyekstrahowano z chromatogramów.

Badania rozkładów enzymatycznych przeprowadzone dla związków **44a** oraz **51a** potwierdziły, że cząsteczka transportowana ulega uwolnieniu w wyniku działania esteraz. W kolejnym kroku chciałam sprawdzić, czy podobnie zachowują się ich analogi zawierające fragment TML oraz CP **44b** i **51b**, potraktowane ekstraktem bezkomórkowym uzyskanym z komórek *C. albicans*. Analizę rozkładów enzymatycznych tych związków monitorowałam za pomocą HPLC-MS, ze względu na brak chromoforów w cząsteczce CP możliwych do selektywnego wykrycia za pomocą systemu DAD. Wyniki rozkładu dla koniugatów **44b** oraz **51b** przedstawiłam na Rys. 3.23. Oba związki, podobnie jak w przypadku fluorescencyjnych analogów, okazały się łatwo rozszczepiane przez esterazę(y) obecne w cytozolu komórek *C. albicans*. Po 120 minutach, ilość substratu zmniejszyła się do mniej niż 30% początkowej dla obu związków (Rys. 3.23 A1, B1). Natomiast po 8 godzinach, rozszczepienie koniugatu **44b** było niemal całkowite (Rys. 3.23 A1). W mieszaninie poreakcyjnej zarejestrowałam sygnał pochodzący od produktu o masie cząsteczkowej 129, którego ilość zwiększała się wraz z czasem, w korelacji ze spadkiem ilości substratu. Obecność na chromatogramie dwóch pików o m/z 128 (ESI), oczekiwanej dla CP, jest najprawdopodobniej spowodowana pojawieniem się produktu w postaci dwóch stereoizomerów *cis*- i *trans*- kwasu 2-aminocyklopentanokarboksyłowego. Możliwe, że cytozol komórek *C. albicans* zawiera enzym(y) katalizujące procesy izomeryzacji kwasów.



Rys. 3.23 Zależny od czasu rozkład enzymatyczny związku **44b** (A1, A2) oraz **51b** (B1, B2) w bezkomórkowym ekstrakcie *C. albicans*. Próbkę analizowano metodą HPLC-DAD-MS. Przedstawiono odpowiednie piki odpowiadające substratom (A1 i B1) oraz produktom (A2 i B2), wyekstrahowane z chromatogramów i powiększone w celu lepszej wizualizacji drobnych zmian.

Rozkłady enzymatyczne w ekstrakcie bezkomórkowym *C. albicans* przeprowadzono również dla połączeń CP niezawierających fragmentów TML, czyli związków **22b** i **25b**. Wyniki analizy rozkładów enzymatycznych tych związków monitorowanych HPLC-MS przedstawiam na Rys. 3.24.



Rys. 3.24 Zależny od czasu rozkład enzymatyczny związku **22b** (A1, A2) oraz **25b** (B1, B2) w bezkomórkowym ekstrakcie *C. albicans*. Próbkę analizowano metodą HPLC-MS. Przedstawiono odpowiednie piki odpowiadające substratom (A1 i B1) oraz produktom (A2 i B2), wyekstrahowane z chromatogramów i powiększone w celu lepszej wizualizacji drobnych zmian.

W porównaniu do analogów zawierających TML, oba koniugaty ulegały bardzo powolnemu rozszczepianiu – po 90 minutach ilość substratu zmniejszyła się o mniej niż 5%. Uwolnioną cispentacynę wykryto w niewielkich ilościach, również w postaci dwóch pików o m/z 128. Otrzymane wyniki sugerują, że związki **22b** i **25b** nie stanowią dobrych substratów dla peptydaz obecnych w cytozolu komórek *C. albicans*. Nie jest to szczególnie zaskakujące, ponieważ oba aminokwasy obecne

w tych koniugatach, połączone wiązaniem peptydowym, nie należą do białkowych, a więc różnią się strukturalnie od składników „typowych” substratów peptydowych tych enzymów.

Porównując rozkłady enzymatyczne przeprowadzone w ekstrakcie bezkomórkowym można zauważyć, że związki zawierające rozszczepialny system TML **44b** i **51b** były rozkładane znacznie szybciej i wydajniej niż związki **22b** i **25b**. Oznacza to, że zastosowanie labilnego łącznika znacznie zwiększyło wydajność i tempo uwalniania cząsteczki transportowanej, co może przełożyć się na aktywność biologiczną.

3.2.3. Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej koniugatów sideroforów

Cztery związki zawierające CP **22b**, **25b**, **44b**, **51b** przekazałam na badania aktywności przeciwgrzybiczej *in vitro* przeciwko ludzkim patogennym drożdżakom z rodzaju *Candida*. Uzyskane wyniki porównano do aktywności niezwiązanej cispentacyny. Wartości MIC₉₀ (minimalne stężenie związku hamującego wzrost komórek grzybowych w 90% w porównaniu z próbą kontrolną) określono metodą seryjnych rozcieńczeń stosując trzy media wzrostowe: minimalne YNB (Tabela 3.1), YNB pozbawione miedzi i żelaza (Tabela 3.2) oraz bogate, buforowane RPMI-1640 (Tabela 3.3). Medium RPMI-1640 jest rekomendowane przez CLSI do standaryzowanego oznaczania aktywności przeciwgrzybiczej *in vitro*. Wartości stężeń MIC₉₀ przedstawiono w dwóch wersjach jako µg/mL i mM. Badane związki różnią się istotnie masami cząsteczkowymi (129, 301, 301, 505 i 605 D, odpowiednio dla CP, **22b**, **25b**, **44b** i **51b**), tak więc wartości wyrażone w mM pozwalają na bardziej obiektywne porównanie aktywności poszczególnych związków. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabelach 3.1, 3.2 i 3.3. Brak jakiegokolwiek mierzalnej aktywności danego związku jest reprezentowany przez wartość >1024. Eksperymenty przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

Tabela 3.1 Aktywność przeciwgrzybowa koniugatów sideroforu AHO oraz cispentacyny. Wartości MIC₉₀ określono dla wybranych szczepów z rodzaju *Candida* oraz *A. niger* w podłożu YNB.

Szczep	MIC ₉₀ µg/ml (mM)				
	CP	22b	25b	44b	51b
<i>C. albicans</i>	32 (0.25)	512 (1.70)	512 (1.70)	128 (0.25)	256 (0.42)
<i>C. glabrata</i>	32 (0.25)	>512 (>1.70)	>512 (>1.70)	256 (0.5)	512 (0.85)
<i>C. krusei</i>	32 (0.25)	>512 (>1.70)	>512 (>1.70)	>512 (>1.01)	>512 (>0.85)
<i>C. parapsilosis</i>	64 (0.5)	>512 (>1.70)	>512 (>1.70)	>512 (>1.01)	>512 (>0.85)
<i>C. tropicalis</i>	128 (1.0)	>512 (>1.70)	>512 (>1.70)	>512 (>1.01)	>512 (>0.85)
<i>A. niger</i>	256 (2.0)	>512 (>1.70)	>512 (>1.70)	>512 (>1.01)	>512 (>0.85)

Tabela 3.2 Aktywność przeciwgrzybowa koniugatów sideroforu AHO oraz cispentacyny. Wartości MIC₉₀ określono dla wybranych szczepów z rodzaju *Candida* oraz *A. niger* w podłożu YNB pozbawionego żelaza oraz miedzi.

Szczep	MIC ₉₀ µg/ml (mM)				
	CP	22b	25b	44b	51b
<i>C. albicans</i>	32 (0.25)	256 (0.85)	512 (1.70)	16 (0.03)	16 (0.025)
<i>C. glabrata</i>	32 (0.25)	512 (1.70)	>512 (>1.70)	32 (0.06)	64 (0.11)
<i>C. krusei</i>	32 (0.25)	>512 (>1.70)	>512 (>1.70)	64 (0.13)	128 (0.21)
<i>C. parapsilosis</i>	64 (0.5)	256 (0.85)	>512 (>1.70)	128 (0.25)	256 (0.42)
<i>C. tropicalis</i>	128 (1.0)	>512 (>1.70)	>512 (>1.70)	>512 (>1.01)	>512 (>0.85)
<i>A. niger</i>	256 (2.0)	>512 (>1.70)	>512 (>1.70)	>512 (>1.01)	>512 (>0.85)

Tabela 3.3 Aktywność przeciwgrzybowa koniugatów sideroforu AHO oraz cispentacyny. Wartości MIC₉₀ określono dla wybranych szczepów z rodzaju *Candida* oraz *A. niger* w podłożu RPMI-1640 stosując warunki oznaczania rekomendowane przez CLSI.

Szczep	MIC ₉₀ µg/ml (mM)				
	CP	22b	25b	44b	51b
<i>C. albicans</i>	128 (1.0)	512 (1.70)	512 (1.70)	32 (0.06)	32 (0.05)
<i>C. glabrata</i>	256 (2.0)	512 (1.70)	>512 (>1.70)	64 (0.13)	128 (0.21)
<i>C. krusei</i>	256 (2.0)	>512 (>1.70)	>512 (>1.70)	128 (0.25)	256 (0.42)
<i>C. parapsilosis</i>	256 (2.0)	256 (0.85)	>512 (>1.70)	256 (0.51)	512 (0.85)
<i>C. tropicalis</i>	512 (4.0)	>512 (>1.70)	>512 (>1.70)	>512 (>1.01)	>512 (>0.85)
<i>A. niger</i>	512 (4.0)	>512 (>1.70)	>512 (>1.70)	>512 (>1.01)	>512 (>0.85)

Aktywność przeciwgrzybowa referencyjnej CP w obu pożywkach YNB była wyraźnie wyższa niż w RPMI-1640. Różnica ta wynika z odmiennego składu chemicznego obu pożywek. RPMI-1640 zawiera zestaw aminokwasów proteinogennych, w tym L-prolinę w stężeniu 200 µg/mL, która nie występuje w YNB. Wiadomo, że CP jest transportowana do komórek *C. albicans* przez permeazę proliny,¹³⁴ kodowaną przez gen *GNP2*,¹⁵⁶ a więc konkuruje z L-proliną o miejsce wiązania w tym transporterze.¹⁵⁷ Obecność L-proliny w RPMI-1640 ogranicza możliwość wiązania CP z białkiem transportującym, co zmniejsza jego wychwyty i w rezultacie redukuje aktywność przeciwgrzybiczą.

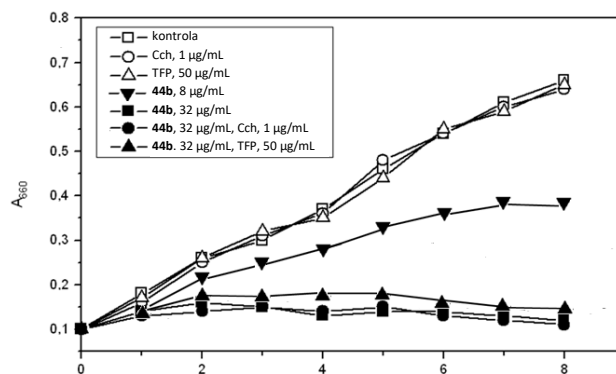
Wszystkie badane koniugaty AHO wykazywały słabą, jeśli w ogóle, aktywność w minimalnym podłożu YNB (Tabela 3.1) oraz hamowały wzrost *C. albicans* z wartościami MIC₉₀ w zakresie 128–512 µg/mL. Koniugaty **44b** i **51b** były bardzo słabo aktywne przeciwko *C. glabrata*, natomiast związki **22b** i **25b** nie wykazały żadnej aktywności.

Znacznie wyższą aktywność inhibicyjną zaobserwowano dla koniugatów zawierających AHO w podłożu YNB bez miedzi i żelaza oraz RPMI-1640. Wszystkie z badanych związków wykazały wartości MIC₉₀ w zakresie 16–512 µg/mL dla *C. albicans*, podczas gdy *C. tropicalis* i *A. niger* okazały się odporne (MIC₉₀ >512 µg/mL). Związki niezawierające łącznika TML okazały się mniej aktywne niż ich analogi zawierające ten element. W podłożu YNB bez miedzi i żelaza związki **44b**

i **51b** wykazały znacznie wyższą aktywność (niższe wartości MIC wyrażone w mM) przeciwko *C. albicans*, *C. glabrata* i *C. krusei*, niż CP. Koniugaty zawierające TML wykazywały również większą aktywność inhibicyjną niż CP dla oznaczenia przeprowadzonego w podłożu RPMI-1640, szczególnie w przeliczeniu na mM, gdzie wartości MIC₉₀ dla związków **44b** i **51b** były o ponad rząd wielkości niższe niż wartości dla CP. Warto wspomnieć, że wartości MIC₉₀ badanych związków zawierających CP były takie same lub tylko nieznacznie się różniły w podłożach YNB bez miedzi i żelaza oraz RPMI-1640.

Przyczyną znacznie słabszej aktywności inhibicyjnej związków zawierających AHO w standardowym podłożu YNB może być obecność FeCl₃ w stężeniu 200 µg/mL w tym medium, podczas gdy pozostałe dwie stosowane w badaniu pożywki pozbawione są żelaza. Możliwym jest, że w warunkach deficytu żelaza aktywność przeciwgrzybicza koniugatów **22b**, **25b**, **44b** i **51b** ulega wyraźnej intensyfikacji. Podobne zjawisko opisał wcześniej Bernier i współpracownicy, badając działanie przeciwgrzybicze koniugatów desketoneoenaktyna-siderofor.¹⁵⁸ Zgodne jest to z koncepcją, że ograniczona dostępność żelaza może zwiększać wychwyty sideroforów przez komórki *Candida*, które posiadają mechanizmy pobierania żelaza oparte na transporcie sideroforów. W konsekwencji połączenia lek-siderofor skuteczniej wywierają efekt inhibicyjny na komórki zawierające odpowiednie transportery. Ponieważ u *C. albicans* i *C. glabrata* występuje system Sit1/Arn1,^{65,159} nie jest zaskakujące, że właśnie dla tych dwóch szczepów zaobserwować można najsilniejszy efekt niedoboru żelaza na aktywność przeciwgrzybową połączeń AHO. Warto zaznaczyć, że najwyższą aktywność inhibicyjną *in vitro* badane koniugaty wykazywały w podłożu RPMI-1640, którego skład pod względem małowcząsteczkowych związków odżywczych odpowiada składowi surowicy krwi ludzkiej, co sugeruje, że poziom aktywności obserwowany w tym medium może być odzwierciedleniem podobnej skuteczności *in vivo*.

Związek **44b**, który wykazał najlepszą aktywnością przeciwgrzybową, został poddany badaniom nad hamowaniem wzrostu *C. albicans* w obecności cytochalazyny D (Cch) i trifluoperazyny (TFP) w podłożu RPMI-1640. Obydwa związki Cch i TFP to inhibitory procesów endocytozy: Cch hamuje endocytozę zależną od klatryny, natomiast TFP – endocytozę niezależną od klatryny w komórkach *C. albicans*.¹⁶⁰ Jak pokazano na Rys. 3.25, stężenie 8 µg/mL (0,25 × MIC₉₀) związku **44b** hamowało wzrost komórek *C. albicans* o około 50% po 8 godzinach, natomiast stężenie 32 µg/mL (MIC₉₀) całkowicie zatrzymywało ich rozwój. Dodanie Cch (1 µg/mL) i TFP (50 µg/mL) razem z koniugatem **44b** w stężeniu 32 µg/mL nie zmieniło efektu inhibicji, co wskazuje, że połączenie AHO **44b** nie działa poprzez drogi endocytotyczne podczas hamowania wzrostu komórek grzybowych.



Rys. 3.25 Efekt inhibycyjny związku **44b** na wzrost komórek *C. albicans* w podłożu RPMI-1640 w obecności inhibitorów endocytozy: cytochalazyny D oraz trifluoperazyny.

Dodatkowo sprawdzono, czy koniugaty AHO z cispentacyną wykazują aktywność przeciwbakteryjną lub toksyczność wobec komórek ssaczych. Związki testowano pod kątem działania wobec bakterii Gram-dodatnich (*Bacillus subtilis*) oraz Gram-ujemnych (*Escherichia coli*) metodą seryjnych rozcieńczeń w pożywce MHB 2, zgodnie ze standardami. Nie zaobserwowano żadnego efektu hamowania wzrostu nawet przy stężeniu do 512 µg/mL. Podobne rezultaty otrzymano dla połączenia z Kser **27**.

Testy cytotoksyczności przeprowadzone na ludzkich komórkach nerki embrionalnej (HEK293) nie wykazały żadnych efektów toksycznych przy stężeniach do 200 µg/mL.

3.3. Planowanie struktur potencjalnych inhibitorów enzymatycznych wybranych enzymów szlaku MBP

Drugim wątkiem moich prac badawczych było zaprojektowanie i synteza nowych, potencjalnych chemoterapeutyków w oparciu o nowe, obiecujące cele molekularne. Jak już wspominałam, liczba zidentyfikowanych celów molekularnych dla przeciwgrzybowych chemoterapeutyków jest dość ograniczona, więc zaproponowanie nowej struktury potencjalnego leku przeciwgrzybowego nie należy do zadań prostych. Ostatnio trzy enzymy MBP: transacetylaza L-homoseryny Met2p, sulfhydrataza O-acetylohomoseryny Met15p oraz γ -syntaza cystationiny Str2p zostały uznane za dobre, potencjalne cele molekularne dla przeciwgrzybowych chemoterapeutyków w komórkach patogennych grzybów, m. in. z rodzaju *Candida*.¹⁶¹ Na Rys. 3.26 przedstawiłam modele molekularne struktur analogów bakteryjnych enzymów Met2p oraz Met15p oraz model struktury rdzenia katalitycznego Str2p *Candida albicans*.¹⁶²

Związki **54** oraz **55** to fosfonowe analogi strukturalne przypuszczalnego tetraedrycznego intermediatu powstającego w centrum aktywnym enzymu Met2p podczas przekształcania L-homoseryny w *O*-acetylo-L-homoserynę.¹⁶⁵ Założyłam, że zaproponowane związki mogą być skutecznymi inhibitorami tego enzymu, kompetycyjnymi wobec substratu – L-homoseryny. Warto zaznaczyć, iż pomimo tego, że związek **54** jest pochodną seryny, to ugrupowanie fosfonowe teoretycznie nadal powinno imitować stan przejściowy w centrum aktywnym enzymu. Tworząc analog z krótszym łańcuchem bocznym chciałam sprawdzić, czy jest to istotny czynnik wpływający na aktywność inhibicyjną tych analogów.

Zaproponowane związki **56** oraz **57** powinny wykazywać działanie hamujące aktywność biologiczną enzymów Met12p oraz Str2p, gdyż są one strukturalnymi analogami *O*-acetylo-L-homoseryny, będącej substratem dla obu tych enzymów. Tak więc podobnie, jak w przypadku związków **54** oraz **55** powinny one działać na zasadach inhibicji kompetycyjnej. Ponadto, w literaturze związek **56** był już oznaczany jako inhibitor enzymatyczny bakteryjnego odpowiednika Met15p,¹⁶⁶ natomiast struktura związku **57** została zaproponowana w oparciu o wyniki dokowania molekularnego cząsteczki **57** do centrum aktywnego enzymu Met15p.¹⁶⁷

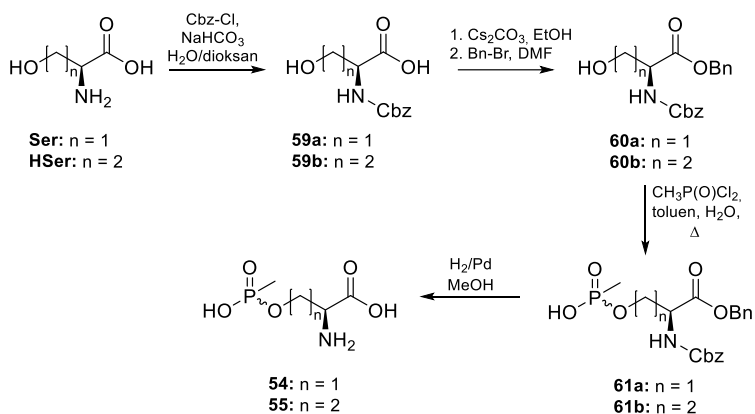
Związek **58** został opisany w literaturze jako substancja pochodzenia naturalnego, wykazująca efekt hamowania wzrostu fitopatogennych drobnoustrojów grzybowych. Efekt grzybostatyczny tego związku był skutecznie odwracany przez dodatek L-metioniny albo L-cystationiny do podłoża hodowlanego.¹⁶⁸ Może to wskazywać na hamowanie przez związek **58** aktywności któregoś z enzymów MBP i takie sugestie były prezentowane w literaturze.¹⁷⁰ Brak jednak wyników badań eksperymentalnych potwierdzających powyższą hipotezę, nie został zidentyfikowany konkretny cel molekularny związku **58**, a ponadto nie było wiadomo, czy wykazuje on aktywność wobec drobnoustrojów grzybowych patogennych dla człowieka. Z tego powodu postanowiłam otrzymać związek **58**, aby sprawdzić skuteczność jego działania wobec drożdżaków z rodzaju *Candida* oraz bezpośrednio na wybrane enzymy MBP.

Po zaprojektowaniu struktur potencjalnych inhibitorów **54-58** przystąpiłam do opracowania ich syntezy oraz otrzymania planowanych związków.

3.3.1. Synteza potencjalnych inhibitorów enzymatycznych szlaku biosyntezy L-metioniny

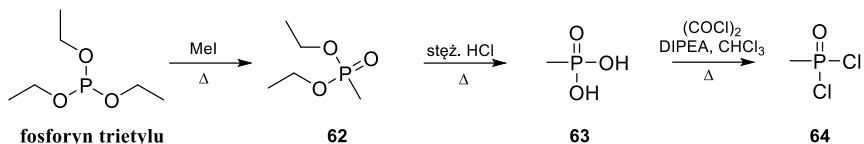
Pierwszymi potencjalnymi inhibitorami enzymatycznymi MBP, których metodę otrzymania opracowałam były fosfonowe analogi L-seryny **54** oraz L-homoseryny **55**. Podczas projektowania szlaku syntezy powyższych związków, naturalnym dla mnie rozwiązaniem było wykorzystanie jako substratów L-serynę (Ser) oraz L-homoserynę (HSer), gdyż są one związkami o prostej strukturze

aminokwasów oraz posiadają zdefiniowaną konfigurację na chiralnym atomie węgla C^α. Ser jest komercyjnie dostępnym odczynnikiem chemicznym, natomiast HSer samodzielnie zsyntezowałam metodą opisaną przez Song *et al.*¹⁷⁰ z L-metioniny. Posiadając potrzebne substraty przystąpiłam do syntezy, którą przedstawiłam na Rys. 3.28. W pierwszym kroku, obydwie aminokwasy potraktowałam chloromrówczanem benzylu w obecności wodorowęglanu sodu, tworząc odpowiednie karbaminiany **59ab**, które następnie przekształciłam w estry benzylowe **60ab** działając bromkiem benzylu oraz węglanem cezu.¹⁷¹ Wolną grupę hydroksylową chronionych aminokwasów poddałam reakcji kondensacji z dichlokiem kwasu metylofosfonowego.¹⁷² Do bezwodnego toluenu wprowadza się dichlorek, a następnie dodaje się odpowiednią ilość wody i ogrzewa, co skutkuje utworzeniem się bezwodnika metylofosfonowego. Po wprowadzeniu do mieszaniny alkoholu **60ab**, bezwodnik ten reaguje z grupą hydroksylową tworząc ester kwasu metylofosfonowego **61ab**. Otrzymane związki izolowałam stosując cieczoową chromatografię kolumnową. Z chromatograficznie czystych produktów jednocześnie usunęłam wszystkie grupy ochronne za pomocą katalitycznej redukcji wodorem.



Rys. 3.28 Synteza fosfonowych analogów L-seryny **54** oraz L-homoseryny **55**.

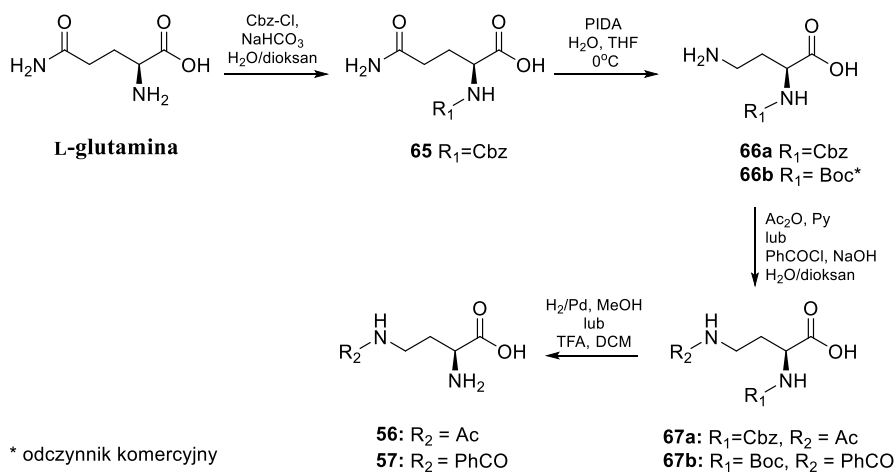
Dichlorek kwasu metylofosfonowego, wykorzystany w reakcji kondensacji, otrzymałam metodą stosowaną przy syntezie sarinu.¹⁷³ Proces ten inicjowała reakcja jodku metylu z fosforem trietylu. Powstały metylofosfonian dietylu **62** poddawałam hydrolizie kwasowej. Wymianę grup hydroksylowych w kwasie metylofosfonowym **63** na atomy chloru przeprowadziłam poprzez działanie chlorkiem oksalilu w obecności DIPEA. W oryginalnym przepisie autorzy stosują trietyloaminę, jednak zastosowanie DIPEA z uwagi na jej właściwości ułatwiło izolowanie produktu **64**. Surowy produkt **64** użyłam do syntezy fosfonowych analogów omawianych aminokwasów (Rys. 3.29).



Rys. 3.29 Synteza dichlorku kwasu metylofosfonowego

Struktury końcowych produktów **54** i **55** potwierdziłam spektroskopią NMR jąder ¹H, ¹³C oraz ³¹P, a także spektrometrią mas. Warto zaznaczyć, że na atomie fosforu grupy metylofosfonowej występującej w cząsteczkach **54** i **55** znajduje się centrum stereogeniczne, które nie zostało jednoznacznie ustalone podczas reakcji z dichlorkiem. Tym samym uzyskane produkty są mieszaniną diastereoizomerów o dwóch centrach stereogenicznych. Otrzymane związki zostały przekazane do badań aktywności biologicznej wobec wybranych enzymów szlaku MBP.

Kolejne związki **56** oraz **57** to pochodne kwasu 2,4-diaminobutanowego, które strukturą przypominają *O*-acetylo-L-homoserynę – substrat enzymu Met15p oraz Str2p. Projektując otrzymywanie powyższych związków postanowiłam wykorzystać L-glutaminę jako substrat. Aminokwas ten jest komercyjnie dostępny, a co ważniejsze posiada odpowiednio zdefiniowane centrum stereogeniczne na α-atomie węgla. Syntezę tych związków przedstawiłam na Rys. 3.30.

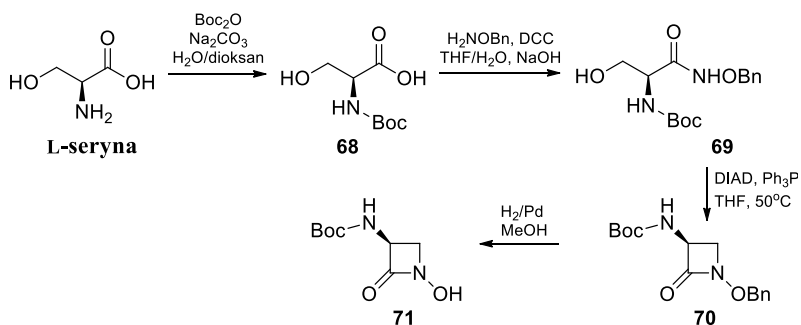


Rys. 3.30 Synteza pochodnych kwasu 2,4-diaminobutanowego: *N*-acetylowej **56** oraz *N*-benzoiłowej **57**.

Po wprowadzeniu ochrony benzyloksykarbonyłowej związek **65** poddawałam przegrupowaniu Hoffmana z wykorzystaniem (diacetoksyjodo)benzenu (PIDA), zgodnie z którym grupa amidowa przekształcała się w aminową równocześnie skracając łańcuch węglowy o jeden atom.¹⁷⁴ W kolejnym kroku wprowadziłam ugrupowanie acetylowe¹⁷⁵ na atom azotu nowo powstałej grupy aminowej

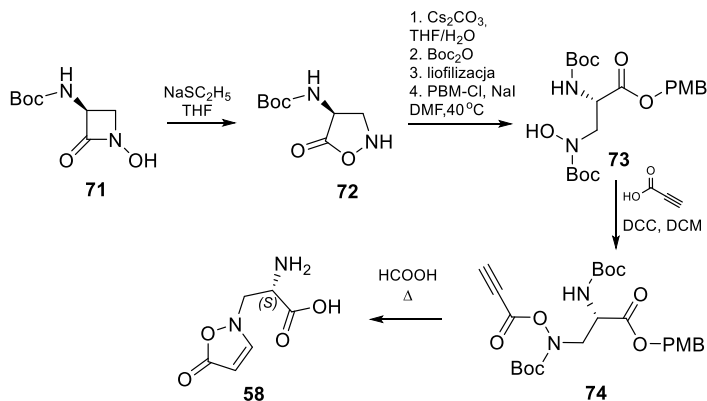
zlokalizowanej w łańcuchu bocznym związku **66a**. W rezultacie uzyskałam pochodną kwasu *N*-acetylo-2,4-diaminobutanowego **67a**, którą w ostatnim etapie poddałam katalitycznej redukcji wodorem, aby usunąć grupę ochronną Cbz. Benzoilowy analog **57** otrzymałam w podobny sposób, jednakże tym razem substratem była pochodna Boc kwasu 2,4-diaminobutanowego **66b**. Na substrat **66b** działałam chlorkiem benzoilu w środowisku wodorotlenku sodu, a następnie acydolityczne usunęłam grupę ochronną. Takie postępowanie pozwoliło na uzyskanie finalnego produktu **57**. Podobnie jak w przypadku fosfonowych pochodnych, struktury związków **56** i **57** potwierdziłam spektroskopią ¹H i ¹³C NMR oraz spektrometrią mas, a otrzymane związki zostały przekazane do badań aktywności biologicznej wobec wybranych enzymów szlaku MBP. Dla związków optycznie czynnych pomierzyłam skręcalność optyczną.

Ostatnim związkiem, który otrzymałam w ramach tej serii był znany i opisany w literaturze związek **58**, pochodna (2*H*)-1,2-isoksazol-5-onu. Początkowo próbowałam otrzymać tą pochodną metodą opisaną przez Baldwina *et al.*,¹⁷⁶ gdzie substratem jest Boc chroniony związek **71**. Zaznaczę, że w tej pracy autorzy, z uwagi na charakter czasopisma (Tetrahedron Letters), nie zamieścili żadnych przepisów preparatywnych. Syntezę rozpoczęłam więc od konstrukcji laktamu, który w kilku etapach pozyskuje się z komercyjnie dostępnej *L*-seryny.¹⁷⁷ W pierwszym etapie tej syntezy na grupę aminową seryny wprowadziłam ochronę Boc, po czym działając na uzyskany produkt **68** *O*-benzylohydroksyloaminą wobec odczynnika sprzęgającego DCC przeprowadziłam Boc-serynę w amid **69** (Rys. 3.31).



Rys. 3.31 Synteza (*S*)-3-(*N*-*tert*-butoksykarbonylo)amino-1-hydroksy-azetydyn-2-onu **71**.

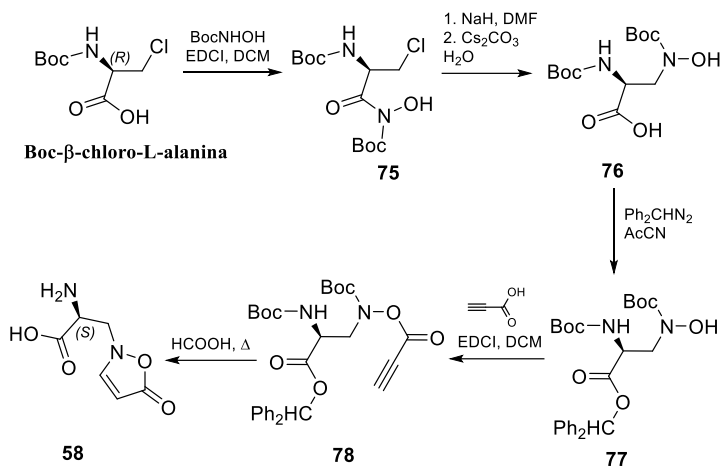
W kolejnym etapie, stosując DIAD oraz trifenylfosfinę uzyskałam laktam **70**, który utworzył się w wyniku wewnątrzcząsteczkowej reakcji Mitsunobu. Ostatnim krokiem, po izolacji produktu metodą chromatografii kolumnowej, było hydrolytyczne usunięcie osłony benzylowej z grupy hydroksylowej znajdującej się na atomie azotu w pierścieniu laktamowym. Czysty chromatograficznie związek **71** poddałam dalszym przemianom, zgodnie ze schematem przedstawionym na Rys. 3.32.



Rys. 3.32 Schemat syntezy (*S*)-β-(2*H*-1,2-oksazol-5-on-2-yl)-*L*-alaniny **58** zgodnie z metodą Balwina *et al.*¹⁷⁶

Działanie etanotiolanem sodu na β-laktam **71** pozwoliło na izomeryzację pierścienia poprzez jego otwarcie i ponowne zamknięcie do 5-członowego wyniku utworzenia wiązania estrowego. Po oczyszczeniu produktu, kolejny etap syntezy zakładał równoczesne hydrolytyczne otwarcie nowo powstałego pierścienia, wprowadzenie grupy ochronnej Boc na powstającą w wyniku hydrolizy grupę α-aminową oraz estryfikację również nowo powstałej grupy karboksylowej przy użyciu chlorku *p*-metylobenzylowego (PMB-Cl). Dodam, że chlorek wprowadziłam do mieszaniny reakcyjnej po przeprowadzeniu liofilizacji, zgodnie z opisem zamieszczonym w literaturze.¹⁷⁶ Otrzymany produkt **73** wyizolowałam stosując chromatografię kolumnową, po czym poddałam go sprzęganiu z kwasem propargilowym w obecności DCC. Po standardowym oczyszczeniu uzyskałam związek **74**. Problematiczny jednak okazał się ostatni etap reakcji, zgodnie z którym w wyniku działania kwasem mrówkowym na ester propargilowy **74** powinno dojść do usunięcia wszystkich grup ochronnych znajdujących się w cząsteczce. Ponadto, powinna zajść wewnątrzcząsteczkowa cyklizacja z utworzeniem wiązania podwójnego, co w konsekwencji dawałoby pożądany produkt końcowy **58**. Niestety autorzy nie określili sposobu izolacji produktu, a podczas wyżej omawianego procesu powstawało sporo zanieczyszczeń. Aby uzyskać czysty chromatograficznie związek **58** zastosowałam preparatywną chromatografię cieczową. Uzyskałam pożądany produkt **58**, jednak jego oczyszczanie okazało się wyjątkowo trudne i czasochłonne. Pomimo licznych prób i zmian warunków reakcji końcowa wydajność była niska, a uzyskanie czystego związku wymagało dużego nakładu pracy. Biorąc to pod uwagę postanowiłam otrzymać związek **58** na innej drodze (Rys. 3.33).¹⁷⁸ W porównaniu do poprzedniej metody, ta zakładała rozpoczęcie syntezy od Boc chronionej chlorowej pochodnej *L*-alaniny, która jest komercyjnie dostępnym aminokwasem. Ponadto redukcja liczby etapów syntezy umożliwiła

minimalizację potencjalnych strat związku występujących na poszczególnych etapach procesu.



Rys. 3.33 Synteza (S)-β-(2H-1,2-oksazol-5-on-2-yl)-L-alaniny **58**.¹⁷⁸

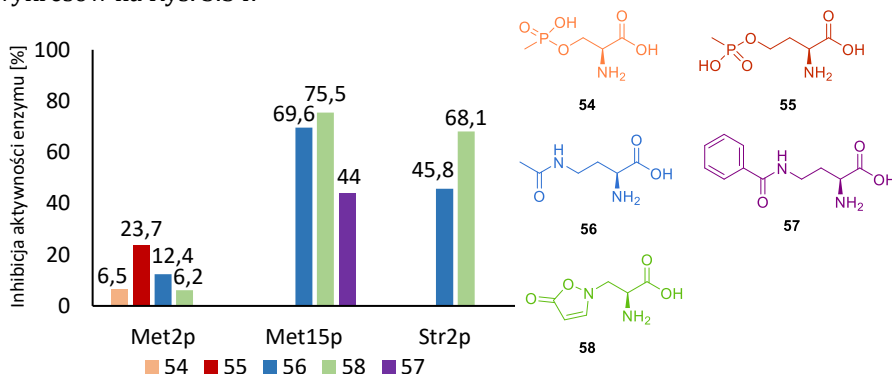
Syntezę rozpoczęłam od reakcji sprzęgania Boc-hydroksyloaminy z chloroalaniną stosując EDCI jako odczynnik sprzęgający. Oczyszczony produkt **75** poddałam działaniu wodoru sodu. W wyniku odszczepienia protonu następuje cyklizacja układu, polegająca na nukleofilowym ataku grupy hydroksylowej na atom węgla β z równoczesną eliminacją atomu chloru. Utworzony przejściowy czteroczłonowy pierścień ulega otwarciu pod wpływem węglanu cezu z utworzeniem wolnej grupy karboksylowej. Tę ostatnią zestryfikowałam działając na związek **76** difenyldiazometanem. Difenyldiazometan przygotowałam stosując metodę opisaną przez Klimcovica *et al.*¹⁷⁹ Produkt **77** oczyściłam chromatograficznie, po czym połączyłam go z kwasem propargilowym za pomocą DCC. Kończącym etapem było grzanie uzyskanego estru **78** w kwasie mrówkowym, co doprowadziło do cyklizacji układu i usunięcia wszystkich obecnych w cząsteczce grup ochronnych. Podobnie jak w poprzedniej metodzie, produkt **58** oczyszczałam poprzez preparatywną chromatografię cieczową. Nowo zastosowana metoda pozwoliła na uzyskanie produktu z istotnie wyższą wydajnością. Strukturę związku **58** potwierdziłam widmami ¹H i ¹³C NMR oraz spektrometrią mas. Dla optycznie czynnego związku **58** zmierzyłam skręcalność optyczną. Otrzymany związek przekazałam na badania biologiczne wobec wybranych enzymów szlaku MBP.

3.4. Wyniki badania właściwości biologicznych otrzymanych potencjalnych inhibitorów szlaku biosyntezy L-metioniny

Potencjalne inhibitory szlaku biosyntezy L-metioniny **54-57**, które otrzymałam na drodze syntezy organicznej, przekazałam do badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej *in vitro*, które obejmowały ewaluację aktywności przeciwgrzybowej oraz ocenę zdolności inhibicji wybranych enzymów MBP. Badania aktywności przeciwgrzybowej wobec modelowych szczepów grzybów z rodzaju *Candida* oraz *S. cerevisiae* zostały wykonane w Katedrze Technologii Leków i Biochemii przez dr inż. Aleksandrę Kuplińską.

3.4.1. Badanie efektu inhibicji aktywności wybranych enzymów szlaku biosyntezy L-metioniny

Zdolność do hamowania poszczególnych enzymów MBP związków **54-58** została przebadana w warunkach optymalnych, przy użyciu stałego stężenia substratu wynoszącego 10 mM. Uzyskane wyniki przedstawiłam w formie wykresów na Rys. 3.34.



Rys. 3.34 Hamowanie aktywności enzymów Met2p, Met15p oraz Str2p przez związki **54-58** będące w stężeniu 10 mM.

Badania nad aktywnością inhibitorów pokazują, że pochodne fosforanowe **54** oraz **55** nie wykazały wysokiej inhibicji w stosunku do enzymu Met2p, na który powinny być te związki ukierunkowane. Aktywność pochodnej homoseryny **55**, była lepsza niż serynowego odpowiednika **54**, jednakże dla stężenia 10 mM nie przekroczyła 25%. Niewielka aktywność tych związków może wynikać m. in. z obecności centrum stereogenicznego na atomie fosforu, które nie jest ściśle określone lub z ich niskiej stabilności w roztworach wodnych.

W przeciwieństwie do potencjalnych inhibitorów Met2p, związki **56** oraz **58**, których potencjalnym celem molekularnym były enzymy Met15p oraz Str2p, wykazały bardziej obiecujące właściwości. Kwas (S)-4-N-acetylo-2,4-diaminobutanowy **56** charakteryzował się inhibicją wynoszącą ~70% przy stężeniu 10 mM. Co więcej, przy stężeniu 5 mM zaobserwowano zahamowanie aktywności enzymu na poziomie 53%, natomiast przy stężeniu 2 mM wartość inhibicji wynosiła 25%. Benzoilowy analog **57** został zbadany tylko na modelu Met15p, gdzie uzyskano efekt 44% inhibicji aktywności, czyli wyraźnie mniej niż dla jego analogu **56**.

Pochodna **58** charakteryzowała się najwyższą zdolnością do inhibicji zarówno enzymu Met15p (~75% przy 10 mM), jak i Str2p (~68% przy 10 mM). Wyniki te są zgodne z początkowymi założeniami opracowanymi na podstawie danych literaturowych dotyczących aktywności przeciwgrzybowej.¹⁸⁰

3.4.2. Badanie aktywności przeciwgrzybowej wybranych potencjalnych inhibitorów szlaku biosyntezy L-metioniny

Aktywność przeciwgrzybowa związków **56-58** została zbadana *in vitro* wyznaczając minimalne stężenie hamujące aktywność wzrostu komórek grzybowych o 90% (MIC₉₀) lub 50% (MIC₅₀) w porównaniu z próbą kontrolną. Oznaczenie wykonano przeciwko szczepom *C. albicans*, *C. glabrata* oraz *S. cerevisiae* stosując metodę seryjnych dwukrotnych rozcieńczeń stosując mikropłytki oraz minimalne podłoże YNB wzbogadzone o siarczan amonu ((NH₄)₂SO₄) lub glutaminian sodu (L-GluONa) jako źródło azotu. Dodatkowo, badanie przeprowadzono stosując medium YNB z dodatkiem L-metioniny w stężeniu 10 mM oraz złożone podłoże PRMI 1640, które jest najbardziej zbliżone do surowicy ludzkiej. Uzyskane wyniki przedstawiono w Tabeli 3.4. Eksperymenty przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

Otrzymane wyniki wykazały, że pomimo silnego zahamowania aktywności enzymu Met15p, związek **56** charakteryzował się bardzo słabym działaniem przeciwgrzybowym, a w większości przypadków wręcz jego brakiem we wszystkich badanych podłożach. Jedynym wyjątkiem było podłoże YNB L-GluONa, w którym zaobserwowano niewielkie zahamowanie wzrostu *C. albicans*. Dodanie L-metioniny do podłoża hodowlanego całkowicie znosiło aktywność tego związku, co stanowi dowód na ukierunkowane działanie wobec enzymu szlaku MBP. Niska aktywność przeciwgrzybowa, kontrastująca z dość silnym działaniem inhibicyjnym wobec enzymu Met15p może wynikać z nieefektywnego transportu do wnętrza komórek. Benzoilowy analog **57** nie wykazał żadnej aktywności przeciwgrzybowej *in vitro* wobec badanych szczepów. Brak jakiegokolwiek mierzalnej aktywności danego związku jest reprezentowany przez wartość >1024.

Tabela 3.4 Aktywność przeciwgrzybowa związków **56-58**. Wartości MIC₉₀ oraz MIC₅₀ określono dla wybranych szczepów z rodzaju *Candida* oraz *S. cerevisiae* w podłożu RPMI 1640 lub YNB z dodatkiem siarczanu amonu ((NH₄)₂SO₄) lub glutaminianu sodu (L-GluONa). Dla niektórych oznaczeń w podłożu YNB zastosowano dodatek L-metioniny (L-Met) w stężeniu 10 mM.

Medium	MIC ₉₀ (MIC ₅₀) µg/ml		
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763
Kwas (S)-4-N-acetylo-2,4-diaminobutanowy 56			
YNB (NH ₄) ₂ SO ₄	>1024 (1024)	>1024	>1024
YNB (NH ₄) ₂ SO ₄ + L-Met	>1024	>1024	>1024
YNB L-GluONa	>1024 (128)	>1024 (512)	>1024 (512)
YNB L-GluONa + L-Met	>1024	>1024	>1024
RPMI 1640	>1024	>1024	>1024
Kwas (S)-4-N-benzoilo-2,4-diaminobutanowy 57			
YNB (NH ₄) ₂ SO ₄	>1024	>1024	>1024
YNB (NH ₄) ₂ SO ₄ + L -Met	>1024	>1024	>1024
YNB L-GluONa	>1024	>1024	>1024
YNB L-GluONa + L -Met	>1024	>1024	>1024
RPMI 1640	>1024	>1024	>1024
(S)-β-(2H-1,2-oksazol-5-on-2-ylo)-L-alanina 58			
YNB (NH ₄) ₂ SO ₄	2 (1)	4 (1)	1024 (2)
YNB (NH ₄) ₂ SO ₄ + L -Met	>64 (>64)	>64 (>64)	>1024 (>1024)
YNB L-GluONa	2 (1)	2 (1)	512 (1)
YNB L-GluONa + L -Met	>1024 (128)	>1024 (512)	>1024 (512)
RPMI 1640	>64 (>64)	>64 (>64)	>64 (>64)

Zdecydowanie najlepsze rezultaty uzyskano dla związku **58**, który wykazał porównywalną aktywność przeciwgrzybiczą wobec *C. albicans* i *C. glabrata* w podłożach – YNB z siarczanem amonu oraz YNB z glutaminianem sodu. Najwyższą skuteczność obserwowano w podłożu YNB L-GluONa, gdzie wartość MIC₉₀ wynosiła 2 µg/mL. Działanie przeciwgrzybowe związku **58** było istotnie słabsze wobec *S. cerevisiae*, co może wskazywać na jego selektywność względem enzymów charakterystycznych dla rodzaju *Candida*. Podobnie jak w przypadku związku **56**, dodanie L-metioniny do podłoża hodowlanego prowadziło do całkowitego lub znacznego obniżenia aktywności przeciwgrzybowej. Związek wykazywał brak aktywności w podłożu RPMI 1640.

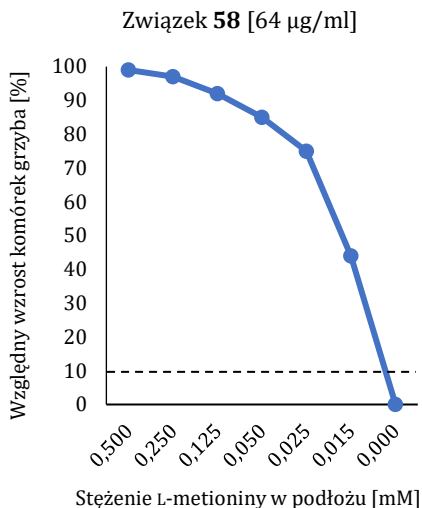
Potencjał przeciwgrzybowy związku **58** został również sprawdzony wobec innych szczepów *Candida* (Tabela 3.5). Oznaczenia wykonano metodą seryjnych rozcieńczeń stosując odżywkę hodowlaną YNB z dodatkiem siarczanu amonu. Pomiary wykonano również w podłożu o tym samym składzie z dodatkiem L-metioniny.

Tabela 3.5 Aktywność przeciwgrzybowa związku **58**. Wartości MIC₉₀ określono dla wybranych szczepów z rodzaju *Candida* w podłożu YNB z dodatkiem siarczanu amonu. Do jednej z odżywek hodowlanych YNB zastosowano dodatek L-metioniny (L-Met) w stężeniu 10 mM.

Medium	MIC ₉₀ µg/ml	
	YNB (NH ₄) ₂ SO ₄ + L-MET	YNB (NH ₄) ₂ SO ₄
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	>64	4
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	>64	>64
<i>Candida famata</i> DSM 3428	>64	>64
<i>Candida rugosa</i> DSM 2031	>64	>64
<i>Candida dublinensis</i> CBS 7987	>64	0,5

Porównując uzyskane wartości można zauważyć, że związek **58** był skuteczny wobec *C. parapsilosis* i *C. dublinensis* w podłożu niezawierającym L-metioniny z wartościami MIC₉₀ wynoszącymi odpowiednio 4 oraz 0,5 µg/ml. Różnice aktywności przeciwgrzybowej tego związku wobec różnych szczepów *Candida* mogą świadczyć o pewnej selektywności enzymów MBP w obrębie jednego rodzaju. Dodatkowo zaobserwowano, podobnie jak w poprzednich eksperymentach, osłabienie działania hamującego wzrost komórek grzybowych po dodaniu L-metioniny do podłoża.

Aby określić minimalne stężenie L-Met niezbędne do przywrócenia wzrostu komórek grzybowych, wykonano badanie w podłożu YNB z siarczanem amonu uzupełnianym L-Met w zakresie stężeń 0 - 10 mM. Wyniki przedstawiłam w formie wykresu na Rys. 3.35.



Rys. 3.35 Efekt hamowania wzrostu komórek *C. glabrata* przez związek **58** w podłożu YNB z siarczanem amonu uzupełnianym o L-Met w zakresie stężeń 0 - 10 mM. Linia przerywaną zaznaczono poziom 10% wzrostu komórek, poniżej którego nie obserwuje się dalszego wzrostu organizmu.

Zgodnie z uzyskanymi danymi, aby zniwelować działanie inhibitora **58** (wzrost komórek grzybowych powyżej 10%) wystarczy dodatek 0,015 mM L-Met w podłożu. Obserwowany efekt może wynikać z konkurencji w pobieraniu aminokwasów i ich metabolitów względem związku **58**. Możliwym jest, że związek ten oraz L-Met są transportowane do komórki za pośrednictwem tych samych transporterów błonowych, które wykazują większe powinowactwo do aminokwasu. Jako, że szacowane stężenie tego aminokwasu w surowicy ludzkiej mieści się w zakresie 0,027 – 0,031 mM,¹⁸¹ wykorzystanie związku **58**, jako skutecznego inhibitora wzrostu komórek grzybowych z rodzaju *Candida*, może okazać się nieefektywne.

4. Podsumowanie i wnioski końcowe

Celem badań przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej było zaprojektowanie oraz zbadanie możliwości syntezy potencjalnych chemoterapeutyków przeciwrzybowych na podstawie struktur aminokwasów. Zadanie to zrealizowałam na dwa sposoby: otrzymując koniugaty znanych związków o strukturze aminokwasów o działaniu przeciwdrobnoustrojowym z siderofoarami oraz synteza potencjalnych inhibitorów szlaku biosyntezy L-metioniny.

Podsumowując, na podstawie wyników badań zrealizowanych w ramach projektu stanowiącego podstawę rozprawy doktorskiej można sformułować następujące wnioski:

1. Uproszczony siderofor hydroksamowy AHO może być z powodzeniem stosowany jako nośnik molekularny do syntezy koniugatów potencjalnych chemoterapeutyków przeciwdrobnoustrojowych o strukturze aminokwasów. Połączenie nośnika molekularnego może być przeprowadzone dla C- lub N-końca sideroforu zarówno na sposób bezpośredni, jak i z wykorzystaniem rozszczepialnego łącznika.
2. Łącznik „trimethyl lock” może być z powodzeniem stosowany do syntezy koniugatów potencjalnych chemoterapeutyków przeciwdrobnoustrojowych o strukturze aminokwasów. Przyłączenie cząsteczki transportowanej do układu siderofor-TML jest utrudnione jedynie w przypadku układów, których synteza wymaga zastosowania środowiska zasadowego lub reagentów o silnych właściwościach nukleofilowych. Labilność łącznika TML w tych warunkach sprawia, że stopień skomplikowania syntezy drastycznie rośnie wraz ze wzrostem liczby nukleofilowych i elektrofilowych grup funkcyjnych w cząsteczce.

Przeprowadzone badania właściwości biologicznych otrzymanych koniugatów pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Połączenia **22a**, **25a**, **44a** oraz **51a** zawierające AHO jako nośnik molekularny oraz CNT_{rp} jako sondę fluorescencyjną, były skutecznie transportowane i akumulowane w komórkach *C. albicans* i *C. glabrata*. Ich wychwyty przez *C. krusei* i *C. parapsilosis* był mniej efektywny, lecz wykrywalny, natomiast *C. tropicalis*, *A. niger*, *B. subtilis* i *E. coli* nie pobierały ich wcale. Wyniki badań nad wychwytem i akumulacją koniugatów zawierających AHO w komórkach drobnoustrojów dostarczyły dowodów na możliwość wykorzystania AHO jako nośnika molekularnego w konstrukcji koniugatów typu AHO:cząsteczka transportowana,

skutecznie pobieranych przez komórki *Candida* posiadające system Sit1/Arn1. Odkrycie to otwiera nową drogę do projektowania koniugatów typu „Koń trojański” zawierających AHO, wykazujących aktywność przeciwgrzybiczą.

2. Koniugaty zawierające cispentacynę wykazywały aktywność przeciwgrzybiczą *in vitro* w podłożach ubogich w żelazo, w tym w zalecanym przez CLSI podłożu RPMI-1640. Najwyższą aktywność, objawiającą się najniższymi wartościami MIC₉₀ (w zakresie 16–128 µg/mL), odnotowano dla koniugatów zawierających łącznik TML (**44b** i **51b**) wobec *C. albicans* i *C. glabrata*. Wynik ten koreluje z efektywnością wychwytu odpowiednich analogów strukturalnych zawierających CNTrp (**44a** i **51a**) przez komórki grzybów. Ponieważ stwierdzono, że koniugaty **44b** i **51b** są łatwo rozkładane w bezkomórkowym ekstrakcie *C. albicans*, można wnioskować, że w przypadku koniugatów AHO:cispentacyna zawierających TML, ułatwiony transport — prawdopodobnie mediowany przez system Sit1/Arn1 — decyduje o ich dobrych właściwościach hamujących wzrost.
3. Koniugaty bezpośrednio **22b** i **25b**, które prawdopodobnie były transportowane do komórek *C. albicans* i *C. glabrata* z podobnie wysoką efektywnością jak ich fluorescencyjne odpowiedniki **22a** i **25a**, wykazały słabą lub żadną aktywność hamującą wzrost. Jednak te dipeptydowe analogi okazały się bardzo odporne na enzymatyczny rozkład w bezkomórkowym ekstrakcie *C. albicans*. Zakładając, że podobna sytuacja zachodzi w cytozolu żywych komórek, koniugaty dipeptydowe AHO:cispentacyna gromadzą się wewnątrzkomórkowo w postaci nienaruszonej, a cispentacyna nie może zostać uwolniona, by dotrzeć do swojego celu.
4. Choć aktywność hamująca wzrost koniugatów **44b** i **51b** jest znacznie większa niż samej cispentacyny, nie jest ona wystarczająco wysoka, by uznać te związki za kandydatów na leki przeciwgrzybicze. Niemniej jednak, wyniki badań wyraźnie wskazują, że AHO może być wykorzystywane jako nośnik molekularny w konstrukcji koniugatów typu „Koń Trojański”, które wykazują zadowalającą aktywność przeciwgrzybiczą wobec istotnych ludzkich drożdżaków chorobotwórczych. Uważam, że jest to możliwe, jeśli jako ładunek zastosuje się inhibitor enzymatyczny bardziej aktywny niż cispentacyna. Jednak warunkiem koniecznym uzyskania wysokiej aktywności hamującej wzrost jest obecność systemu TML (lub innego łatwo rozkładalnego łącznika) w strukturze koniugatu.

Przeprowadzone badania właściwości biologicznych otrzymanych struktur potencjalnych inhibitorów enzymów MBP **54-58** pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Pochodne fosforanowe **54** i **55** wykazały niską aktywność wobec enzymu Met2p, co może być skutkiem nieokreślonej stereochemii atomu fosforu lub niskiej stabilności hydrolitycznej. Związki **56** i **58**, ukierunkowane na enzymy Met15p i Str2p, wykazały znacznie wyższą aktywność inhibicyjną (powyżej 70% przy stężeniu 10 mM), co potwierdza ich potencjał jako inhibitorów enzymów MBP. Co więcej, otrzymane wyniki potwierdzają trafność założeń opartych na danych literaturowych dotyczących aktywności przeciwgrzybowej związku **58**.
2. Związek **56**, mimo silnego hamowania enzymu Met15p, wykazywał bardzo słabą lub brak aktywności przeciwgrzybowej na komórki grzybowe z rodzaju *Candida*, co najprawdopodobniej wynika z ograniczonego transportu do wnętrza komórek.
3. Związek **58** wykazał dobrą aktywność przeciwgrzybową, szczególnie wobec szczepów z rodzaju *Candida*, z wartością MIC₉₀ do 0,5–2 µg/mL, natomiast różnice w aktywności przeciwgrzybowej w obrębie jednego rodzaju mogą wynikać z selektywności wobec enzymów różnych gatunków *Candida*.
4. Dodatek L-metioniny do podłoża hodowlanego znacząco zmniejszał lub całkowicie znosił aktywność związków **56-58**, co potwierdza ich ukierunkowane działanie na enzymy MBP. Niemniej jednak, wysokie stężenie L-Met w surowicy ludzkiej może ograniczać skuteczność terapeutyczną związku **58**.

5. Część eksperymentalna

5.1. Informacje ogólne

Struktury otrzymanych związków potwierdzono w oparciu o widma NMR, które zostały wykonane w Wydziałowym Laboratorium NMR Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej, przy użyciu spektrometru Unity 500 plus firmy Varian (500 MHz), natomiast analizę MS-ESI przeprowadzono na aparacie Triple Quad LC/MS firmy Agilent Technologies w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej oraz na aparacie Pur Ion S firmy Teledyne ISCO.

Analizę HPLC wykonano na aparatach 1260 Infinity II 6470 oraz 1200 series firmy Agilent Technologies w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej.

Do pomiarów temperatury topnienia ciał stałych wykorzystano technikę otwartej kapilary, przy czym zmierzone temperatury topnienia otrzymanych związków nie były korygowane.

Do pomiarów skręcalności optycznej wykorzystano polarymetr Autopol II firmy Rudolph Research Analytical w Katedrze Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej.

Do klasycznej chromatografii kolumnowej wykorzystano żel krzemionkowy SiliaFlash GE60 60-200 μm SiliCycle. Preparatywne rozdzielacze chromatograficzne zostały wykonane na aparacie CombiFlash NEXTGEN 300+ firmy Teledyne ISCO z zastosowaniem jednorazowych kolumn SiliaSep firmy SiliCycle. Ponadto do preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej użyto płytek PLC Silica Gel 60 F254 firmy Merck o grubości złoży 0,5 mm.

Liofilizacja związków została wykonana na aparacie Alpha 1-2Ldplus firmy Christ.

Zdjęcia mikroskopowe zostały otrzymane za pomocą skanującego laserowego mikroskopu konfokalnego LSM T-PMT Confocal Laser Scanning Microscope firmy Zeiss.

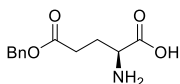
Do analizy TLC wykorzystano płytki TLC Silica Gel F254 firmy Merck. Do detekcji UV zastosowano lampę V-240 firmy Krüss Optronics o długościach fali $\lambda = 254$ oraz 366 nm. Do wywoływania płytek stosowano wywoływacze: cerowy, anyżowy, cerowo-molibdenowy, ninhydrynowy oraz zieleń bromokrezolową.

Reagenty i rozpuszczalniki pochodziły ze źródeł komercyjnych firm Merck, Alfa Aesar, Avantor, TCI, Acros Organics oraz Ambeed.

5.2. Przepisy preparatywne

5.2.1 Synteza sideroforu ω -*N*-acetylo- ω -*N*-hydroksy-L-ornityny

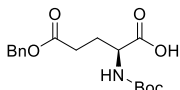
L-glutaminian γ -benzylu 1



W kolbie kulistej o pojemności 2 l umieszczono 500 ml eteru dietylowego oraz 50 ml stężonego kwasu siarkowego(VI). Do mieszaniny powoli wprowadzono 500 ml alkoholu benzylowego, po czym odparowano eter dietylowy korzystając z wyparki próżniowej. Do pozostałej zawartości kolby w kilku porcjach w czasie 15 min wprowadzono 73.5 g (0,5 mol) kwasu L-glutaminowego. Roztwór pozostawiono stale mieszany na noc w RT, po czym zawartość kolby rozcieńczono 1l etanolu (96%) oraz wprowadzono 250 ml pirydyny. Mieszaninę ochłodzono do 0°C i pozostawiono w tej temperaturze przez noc do krystalizacji. Uzyskany osad odsączono i przemyto zimnym, bezwodnym eterem dietylowym. Osad rekrytalizowano z wrzącej mieszaniny pirydyna/woda 1/9, v/v, uzyskując 71,1 g (0,3 mol, 60%) białego, krystalicznego osadu o tt. 165-168°C (lit.¹⁴⁵ 167-168°C).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1,96 (m, 2H, CHCH₂), 2,39 (m, 2H, COCH₂), 3,81 (m, 1H, CH), 4,89 (s, 2H, CH₂-Ph), 2,08-2,18 (m, 5h, Ph)

N-tert-butoksykarbonylo-L-glutaminian γ -benzylu 2



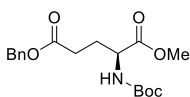
W kolbie kulistej o pojemności 1 l umieszczono 10 g (42,2 mmol) estru γ -benzylowego kwasu L-glutaminowego wraz z 300 ml mieszaniny dioksan-woda w stosunku 1/1, v/v. Kolejną zawartość kolby ochłodzono do 0°C za pomocą łaźni lodowej oraz wprowadzono 12 ml (8,8 g, 84,4 mmol) trietyloaminy. Po chwili wkroplono 11 g (50,4 mmol) diwęglanu di-*tert*-butylu rozpuszczonego w 20 ml dioksanu, po czym pozostawiono mieszaninę na noc w RT. Po zakończeniu reakcji dioksan odparowano, a pozostałość zakwaszono za pomocą 1M wodnego roztworu HCl do pH ok. 2. Całość ekstrahowano octanem etylu (3×30 ml), po czym połączone warstwy organiczne przemyto kolejno 30 ml wody i 30 ml solanki. Roztwór wysuszone bezwodnym siarczanem magnezu, środek suszący odsączono, a roztwór odparowano do sucha. Uzyskano 12,3 g bezbarwnego oleju (36,5 mmol, 87%), który użyto do dalszych reakcji bez dodatkowego oczyszczania. $[\alpha]_D^{20}$ -13 (c1, CH₃OH), lit.¹⁸² $[\alpha]_D^{20}$ -13,2 (c1, CH₃OH).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1,36 (s, 9H, Boc), 1,77 (m, 1H, CH-CH₂), 1,96 (m, 1H, CH-CH₂), 2,41 (m, 2H, -CH₂-CO), 3,9 (m, 1H, CH), 5,07 (s, 2H, CH₂-Ph), 7,1 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, NH), 7,29-7,35 (m, 5H, Ph)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ = 26,48; 27,29; 28,29; 30,54; 31,73; 52,99; 65,88; 78,50; 126,83; 127,04; 128,27; 128,40; 128,46; 128,84; 136,61; 156,0; 172,56; 174,15

N-*tert*-butoksykarbonylo-L-glutaminian α -metylo- γ -benzylu **3**

Uwaga: reakcję prowadzono w atmosferze gazu obojętnego

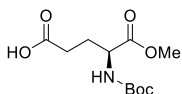


W kolbie kulistej o pojemności 500 ml zaopatrzonej w chłodnicę oraz mieszadło, umieszczono kolejno 12 g (35,5 mmol) Boc-L-Glu(OBn)-OH **2**, 4,9 g (35,5 mmol) węgla potasu oraz 6,6 ml (106,5 mmol) jodometanu. Do mieszaniny dodano 200 ml bezwodnego acetonu i ogrzewano do wrzenia przez dwie godziny. Po zakończeniu reakcji rozpuszczalnik odparowano, a pozostałość zawieszono w 50 ml octanu etylu. Całość przeniesiono do rozdzielacza i przemyto 10% wodnym roztworem kwasu cytrynowego (2x50 ml). Warstwę organiczną osuszono nad siarczanem magnezu, osad oddzielono poprzez filtrację, a przesącz odparowano do sucha. Otrzymany olej oczyszczono za pomocą cieczowej chromatografii kolumnowej używając układu octan etylu/heksan 3/7, v/v jako eluent. Uzyskano 10,25 g (29,17 mmol, 82%) bezbarwnego oleju o skręcalności $[\alpha]_D^{20}$ -16,8 (c0,9, CH_3OH), lit.¹⁸³ $[\alpha]_D^{20}$ -17 (c1, CH_3OH).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 1,35 (s, 9H, *t*Bu), 1,79 (m, 1H, CHCH_2), 1,94 (m, 1H, CHCH_2), 2,43 (m, 2H, CH_2CO), 3,59 (s, 3H CH_3O), 4,0 (m, 1H, CHCH_2), 4,48 (d, J = 5,9 Hz, 1H, CONH), 5,05 (s, 2H, CH_2Ph), 7,28-7,37 (m, 5H, Ph);

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ = 26,33; 28,67; 30,25; 52,14; 53,17; 65,59; 78,5; 126,84; 128,28; 128,83; 136,74; 155,88; 172,37; 173,11

N-*tert*-butoksykarbonylo-L-glutaminian α -metylu **4**



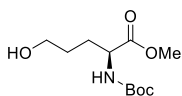
W kolbie kulistej o pojemności 500 ml zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne rozpuszczono 10,2 g (29,03 mmol) diestru benzylometylowego **3** w 200 ml metanolu. Dodano 0,1 g katalizatora 10% pallad na węglu, po czym przez mieszaninę reakcyjną przepuszczano wodór w czasie 5h (kontrola TLC; eluent heksan/octan etylu 7/3). Po zakończeniu reakcji sprzęt ostrożnie odłączono, a mieszaninę przesączono przez celit, spłukując kilkakrotnie osad dużymi porcjami metanolu. Przesącz odparowano do sucha uzyskując 7,58 g (29,03 mmol, 100%) bezbarwnego oleju o skręcalności $[\alpha]_D^{20}$ -25 (c1, CH_3OH), lit.¹⁸³ $[\alpha]_D^{20}$ -24,9 (c1, CH_3OH).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 1,44 (s, 9H, *t*Bu), 1,92 (m, 1H, CHCH_2), 2,17 (m, 1H, CHCH_2), 2,44 (m, 2H, CH_2CO), 3,73 (s, 3H CH_3O), 4,34 (m, 1H, CHCH_2), 5,18 (d, J = 7,8 Hz, 1H, CONH), 7,5-9,0 (bs, 1H, COOH)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ = 27,76; 28,24; 29,87; 51,64; 52,55; 80,56; 155,33; 172,83; 176,69

N-*tert*-butoksykarbonylo- δ -hydroksy-*L*-norwalinian metylu **5**

Uwaga: reakcja prowadzona jest w atmosferze gazu obojętnego

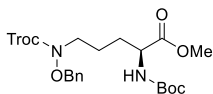


Kolbę kulistą o pojemności 250 ml zaopatrzoną w chłodnicę, balon z azotem oraz dipol magnetyczny, umieszczono w łaźni lodowej z solą. Do naczynia wprowadzono 100 ml bezwodnego THF (świeżo destylowanego z nad LiAlH_4) oraz 7,55 g (28,9 mmol) pochodnej kwasu glutaminowego **4**. Kolejno dodano 6 ml (43,35 mmol) trietyloaminy i po chwili ostrożnie wkroplono 4,23 ml (43,35 mmol) chloro-mrówczanu etylu. Całość pozostawiono na 2 h w -15°C w atmosferze azotu cały czas intensywnie mieszając. Następnie do kolby dodawano w niewielkich porcjach 3,3 g (86,7 mmol) NaBH_4 , utrzymując temperaturę, po czym wkroplono 15 ml bezwodnego metanolu i reakcję pozostawiono na 1h w -15°C , a następnie 2h w RT. Po zakończeniu reakcji całość zakwaszono 1M wodnym roztworem HCl doprowadzając pH do ok. 5-6. Mieszaninę ekstrahowano octanem etylu (4x30 ml), a połączone warstwy organiczne przemyto solanką (30 ml), osuszono nad siarczanem magnezu, osad odsączono, a przesącz odparowano do sucha. Uzyskany mętny olej oczyszczono na drodze cieczowej chromatografii kolumnowej stosując jako eluent układ heksan/octan etylu w gradiencie 2/1, v/v do 1/1, v/v. Uzyskano 4,43 g (18,21 mmol, 63%) bezbarwnego oleju o skręcalności $[\alpha]_D^{20}$ -36 (c1, CH_3OH), lit.¹⁸³ $[\alpha]_D^{20}$ -37,5 (c0,2, CH_3OH).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 1,42 (s, 9H, *t*Bu), 1,61 (m, 2H, CH_2CH_2), 1,71 (m, 1H, CHCH_2), 1,89 (m, 1H, CHCH_2), 3,66 (t, J = 6,2 Hz, 2H, CH_2OH), 3,73 (s, 3H CH_3O), 4,34 (m, 1H, CHCH_2), 5,21 (d, J = 8,1 Hz, 1H, CONH)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ = 28,22; 28,27; 29,41; 51,96; 53,3; 62,28; 80,09; 155,5; 172,21

ω -*N*-benzyloksy- ω -*N*-(2,2,2-trichloroetoksy)karbonylo- α -*N*-*tert*-butoksykarbonylo-*L*-ornitynian metylu **6**



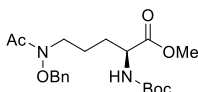
Do kolby kulistej o pojemności 100 ml zaopatrzonej w mieszałko magnetyczne wprowadzono roztwór 4,4 g (17,79 mmol) alkoholu **4** w 50 ml bezwodnego THF (świeżo destylowanego z nad LiAlH_4). Do roztworu dodano 5,31 g

(17,79 mmol) *N*-Troc-*O*-benzyloksyminy oraz 6,06 g (23,13 mmol) trifenylofosfiny. Całość mieszano do całkowitego rozpuszczenia reagentów, po czym wkroplono roztwór 4,55 ml (23,13 mmol) DIAD w 10 ml THF w czasie 30 min. Reakcję pozostawiono na noc w RT. Mieszaninę poreakcyjną odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, a produkt oczyszczono na drodze cieczerwowej chromatografii kolumnowej stosując układ heksan/octan etylu 3/1, v/v jako eluent. Otrzymano 6,85 g (12,99 mmol, 73%) lekko żółtego oleju.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,42$ (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 1,61 -1,83 (m, 4H, CHCH_2CH_2), 3,53 (t, 2H, CH_2N), 3,7 (s, 3H CH_3O), 4,29 (m, 1H, CHCH_2), 4,82 (s, 2H, CH_2Ph), 4,93 (s, 2H, CH_2CCL_3), 5,01 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, CONH), 7,35-7,44 (m, 5H, Ph)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 22,77$; 28,18; 29,96; 49,03; 52,41; 53,21; 75,08; 80,25; 95,37; 128,47; 128,88; 129,92; 134,66; 155,03; 171,54; 173,04

***o*-*N*-benzyloksy-*o*-*N*-acetylo- α -*N*-*tert*-butoksykarbonylo-*L*-ornitynian metylu 7**



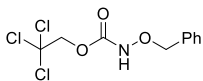
Do kolby kulistej o pojemności 100 ml zaopatrzonej w mieszałdo magnetyczne wprowadzono 6,8 g (12,88 mmol) chronionego aminokwasu **6** w 30 ml lodowatego kwasu octowego. Następnie dodano 6,3 g (96,6 mmol) pyłu cynkowego oraz 2,43 ml (25,76 mmol) bezwodnika octowego. Zawiesinę mieszano w RT przez 4h, po czym całość rozcieńczono 30 ml octanu etylu i przesączono. Osad kilkukrotnie przemyto dużymi porcjami octanu etylu. Następnie przesącz przemyto wodą (40 ml), nasyconym wodnym roztworem wodorowęglanu sodu (3x40 ml), wodą (40 ml) oraz solanką (40 ml). Warstwę organiczną suszono nad bezwodnym siarczanem magnezu i po odsączeniu środka suszącego odparowano do sucha na wyparce obrotowej. Produkt oczyszczono wykorzystując chromatografię kolumnową stosując jako eluent mieszaninę heksan/octan etylu 7/3, v/v. Uzyskano 3,71 g (9,4 mmol, 73%) bezbarwnego oleju o skręcalności $[\alpha]_D^{20} +8,7$ (c3,1, CHCl_3).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,44$ (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 1,56 -1,86 (m, 4H, CHCH_2CH_2), 2,1 (s, 3H, CH_3CO), 3,66 (t, 2H, CH_2N), 3,71 (s, 3H CH_3O), 4,3 (m, 1H, CHCH_2), 4,81 (s, 2H, CH_2Ph), 5,07 (d, 1H, CONH), 7,33-7,4 (m, 5H, Ph);

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 20,62$; 23,10; 28,43; 29,88; 45,10; 52,55; 53,28; 76,40; 80,06; 128,95; 129,13; 129,32; 134,90; 153,54; 172,56; 173,23

ESI-MS: obliczono dla $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6$ 394,21, znaleziono m/z 395,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(benzyloksy)karbaminian 2,2,2-trichloroetylu



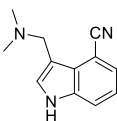
W kolbie kulistej o pojemności 500 ml umieszczono 6,15 g (50 mmol) *O*-benzylohydroksyloaminy oraz 8,4 g (100 mmol) wodorowęglanu sodu w 200 ml mieszaniny woda/THF 1/1, v/v. Do roztworu wkroplono 8,26 ml (60 mmol) chloromrówczanu trichloroetylu i reakcję pozostawiono przez noc w RT stale mieszając. Następnie THF odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość przeniesiono do rozdzielacza i ekstrahowano octanem etylu (3×40 ml). Warstwy organiczne połączono i przemyto 10% wodnym roztworem kwasu cytrynowego (2×30ml) oraz wodą (2×20ml), po czym osuszono nad siarczanem magnezu, środek suszący odsączono i filtrat odparowano do sucha na wyparce obrotowej. Produkt oczyszczono na drodze cieczerwowej chromatografii kolumnowej stosując jako eluent mieszaninę heksan/octan etylu 9/1, v/v. Otrzymano 13 g (43,5 mmol, 87%) bezbarwnego oleju.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 4,82 (s, 2H, CH₂-CCl₃), 4,95 (s, 2H, CH₂-Ph), 7,36-7,48 (m, 5H, Ph), 7,67 (m, 1H, NH)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 74,68; 78,94; 94,93; 128,66; 128,91; 129,36; 134,89; 155,16

5.2.2 Synteza pochodnych 4-cyjanotryptofanu

4-cyjanogramina **8**

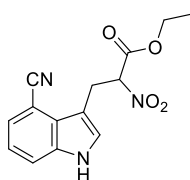


W kolbie kulistej o pojemności 100 ml umieszczono 1g (7,03 mmol) 4-cyanoindolu, 1,72 g (21,1 mmol) chlorowodorku dimetyloaminy oraz 254 mg (8,47 mmol) paraformaldehydu. Dodano 20 ml *n*-butanolu i całość ogrzano aż do wrzenia. Następnie utrzymywano mieszaninę w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 2h stale mieszając. Po tym czasie mieszaninę ochłodzono do RT i dodano 30 ml octanu etylu. Po przeniesieniu do rozdzielacza mieszaninę przemyto 1M wodnym roztworem wodorotlenku sodu (3×50 ml) zachowując fazy wodne. Połączone frakcje wodne ekstrahowano octanem etylu (3×50 ml). Połączone warstwy organiczne przemyto wodą (3×50 ml), osuszono nad bezwodnym MgSO₄, odsączono środek suszący, a przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Do pozostałości dodano 20 ml zimnego (-20°C) eteru dietylowego, dokładnie wymieszano i odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano 900 mg (4,52 mmol, 64%) stałego bezbarwnego osadu o *tt* 173-178°C, lit.¹⁸⁴ *tt* 173,5-176,5°C.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2,16 (s, 6H, 2xCH₃-), 3,62 (s, 2H, CH₂-), 7,21 (t, 1H, Ph), 7,48 (d, 1H, Ph), 7,51 (s, 1H, CH-NH), 7,71 (d, 1H, Ph), 11,57 (s, 1H, NH)

3-(4-cyjanoindol-3-yl)-2-nitropropanian etylu **9**

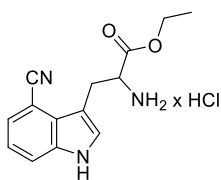
Uwaga: reakcję prowadzono w atmosferze gazu obojętnego



W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną umieszczono 817 mg (4,1 mmol) 4-cyjanograminy **8** oraz 765 mg (5,74 mmol) nitrooctanu etylu, po czym dodano 15 ml ksyłenu. Mieszaninę ogrzano do temperatury 130-140°C i pozostawiono w tej temperaturze stale mieszając przez 18h. Mieszaninę poreakcyjną ochłodzono do RT, odsączono powstały osad pod zmniejszonym ciśnieniem i przemyto go octanem etylu. Otrzymano 868 mg (3,02 mmol, 74%) produktu w postaci kremowego ciała stałego.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 1,15 (t, J = 7,6 Hz, 3H, CH_3 -), 3,79 (dd, 1H, J = 15,9 Hz, 5,6 Hz, CH- CH_2), 3,86 (dd, 1H, J = 15,5 Hz, 9,2 Hz, CH- CH_2), 4,22 (q, J = 6,9 Hz, 2H, CH_3 - CH_2), 6,01 (dd, J = 9,1 Hz, 5,3 Hz, 1H, CH- CH_2), 7,25 (t, J = 7,4 Hz, 1H, Ph), 7,54 (m, 2H, Ph, CH-NH), 7,48 (d, J = 7,8 Hz, 1H, Ph), 11,73 (s, 1H, NH)

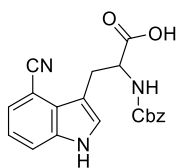
chlorowodorek *rac*-4-cyjanotryptofanuanu etylu **10**



W kolbie kulistej o pojemności 100 ml zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną umieszczono 830 mg (2,89 mmol) nitropropanianu **9** oraz 10 ml kwasu octowego. Do uzyskanej zawiesiny dodano powoli 1,33 g (20,34 mmol) pyłu cynkowego i ogrzewano do temperatury 70°C stale mieszając przez 1h. Mieszaninę poreakcyjną przesączono na gorąco, odrzucając osad. Przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem, a oleistą pozostałość rozpuszczono w 50 ml octanu etylu i przemyto 75 ml nasyconego wodnego roztworu wodorowęglanu sodu. Warstwę organiczną przemyto solanką (2×50 ml), osuszono nad bezwodnym MgSO_4 , odsączono środek suszący, a przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w 10 ml 4M roztworu chlorowodoru w dioksanie i mieszano przez 1h, a następnie odparowano rozpuszczalniki. Otrzymano 524 mg (1,78 mmol, 62%) produktu w postaci kremowego ciała stałego.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 1,01 (t, J = 7,1 Hz, 3H, CH_3), 3,43 (dd, J = 15 Hz, 7,7 Hz, 1H, CH- CH_2), 3,54 (dd, J = 15,4 Hz, 7 Hz, 1H, CH- CH_2), 4,08 (q, J = 6,9 Hz, 2H, CH_3 - CH_2), 4,26 (m, 1H, CH- CH_2), 7,25 (t, J = 8,2 Hz, 1H, Ph), 7,53 (d, J = 8,1 Hz, 1H, Ph), 7,61 (d, J = 2,4 Hz, 1H, CH-NH), 7,77 (d, J = 8,1 Hz, 1H, Ph), 8,64 (bs, 3H, NH_3^+), 11,91 (s, 1H, NH)

rac-N-tert-butoksykarbonylo-4-cyjanotryptofan 11

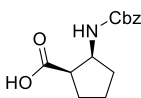


W kolbie kulistej o pojemności 100 ml umieszczono 1 g (3,88 mmol) chlorowodoru estru etylowego 4-cyjanotryptofanu **10**, 650 mg (7,76 mmol) wodorowęglanu sodu oraz 40 ml mieszaniny woda/dioksan 1/1, v/v. Do zawiesiny wkroplono 635 ml (4,66 mmol) chloromrówczanu benzylu i reakcję pozostawiono w RT przez noc, intensywnie mieszając. Mieszaninę poreakcyjną przeniesiono do rozdzielacza i ekstrahowano octanem etylu (3x30 ml), po czym połączone warstwy organiczne przemyto 1M wodnym roztworem HCl (2x20ml), wodą, nasyconym wodnym roztworem wodorowęglanu sodu (2x20ml), wodą (20ml) i solanką (20ml). Warstwę octanową osuszono nad bezwodnym MgSO₄, środek suszący odseparowano poprzez filtrację, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskany olej oczyszczono stosując cieczołą chromatografię kolumnową stosując jako eluent mieszaninę heksan/octan etylu 4/1, v/v. Otrzymany biały osad umieszczono w kolbie o pojemności 100 ml i rozpuszczono w 25 ml dioksanu. Następnie dodano 25 ml 1M wodnego roztworu wodorotlenku litu i reakcję pozostawiono na 2h w RT. Po tym czasie dioksan odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a warstwę wodną potraktowano 1M wodnym roztworem HCl doprowadzając pH do ok. 2. Zawiesinę ekstrahowano octanem etylu (3x30ml), po czym połączone warstwy organiczne przemyto solanką (30 ml), osuszono nad bezwodnym MgSO₄, odsączono środek suszący i pozostałość odparowano do uzyskania 1,08 g (2,99 mmol, 77%) białego bezpostaciowego osadu.

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 3,29 (m, 1H, CH-CH₂-), 3,67 (dd, J = 15 Hz, 7,4 Hz, 1H, CH-CH₂-), 4,65 (m, 1H, CH-CH₂), 5,03 (s, 2H, CH₂-Ph), 7,13-7,38 (m, 7H, Ar Cbz oraz CNT), 7,45 (d, J = 7,4 Hz, 1H, Ph CNT), 7,69 (d, J = 8 Hz, 1H, Ph CNT)

5.2.3 Synteza pochodnych cispentacyny

(1R,2S)-N-benzylotryktyloksykarbonylocispentacyna 12

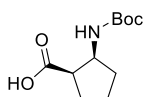


W kolbie kulistej o pojemności 25 ml umieszczono 100 mg (0,78 mmol) cispentacyny oraz 5 ml dioksanu. Dodano 5 ml wody, w której uprzednio rozpuszczono 145 mg (1,71 mmol) NaHCO₃. Mieszaninę ochłodzono do temperatury 0°C i wkroplono 132 μl (0,93 mmol) chloromrówczanu benzylu. Mieszaninę pozostawiono intensywnie mieszając w RT na 20h. Po tym czasie odparowano dioksan, a pozostałą fazę wodną rozcieńczono wodą do objętości 50 ml i przemyto eterem dietylowym (3x20 ml). Fazę wodną zakwaszono 1M wodnym roztworem HCl do pH ok. 2 i ekstrahowano octanem etylu (4x20 ml). Połączone warstwy organiczne przemyto solanką (20 ml), osuszono nad

bezwodnym MgSO_4 , oddzielono środek suszący, a przesącz zateżono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczano na drodze chromatografii kolumnowej w układzie heksan/octan etylu 1/1, v/v. Otrzymano 148 mg (0,56 mmol, 72%) produktu w postaci lepkiego oleju o skręcalności $[\alpha]_D^{20} -46$ (c1, CHCl_3), lit.¹⁸⁵ $[\alpha]_D^{20} -44,7$ (c1,1, CHCl_3).

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 1,57$ (dd, $J = 15,1$ Hz, 8,0 Hz, 2H, CH_2 pierścienia), 1,73 – 1,90 (m, 2H, CH_2 pierścienia), 1,97- 2,12 (m, 1H, CH_2 pierścienia), 2,94 (dd, $J = 13,8$ Hz, 7,1 Hz, 1H, CH_2 pierścienia), 4,35 – 4,50 (m, 1H, $\text{CH}-\text{CO}$), 4,99 - 5,24 (m, 1H, $\text{CH}-\text{NH}$), 5,75 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H, CH_2 -Ph), 7,29 – 7,43 (m, 5H, Ph)

(1*R*,2*S*)-*N*-*tert*-butoksykarbonylocispentacyna **13**

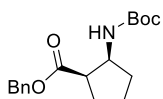


W kolbie kulistej o pojemności 25 ml umieszczono 250 mg (2 mmol) cispentacyny oraz 310 mg NaHCO_3 (3,8 mmol) rozpuszczone w 10 ml wody. Roztwór ochłodzono do 0°C i następnie powoli dodawano 465 mg (2,2 mmol) Boc_2O rozpuszczone w 5 ml 1,4-dioksanu. Mieszaninę ogrzano do RT i pozostawiono stale mieszając na 24h. Po tym czasie odparowano dioksan na wyparce obrotowej, a do pozostałości dodano 1M wodny roztwór HCl do pH ok. 2. Zakwaszoną warstwę wodną rozcieńczono do 100 ml i ekstrahowano octanem etylu (4×30 ml). Połączone ekstrakty organiczne przemyto solanką (2×50 ml), osuszono nad bezwodnym MgSO_4 , odsączono i odparowano rozpuszczalniki pod zmniejszonym ciśnieniem do otrzymania stałej pozostałości. Otrzymano 380 mg (1,7 mmol, 84%) produktu w postaci białego osadu o tt $122-125^\circ\text{C}$ (lit.¹⁸⁶ $124-127^\circ\text{C}$); i skręcalności właściwej $[\alpha]_D^{20} -44$ (c1, CHCl_3), lit.¹⁸⁷ $[\alpha]_D^{20} -42,4$ (c1,1 CHCl_3).

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 1,37$ (s, 9H, Boc), 1,45 (m, 1H, CH_2 pierścienia), 1,56 (m, 1H, CH_2 pierścienia), 1,66 - 1,94 (m, 4H, CH_2 pierścienia), 2,78 (q, 1H, $\text{CH}-\text{CO}$), 4,05 (m, 1H, $\text{CH}-\text{NH}$), 6,56 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, NH), 11,92 (bs, 1H, COOH)

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 22,2; 27,2; 29,0; 32,2; 47,9; 53,9; 66,8; 77,6; 79,7; 155,3; 175,2$

(1*R*,2*S*)-*N*-*tert*-butoksykarbonylocispentacynian benzylu **14**



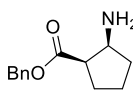
W kolbie kulistej o pojemności 50 ml umieszczono 250 mg (1,1 mmol) Boc-cispentacyny **13** oraz 180 mg NaHCO_3 (2,2 mmol) rozpuszczone w 20 ml mieszaniny woda/dioksan, 1/1, v/v. Następnie powoli dodawano 150 μl (1,3 mmol) chlorku benzylu i mieszaninę pozostawiono stale mieszając na 24h. Po tym czasie odparowano dioksan na wyparce obrotowej, a do pozostałości dodano 1M wodny roztwór HCl do pH ok. 2. Zakwaszoną warstwę wodną rozcieńczono do 100 ml i ekstrahowano octanem etylu (4×30 ml). Połączone ekstrakty organiczne przemyto solanką (2×50 ml), osuszono

nad bezwodnym MgSO_4 , odsączone i odparowano rozpuszczalniki pod zmniejszonym ciśnieniem do otrzymania stałej pozostałości. Otrzymano 220 mg (0,7 mmol, 64%) produktu w postaci bezbarwnego oleju.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,41$ (s, 9H, Boc), 1,57-1,65 (m, 1H, CH_2 pierścień) 1,79 (m, 1H, CH_2 pierścień), 1,94 (m, 4H, CH_2 pierścień), 4,21 (m, 1H, CHCO), 4,92 (m, 1H, CH-NH), 5,08 - 5,15 (dd układ ab, $J = 12.3$ Hz, 2H, CH_2 -Ph), 7,31-7,38 (m, 5H, Ph)

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 22,07, 27,72, 28,35, 32,12, 46,87, 53,84, 66,36, 79,24, 128,14, 128,20, 128,55, 135,84, 155,28, 174,23$

(1*R*,2*S*)-cispentacynian benzylu **15**



W kolbie kulistej o pojemności 25 ml umieszczono 200 mg (0,63 mmol) estru benzylowego Boc-cispentacyny **14**, 6 ml DCM oraz 2 ml TFA. Zawartość kolby mieszano w RT przez 2h, po czym rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskany olej rozpuszczono w 20 ml octanu etylu, przeniesiono do rozdzielacza i przemyto dwukrotnie nasyconym wodnym roztworem wodorowęglanu sodu (2×25 ml). Warstwę organiczną osuszono nad bezwodnym MgSO_4 , odseparowano środek suszący, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem uzyskując 133 mg (0,61 mmol, 96%) produktu w postaci bezbarwnego oleju.

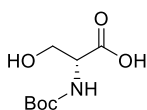
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,58$ (m, 1H, CH_2 - pierścień) 1,71 (m, 1H, CH_2 pierścień), 1,92 (m, 1H, CH_2 pierścień), 2,08 (m, 2H, CH_2 pierścień), 2,18 (m, 1H, CH_2 pierścień), 3,04 (m, 1H, CH-NH), 3,87 (q, 1H, CHCO), 5,11 (układ AB, $J = 12,2$ Hz, 2H, CH_2 -Ph), 7,29-7,39 (m, 5H, Ph)

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 22,17, 27,85, 32,46, 47,12, 54,32, 66,87, 128,23, 128,32, 135,88, 174,12$

ESI-MS: obliczono dla $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_2$ 219,13, znaleziono m/z 220 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

5.2.4 Synteza pochodnych *O*-karbamoilo-D-seryny

N-tert-butoksykarbonylo-D-seryna **16**

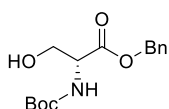


W kolbie kulistej o pojemności 250 ml umieszczono 5 g (47,6 mmol) D-seryny, 10,1 g (95,2 mmol) Na_2CO_3 oraz 100 ml mieszaniny woda/1,4-dioksan 1/1, v/v. Roztwór ochłodzono do 0°C i dodano 15,6 g (71,4 mmol) Boc_2O . Mieszaninę ogrzano do RT i pozostawiono na noc, po czym odparowano dioksan pod zmniejszonym ciśnieniem, a do pozostałości dodano 50 ml wody. Warstwę wodną przemyto eterem dietylowym (2×30 ml) i zakwaszono

1M wodnym roztworem HCl do pH ok. 2. Zawiesinę przeniesiono do rozdzielnika i ekstrahowano octanem etylu (3x40 ml), a połączone warstwy organiczne przemyto wodą (30 ml) i solanką (30 ml), osuszono nad bezwodnym MgSO₄, środek suszący oddzielono, a filtrat odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskano 8,8 g (42,8 mmol, 90%) surowego oleju, który użyto do kolejnej reakcji; $[\alpha]_D^{20} +21,4$ (c 0,9, CH₃OH), lit.¹⁸⁸ $[\alpha]_D^{20} +21,6$ (c1, CH₃OH).

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1,39 (s, 9H, Boc), 3,62 (d, J = 4,7 Hz, 2H, CH₂), 3,96 (m, 1H, CH), 6,72 (d, J = 8,2 Hz, 1H, NH)

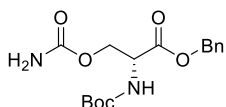
(2R)-N-tert-butoksykarbonyloserynian benzylu 17



W kolbie kulistej o pojemności 250 ml umieszczono 8,5 g (41,5 mmol) Boc-D-seryny **16**, 6,8 g (20,75 mmol) węglań cezu oraz 100 ml bezwodnego etanolu (99,8%). Roztwór pozostawiono w RT na 1h stale mieszając, po czym rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w 100 ml bezwodnego DMF i wprowadzono 7,4 ml (62,3 mmol) bromku benzylu. Mieszaninę pozostawiono w RT przez noc, po czym rozcieńczono ją 100 ml wody i ekstrahowano octanem etylu (4x50ml). Połączone ekstrakty organiczne przemyto wodą (2x30 ml), wysuszono nad bezwodnym MgSO₄, środek suszący oddzielono, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono na drodze ciecowej chromatografii kolumnowej stosując jako eluent układ heksan/octan etylu 8/1, v/v. Uzyskano 7,3 g (24,9 mmol, 60%) bezbarwnego oleju o skręcalności $[\alpha]_D^{20} +15,5$ (c1, C₂H₅OH), lit.¹⁸⁹ $[\alpha]_D^{20} +15,8$ (c0,9, C₂H₅OH).

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1,37 (s, 9H, Boc), 3,62 (m, 2H, CH₂), 4,10 (m, 1H, CH), 5,11 (s, 2H, CH₂-Ph), 7,37-7,47 (m, 5h, Ph)

(2R)-O-karbamoilo- N-tert-butoksykarbonyloserynian benzylu 18



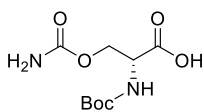
W kolbie kulistej o pojemności 250 ml umieszczono 7 g (23,9 mmol) estru benzyłowego Boc-D-seryny **17** oraz 100 ml DCM i mieszaninę ochłodzono do 0°C. Do roztworu powoli dodano 5,4 g (28,7 mmol) izocyjanianu trichloroacetyl, po czym zawartość kolby ogrzano do RT i pozostawiono na 5h. Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczono w 100 ml metanolu i dodano 330 mg (2,39 mmol) węglań potasu. Mieszaninę pozostawiono w RT na 4h, a następnie rozpuszczalnik odparowano, pozostałość rozpuszczono w 50 ml DCM i przemyto 40 ml nasyconego wodnego roztworu NH₄Cl. Warstwę wodną ekstrahowano DCM (30 ml). Połączone warstwy organiczne przemyto solanką (2x30 ml), osuszono nad bezwodnym MgSO₄, środek suszący oddzielono, a filtrat odparowano pod

zmniejszonym ciśnieniem. Czysty produkt uzyskano po oczyszczeniu z użyciem cieczerwowej chromatografii kolumnowej stosując jako eluent mieszaninę heksan/octan etylu 4/6, v/v. Otrzymano 6,1 g (17,93 mmol, 75%) produktu w postaci białego proszku.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 1,36 (s, 9H, Boc), 4,02, (dd, J = 11 Hz, 7,5 Hz, 1H, CH_2), 4,20 (dd, J = 11,1 Hz, 4,9 Hz, 1H, CH_2), 4,28 (m, 1H, CH), 5,11 (s, 2H, CH_2 -Ph), 6,45-6,72 (bd, J = 48,3 Hz, 2H, NH_2CO), 7,27-7,40 (m, 6H, Ph i NH)

^{13}C NMR (125 MHz, D_2O): δ = 28,55; 53,86; 62,75; 66,62; 79,00; 128,18; 128,49; 128,84; 136,21; 155,76; 156,71; 170,45

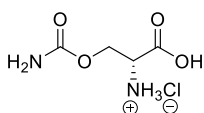
O-karbamoilo-*N*-*tert*-butoksykarbonylo-*D*-seryna **19**



W kolbie kulistej o pojemności 100 ml umieszczono 6 g (17,75 mmol) estru benzyłowego Boc-*O*-karbamoilo-*D*-seryny **18**, 50 ml metanolu oraz 200 mg 10% katalizatora Pd/C. Przez zawiesinę przepuszczano wodór w RT stale mieszając przez 2h, po czym katalizator przesączono przez celit pod zmniejszonym ciśnieniem. Osad przemyto wielokrotnie metanolem, a uzyskany przesącz zatężono na wyparce obrotowej. Otrzymano 4,2 g (16,86 mmol, 95%) produktu w postaci bezbarwnego oleju.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 1,38 (s, 9H, Boc), 4,11, (m, 1H, CH_2), 4,34 (m, 1H, CH_2), 4,52 (m, 1H, CH), 7,87 (d, 2H, NH_2), 12,96 (bs, 1H, COOH)

chlorowodorek *O*-karbamoilo-*D*-seryny **KSer**



W kolbie kulistej o pojemności 50 ml umieszczono 2 g (8,03 mmol) Boc-*O*-karbamoilo-*D*-seryny **19**, 30 ml DCM oraz 10 ml TFA. Zawartość kolby mieszano w RT przez 2h, po czym rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczono w 15 ml 4M roztworu HCl w 1,4-dioksanie i mieszano przez 1h w RT. Po tym czasie odparowano rozpuszczalniki i otrzymano 1,4 g (7,47 mmol, 93%) produktu w postaci białawego proszku.

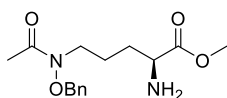
^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 4,05, (m, 1H, CH_2), 4,14 (m, 1H, CH_2), 4,34 (m, 1H, CH)

^{13}C NMR (125 MHz, D_2O): δ = 63,04; 66,25; 156,78; 171,67

ESI-MS: obliczono dla $\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4$ 148,05, znaleziono m/z 149 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

5.2.5 Synteza N-terminalnych połączeń ω -N-acetylo- ω -N-hydroksy-L-ornityny z cząsteczką transportowaną

(2S)- ω -N-acetylo- ω -N-benzylorksynitrynian metylu **20**



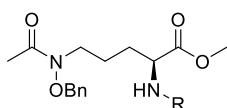
W kolbie kulistej o pojemności 50 ml umieszczono 1,8 g (4,56 mmol) estru metylowego **7** oraz 12 ml mieszaniny DCM/TFA, 3/1, v/v. Reakcję pozostawiono na 1h w RT, po czym odparowano rozpuszczalniki pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczono w 50 ml octanu etylu. Warstwę organiczną przemyto nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃ (2x30 ml), osuszono nad bezwodnym MgSO₄, środek suszący odrzucono, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskano 1.33 g (4,56 mmol, 100%) produktu w postaci bezbarwnego oleju, który użyto w kolejnych reakcjach bez dalszego oczyszczania.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1,73 -1,98 (m, 4H, CHCH₂CH₂), 2,07 (s, 3H, CH₃CO), 3,68 (m, 1H, CH₂N), 3,72 (m, 1H, CH₂N), 3,77 (s, 3H CH₃O), 4,11 (m, 1H, CHCH₂), 4,83 (s, 2H, CH₂Ph), 7,33-7,41 (m, 5H, Ph);

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 19,48; 22,26; 26,98; 44,25; 52,67; 53,42; 76,65; 128,86; 129,30; 129,40; 133,39; 160,82; 169,43

ESI-MS: obliczono dla C₁₅H₂₂N₂O₄ 294,16, znaleziono m/z 295 [M+H]⁺.

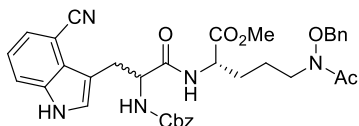
Związki **21ab** – przepis ogólny



W kolbie kulistej o pojemności 50 ml umieszczono 1 eq pochodnej 4-cyjanotryptofanu **11** lub cispentacyny **12** oraz 25 ml bezwodnego DMF. Następnie w jednej porcji wprowadzono 1.2 eq odczynnika sprzęgającego DEPBT oraz 2 eq zasady DIPEA. Mieszaninę pozostawiono na noc w RT, po czym zawartość kolby wylano na 1M wodny roztwór HCl umieszczony w rozdzielaczu, co skutkowało pojawieniem się białego zmętnienia. Warstwę wodną ekstrahowano octanem etylu (3x20 ml), a połączone warstwy organiczne przemyto nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃ (3x20 ml), wodą (2x20ml) i solanką (2x20ml). Połączone warstwy octanowe osuszono nad bezwodnym MgSO₄, środek suszący odrzucono, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskany olej oczyszczono na drodze cieczowej chromatografii kolumnowej otrzymując odpowiednie estry aktywne. Następnie 1 eq estru aktywnego rozpuszczono w 20 ml bezwodnego DMF i dodano 1.1 eq estru metylowego **20**, 0.1 eq DMAP oraz 2 eq DIPEA. Reakcję pozostawiono w RT przez noc, po czym produkt izolowano z mieszaniny poreakcyjnej analogicznie

jak dla estru aktywnego CNTrp **11** lub CP **12**. Produkt oczyszczono stosując cieczową chromatografię kolumnową.

rac-N-benzyloksykarbonylo-4-cyjanotryptofanylo- ω -*N*-acetylo- ω -*N*-benzyloksy-L-ornitynian metylu **21a**



Wychodząc z 200 mg (0,41 mmol) pochodnej 4-cyjanotryptofanu **11** oraz 150 mg (0,49 mmol) DEPBT uzyskano 156 mg (0,31 mmol, 75%) estru aktywnego po oczyszczeniu cieczową chromatografią kolumnową (eluent: heksan/octan etylu 4/1, v/v).

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 3,47 (m, 1H, CH_2CH), 3,71 (m, 1H, CH_2CH), 5,00 (m, 1H, CH_2CH), 5,03 (s, 2H, CH_2Ph), 7,24-7,40 (m, 5H, Ph), 7,55 (d, J = 7,46 Hz, 1H Ar CNT), 7,57 (d, J = 2,89 Hz, 1H, Ar CNT), 7,76 (d, J = 7,46 Hz, 1H, Ar CNT), 8,04 (t, J = 7,61 Hz, 1H Ar CNT), 8,19-8,37 (m, 4H, Ar DEPBT), 11,6 (s, 1H, NH indol).

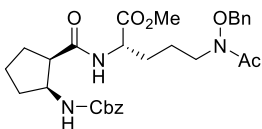
150 mg (0,29 mmol) uzyskanego estru aktywnego 4-cyjanotryptofanu sprzęgano z 95 mg (0,32 mmol) pochodnej **20**. Surowy produkt oczyszczono stosując chromatografię kolumnową w układzie heksan/octan etylu, 2/1, v/v w rezultacie uzyskując 130 mg (0,21 mmol, 71%) oleju w postaci mieszaniny diastereoizomerów.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 1,52 -1,96 (m, 4H, CHCH_2CH_2), 2,13 (s, 3H, CH_3CO), 3,17, (m, 1H, CH_2CH CTR), 3,55 (m, 1H, CH_2CH CTR), 3,57-3,74 (m, 2H, CH_2N), 3,70 (s, 3H CH_3O), 4,6 (m, 1H, CHCH_2 AHO), 4,72 (2xm, 1H, CHCH_2 CTR), 4,82 (d, 2H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 4,85 (s, 2H, NOCH_2Ph), 6,66 (2xd, J = 8,2 Hz, 1H, CONH), 6,88-7,46 (m, 14H, 2xPh oraz Ar CNT), 7,55 (m, 1H, OCONH), 9,3 (d, 1H, NH indol)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ = 20,52; 23,13; 29,32; 29,32; 31,46; 36,53; 52,44; 55,97; 66,76; 66,87; 76,28; 109,99; 116,63; 121,37; 125,99; 127,98; 128,41; 128,70; 128,76; 129,04; 129,13; 129,23; 134,27; 136,44; 162,58; 171,66; 171,92; 171,94; 172,05

ESI-MS: obliczono dla $\text{C}_{35}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_7$ 639,27, znaleziono m/z 640 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(2*R*,3*S*)-*N*-benzyloksykarbonylocispentacylo-(*S*)- ω -*N*-acetylo- ω -*N*-benzyloksyornitynian metylu **21b**



Wychodząc z 150 mg (0,57 mmol) pochodnej cispentacyny **12** oraz 205 mg (0,68 mmol) DEPBT, uzyskano 190 mg (0,47 mmol, 82%), estru aktywnego pochodnej cispentacyny oczyszczonego metodą chromatografii kolumnowej (eluent: heksan/octan etylu 7/1, v/v).

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 1,50-2,12 (bs, 6H, $3\times\text{CH}_2$ CP), 3,53 (m, 1H, CHCO), 4,43 (m, 1H, CHNH), 5,06 (m, 2H, CH_2Ph), 7,26-7,40 (bs, 5H, Ph), 7,59 (d, J = 8,1 Hz, 1H, CONH), 8,02-8,37 (t, J = 7,6 Hz, 1H; t, J = 7,2 Hz, 1H; dd J = 15,1 Hz, 8 Hz, 2H, Ar DEPBT)

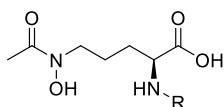
Wychodząc z 180 mg (0,44 mmol) estru aktywnego cispentacyny oraz 140 mg pochodnej **20** (0,49 mmol) otrzymano, po oczyszczeniu chromatografią kolumnową (eluent: heksan/octan etylu 1/1, v/v), 173 mg (0,32 mmol, 73%) produktu **21b**.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 1,5-1,96 (bs, 10H, $3\times\text{CH}_2$ CP oraz CHCH_2CH_2 AHO), 2,03 (3H, CH_3CO), 2,89 (m, 1H, CHNH CP), 3,5 – 3,7 (m, 2H, CHCH_2N), 3,71 (s, 3H, CH_3O), 4,20 (m, 1H, CHCO), 4,54 (m, 1H, CHCH_2), 4,75 (d, 2H CH_2Ph), 5,08 (układ AB, 2H, CH_2Ph), 5,69 (dd, J = 22 Hz, 6,4 Hz, 1H, OCONH), 6,51 (dd, J = 27,8 Hz, 7,3 Hz, 1H, NHCO), 7,26-7,39 (m, 10H, $2\times\text{Ph}$)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ = 20,41; 22,21; 22,99; 28,06; 28,62; 32,12; 47,24; 51,17; 51,78; 52,42; 54,70; 66,51; 76,18; 127,91; 128,04; 128,07; 128,41; 128,48; 128,75; 128,78; 129,05; 129,09; 129,18; 134,19; 136,67; 156,24; 172,62; 173,77; 173,93

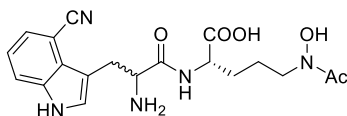
ESI-MS: obliczono dla $\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_7$ 539,26, znaleziono m/z 540 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Związki **22ab** – przepis ogólny



W kolbie kulistej o pojemności 50 ml umieszczono 1 eq pochodnej **21ab**, 10 ml 1,4-dioksanu oraz 10 ml 1M wodnego roztworu LiOH. Mieszaninę pozostawiono w RT na 2-3h, po czym dioksan został odparowany pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość potraktowano 1M wodnym roztworem HCl i doprowadzono pH do ok. 2. Warstwę wodną ekstrahowano octanem etylu (3×20 ml), a połączone warstwy organiczne przemyto wodą (20 ml) i solanką (20 ml), osuszono nad bezwodnym MgSO_4 , środek suszący odrzucono, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany olej rozpuszczono w 20 ml metanolu oraz dodano 0,01 eq 10% katalizator Pd/C. Przez zawiesinę przepuszczano wodór, a reakcję pozostawiono w RT na kilka godzin, po czym katalizator odsączono przez celit pod zmniejszonym ciśnieniem kilkakrotnie przemywając osad metanolem. Uzyskany przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem do uzyskania oleju, który rozpuszczono w niewielkiej ilości wody i liofilizowano.

rac-4-cyjanotryptofanylo-(S)- ω -N-acetylo- ω -N-hydroksyornityna 22a



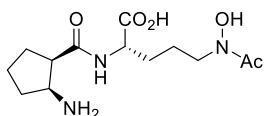
Wychodząc z 120 mg (0,19 mmol) związku **21a** uzyskano 60 mg produktu **22a** (0,15 mmol, 80%).

^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 1,34 -1,44 (m, 4H, CHCH_2CH_2), 1,87 (s, 3H, CH_3CO), 2,96-3,48 (m, 4H, CH_2CH CNT oraz CH_2N), 4,02 (m, 1H, CHCH_2 CNT), 4,43 (m, 1H, CHCH_2), 7,21-7,78 (m, 5H, CNT oraz CONH)

^{13}C NMR (125 MHz, D_2O): δ = 9,14; 22,09; 28,02; 28,71; 28,95; 29,22; 47,1; 47,52; 54,62; 55,61; 56,03; 99,15; 108,36; 117,26; 120,56; 121,1; 125,63; 126,24; 127,79; 136,14; 172,69; 178,04; 178,69; 181,50

ESI-MS: obliczono dla $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_5$ 401,17, znaleziono m/z 402,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$

(2R,3S)-cispentacynylo-(S)- ω -N-acetylo- ω -N-hydroksyornityna 22b



Wychodząc z 160 mg (0,30 mmol) związku **21b** otrzymano 70 mg (0,23 mmol, 78%) produktu **22b** o skręcalności $[\alpha]_D^{20}$ -6,67 (c0,6, H_2O)

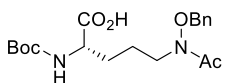
^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 1,5-2,0 (bs, 10H, CH_2 CP i $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{AHO}$), 1,95 (s, 3H, CH_3CO), 2,25 (m, 1H, CHCO CP), 2,72 (m, 1H, CHNH_2), 3,47 (t, J = 5,2 Hz, 2H, CH_2N), 3,96 (m, 1H, CHCH_2)

^{13}C NMR (125 MHz, D_2O): δ = 19,17; 21,24; 21,60; 21,81; 22,58; 26,07; 28,05; 30,31; 31,92; 43,30; 45,34; 45,85; 47,37; 53,76; 61,90; 69,68; 173,69; 174,13; 177,48

ESI-MS: obliczono dla $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_5$ 301,15, znaleziono m/z 302,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 300,1 $[\text{M}-\text{H}]^-$

5.2.6 Synteza C-terminalnych połączeń ω -N-acetylo- ω -hydroksy-L-ornityny z cząsteczką transportowaną

 ω -N-acetylo- ω -N-benzyloksi- α -N-tert-butyloksi-karbonylo-L-ornityna 23



W kolbie kulistej o pojemności 100 ml umieszczono 1.8 g (4,56 mmol) estru metylowego pochodnej ornityny **7** rozpuszczonego w 25 ml THF. Do kolby dodano 25 ml 1M wodnego roztworu LiOH i roztwór pozostawiono na 2-3h w RT stale mieszając. Następnie THF odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a do pozostałości dodano 1M wodny roztwór HCl doprowadzając pH do ok. 2. Mieszaninę

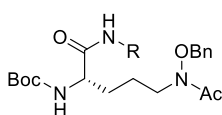
ekstrahowano octanem etylu (3x30 ml), po czym połączone warstwy organiczne przemyto wodą (30 ml) oraz solanką (30 ml), osuszono nad bezwodnym MgSO₄, środek suszący odrzucono, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem uzyskując 1.65 g (4,33 mmol, 95%) produktu w postaci oleju.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1,42 (s, 9H, Boc), 1,61–1,88 (m, 4H, CHCH₂CH₂), 2,08 (s, 3H, CH₃CO), 3,64 (m, 1H, CH₂N), 3,7 (m, 1H, CH₂N), 4,32 (m, 1H, CH-CH₂), 4,8 (s, 2H, CH₂Ph), 5,22 (d, 1H, CO-NH), 7,34-7,40 (m, 5H, Ph)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 20,31; 22,96; 28,30; 29,70; 44,64; 52,78; 76,18; 79,94; 128,76; 129,06; 129,10; 134,27; 155,70; 173,07; 175,11

ESI-MS: obliczono dla C₁₉H₂₈N₂O₆ 380,19, znaleziono *m/z* 381 [M+H]⁺

Związki **24ab** oraz **26** – przepis ogólny



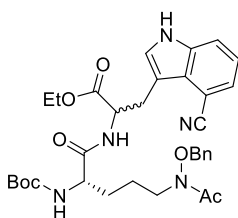
W kolbie kulistej o pojemności 100 ml umieszczono 0,5 g (1,26 mmol) pochodnej hydroksyornityny **23**, 25 ml bezwodnego DMF, 455 mg (1,52 mmol) odczynnika sprzęgającego DEPBT oraz 440 μl (2,52 mmol) DIPEA.

Reakcję pozostawiono w RT na noc, po czym zawartość kolby wylano na 50 ml 1M wodnego roztworu HCl. Mieszankę ekstrahowano octanem etylu (4x40 ml), a połączone warstwy organiczne przemyto kilkakrotnie nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃ (3x30 ml), wodą (2x30 ml) oraz solanką (30 ml). Warstwę octanową wysuszono nad bezwodnym MgSO₄, środek suszący odsączono, a filtrat odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Powstały produkt oczyszczono za pomocą cieczerwowej chromatografii kolumnowej stosując jako eluent układ heksan/octan etylu 2/1, v/v. Uzyskano 510 mg (0,97 mmol, 77%) estru aktywnego AHO w postaci żółtego oleju.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1,48 (s, 9H, Boc), 1,58 -1,98 (m, 4H, CHCH₂CH₂), 2,14 (s, 3H, CH₃CO), 3,79 (m, 2H, CH₂N), 4,84 (m, 1H, CHCH₂), 4,89 (s, 2H, CH₂Ph), 5,24 (d, *J* = 4,39 Hz, 1H, CONH), 7,33-7,42 (m, 5H, C₆H₅), 7,89 – 8,35 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H; *t*, *J* = 7,4 Hz, 1H; d, *J* = 8,2 Hz, 1H; d, *J* = 7,9 Hz, 1H; Ar DEPBT)

Następnie w kolbie kulistej o pojemności 50 ml umieszczono 250 mg (0,48 mmol) estru aktywnego AHO, 20 ml bezwodnego DMF, 1,1 eq związku **10**, **15** lub **19**, 0,1 eq DMAP oraz 2 eq DIPEA. Reakcję pozostawiono w RT na noc, po czym produkt izolowano analogicznie do estru aktywnego AHO **23**. Produkt oczyszczono poprzez cieczerwą chromatografię kolumnową stosując układ heksan/octan etylu 1/1, v/v, jako eluent.

(2*S*)- ω -*N*-benzyloksy- ω -*N*-acetylo- α -*N*-*tert*-butoksykarbonylo-ornitylo-*rac*-(4-cyjano)tryptofanian etylu **24a**



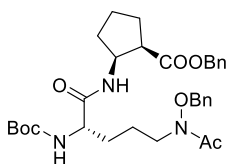
Wychodząc z 135 mg (0,53 mmol) pochodnej tryptofanu **10** uzyskano 223 mg (0,36 mmol, 75%) produktu **24a** w postaci oleju.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 1,23 (2t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 1,39 (2s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 1,42-2,0 (m, 4H, CHCH_2CH_2), 2,06 oraz 2,11 (2s, 3H, CH_3CO), 3,3-3,7 (m, 4H, CH_2CH CNT oraz CH_2N), 3,78 oraz 3,96 (2m, 1H, CHCH_2 CNT), 4,09-4,28 (m, 3H, CHCH_2 oraz $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 4,79 (s, 2H, OCH_2Ph), 4,85 (s, 2H, NOCH_2Ph), 4,87 oraz 4,97 (2m, 1H, *t*BuNH), 5,21 oraz 5,29 (2m, 1H, CONH), 7,15-7,55 (m, 9H, Ph), 9,08 oraz 9,51 (2s, 1H, NH indol);

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ = 14,13; 20,26; 22,77; 27,05; 28,16; 30,03; 44,38; 52,55; 53,43; 60,49; 76,17; 80,09; 101,02; 109,41; 116,62; 119,62; 121,20; 126,21; 126,32; 126,68; 128,77; 128,78; 127,07; 129,11; 129,17; 133,95; 155,99; 172,37; 173,15; 173,82

ESI-MS: obliczono dla $\text{C}_{33}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_7$ 619,30, znaleziono m/z 620 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(2*S*)- ω -*N*-benzyloksy- ω -*N*-acetylo- α -*N*-*tert*-butoksykarbonylo-ornitylo-(2*R*,3*S*)-cispentacynian benzylo **24b**



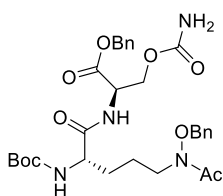
Wychodząc z 116 mg (0,53 mmol) pochodnej cispentacyny **15** otrzymano 204 mg (0,35 mmol, 73%) produktu **24b** jako bezbarwny olej.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 1,4 (s, 9H, Boc), 1,4-2,0 (m, 10H, 6H od CP oraz 4H CHCH_2CH_2), 2,07 (s, 3H, CH_3CO), 3,01 (m, 1H, CHNH CP), 3,50 (m, 1H, CHCO CP), 3,90 (m, 1H, CHCH_2), 4,11 (m, 1H, CHCH_2), 4,44 (m, 1H, CHCH_2), 4,81 (m, 2H, CH_2Ph), 5,10 (m, 2H, CH_2Ph), 6,67 (bs, 1H, NHCO), 7,27-7,41 (m, 10H, 2xPh), 8,1 (s, 1H, BocNH);

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ = 20,38; 22,94; 23,98; 27,84; 28,28; 28,98; 31,71; 38,92; 46,76; 52,2; 66,41; 67,71; 76,20; 79,80; 128,26; 128,36; 128,60; 128,75; 129,04; 129,23; 129,45; 134,04; 156,03; 155,56; 165,86; 171,56; 173,81

ESI-MS: obliczono dla $\text{C}_{32}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_7$ 581,31, znaleziono m/z 582 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(2*S*)- ω -*N*-benzyloksy- ω -*N*-acetylo- α -*N*-*tert*-butoksykarbonylo-ornitylo-(2*R*)-*O*-
karbamoilo-serynian benzylu **26**



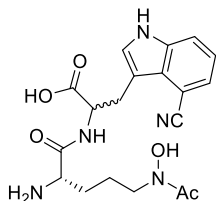
Wychodząc z 116 mg (0,53 mmol) pochodnej **15** otrzymano 187 mg (0,31 mmol, 65%) produktu **26** jako bezbarwny olej.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 1,43 (s, 9H, Boc), 1,51-1,88 (m, 4H, CHCH_2CH_2), 2,08 (s, 3H, CH_3CO), 3,54 (m, 1H, CH_2N), 3,89 (m, 1H, CH_2N), 4,32 (m, 1H, CH_2O), 4,45 (m, 1H, CH_2O), 4,81 (m, 3H, CH_2Ph i CH), 5,18 (s, 2H, CH_2Ph), 5,28 (m, 1H, CH), 7,05 (m, 1H, NHCO), 7,30-7,40 (m, 10H, 2xPh)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ = 20,42; 22,95; 28,30; 30,47; 44,41; 52,22; 53,17; 63,73; 67,62; 76,32; 79,84; 128,23; 128,48; 128,59; 128,76; 129,06; 129,23; 135,05; 155,64; 156,21; 169,12; 172; 172,87

ESI-MS: obliczono dla $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_9$ 600,28, znaleziono m/z 601 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(2*S*)- ω -*N*-acetylo- ω -*N*-hydroksy-ornitylo-*rac*-4-cyjanotryptofan **25a**



Do kolby kulistej o pojemności 50 ml dodano 200 mg (0,32 mmol) związku **24a**, 10 ml 1,4-dioksanu oraz 10 ml 1M wodnego roztworu LiOH. Reakcję pozostawiono stale mieszaną na 3h w RT, po czym dioksan odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a do pozostałości dodano 1M wodny roztwór HCl doprowadzając pH do ok. 2. Warstwę wodną ekstrahowano octanem etylu (3x20 ml), a połączone warstwy organiczne przemyto wodą (20 ml) i solanką (20 ml), osuszono nad bezwodnym MgSO_4 , środek suszący odrzucono, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem.

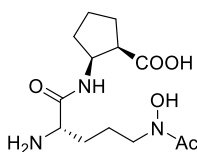
Otrzymany olej rozpuszczono w 9 ml DCM i dodano 3 ml TFA. Mieszaninę pozostawiono w RT na 2h, po czym rozpuszczalniki odparowano. Otrzymany olej rozpuszczono w 20 ml metanolu oraz dodano 15 mg 10% katalizatora Pd/C. Przez zawiesinę przepuszczano gazowy wodór, a reakcję pozostawiono w RT na kilka godzin, po czym katalizator odsączono przez celit pod zmniejszonym ciśnieniem kilkukrotnie przemywając osad metanolem. Uzyskany przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując 110 mg (0,27 mmol, 85%) oleju jako mieszaninę diastereoizomerów **25a**.

^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 1.06-1.7 (m, 4H, CHCH_2CH_2), 1.95 oraz 1.96 (2s, 3H, CH_3CO), 3.23-3.52 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}$ oraz CH_2N), 3.73 (m, 1H, CHCH_2), 4.63 oraz 4.75 (2xm, 1H, CHCH_2), 7.2-8.07 (m, 4H, Ar), 8.76 (m, 1H, CONH), 9.67 oraz 9.75 (2s, 1H, NH indol), 1.49 oraz 11.59 (2s, 1H, NOH), 12.85 (bs, 1H, COOH);

^{13}C NMR (125 MHz, D_2O): δ = 19.1, 20.63, 21.16, 26.03, 26.53, 27.49, 27.89, 46.49, 46.52, 52.43, 52.53, 53.25, 54.28, 108.53, 115.05, 117.37, 121.20, 125.59, 125.71, 126.41, 127.80, 127.27, 127.97, 136.09, 136.19, 140.9, 147.05, 162.76, 163.05, 169.02

ESI-MS: obliczono dla $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_5$] 401,17, znaleziono m/z 402,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(2S)- ω -N-acetylo- ω -N-hydroksy-ornitylo-(2R,3S)-cispentacyna **25b**



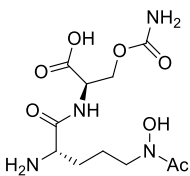
W kolbie kulistej o pojemności 20 ml rozpuszczono 180 mg (0,31 mmol) związku **24b** w 9 ml chloroformu oraz dodano 3 ml TFA. Reakcję pozostawiono na 1h w RT, po czym rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w 10 ml metanolu, dodano 10 mg katalizatora 10% Pd/C i przez zawiesinę przepuszczano gazowy wodór. Po zakończeniu reakcji osad odfiltrowano przez celit pod zmniejszonym ciśnieniem, przepłukując go kilkukrotnie wodą i odrzucono, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskano 80 mg (0,27 mmol, 86%) produktu **25b** w postaci oleju, o skręcalności $[\alpha]_D^{20}$ -8,6 (c 0.7, H_2O)

^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 1.12-1.87 (bs, 10H, 6H oraz 4H CHCH_2CH_2), 1.99 (s, 3H, CH_3CO), 2.83 (m, 1H, CHCO), 3.52 (m, 1H, CHNH_2), 3.68 (m, 1H, CH_2CH), 4.22 (m, 1H, CH_2CH), 4.39 (m, 1H, CHCH_2), 8.04 (s, 1H, OH), 8.22 (d, J = 8.7 Hz, 1H NHCO)

^{13}C NMR (125 MHz, D_2O): δ = 19.20, 21.26, 21.75, 26.59, 28.05, 31.23, 46.91, 48.28, 52.52, 52.79, 168.73, 174.02, 177.85

ESI-MS: obliczono dla $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_5$ 301,16, znaleziono m/z 302,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(2S)- ω -N-acetylo- ω -N-hydroksy-ornitylo-(2R)-O-karbamoiloseryna **27**



W kolbie kulistej o pojemności 20 ml rozpuszczono 170 mg (0,28 mmol) związku **26** w 9 ml chloroformu oraz dodano 3 ml TFA. Reakcję pozostawiono na 1h w RT, po czym rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w 10 ml metanolu, dodano 10 mg katalizatora 10% Pd/C i przez zawiesinę przepuszczano gazowy wodór. Po zakończeniu reakcji osad odfiltrowano przez celit pod zmniejszonym ciśnieniem

przepłukując go kilkukrotnie wodą i odrzucono, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskano 70 mg (0,22 mmol, 78%) produktu **27** w postaci oleju o skręcalności $[\alpha]_D^{20} +4,44$ (c0,45, H₂O)

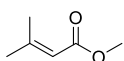
¹H NMR (500 MHz, D₂O): $\delta = 1,42-1,75$ (m, 4H, CHCH₂CH₂), 1,96 (s, 3H, CH₃CO), 3,50 (m, 2H, CHCH₂), 3,91 (t, $J = 6,7$ Hz, 1H, CH), 4,15 (m, 1H, CH₂), 4,19 (m, 1H, CH₂), 4,39 (m, 1H, CH)

¹³C NMR (125 MHz, D₂O): $\delta = 19,14; 21,32; 22,33; 27,79; 28,22; 46,90; 52,80; 54,12; 60,65; 64,87; 158,71; 169,10; 173,89; 174,54$

ESI-MS: obliczono dla C₁₁H₂₀N₄O₇ 320,13, znaleziono m/z 321,1[M+H]⁺.

5.2.7 Synteza rdzenia układu TML

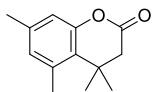
3-metylo-2-butenian metylu **28**



W kolbie kulistej o pojemności 1 l zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną umieszczono 50 g (0,5 mol) kwasu 3-metylo-2-butenowego rozpuszczonego w 300 ml bezwodnego metanolu. Do mieszaniny dodano 7,5 ml stężonego kwasu siarkowego(VI). Całość doprowadzono do wrzenia i prowadzono reakcję przez 18h. Następnie mieszaninę poreakcyjną ochłodzono do temperatury pokojowej i wylano na 1000 ml zimnej wody. Całość przeniesiono do rozdzielacza i ekstrahowano eterem dietylowym (3×200 ml). Połączone ekstrakty organiczne przemyto nasyconym roztworem wodnym NaHCO₃ (3×200 ml) oraz wodą (3×200 ml), osuszono nad bezwodnym MgSO₄. Rozpuszczalnik odparowano z wykorzystaniem wyparki obrotowej, nie przekraczając temperatury 30°C. Pozostałość w postaci żółtego oleju oczyszczono na drodze destylacji prostej zbierając frakcję wrzącą w temperaturze 137-139°C (lit.¹⁹⁰ 135-138°C). Otrzymano 37,1 g (0,33 mmol, 67%) produktu w postaci lekko żółtawej cieczy.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 1,97$ (s, 6H, 2xCH₃), 3,87 (s, 3H, CH₃O), 5,7 (m, 1H, CH)

4,4,5,7-tetrametylo-2-chromanon **29**



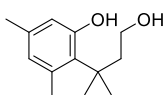
W kolbie kulistej o pojemności 250 ml zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną umieszczono 14,5 g (117 mmol) 3,5-dimetylofenolu, 50 ml kwasu metanosulfonowego oraz 15 g (130 mmol) estru **28**. Mieszaninę ogrzano do 70°C i w tej temperaturze mieszano przez 15h, a następnie ochłodzono do RT i wylano na 500 ml zimnej wody. Całość ekstrahowano octanem etylu (3×100 ml), połączone warstwy organiczne przemyto wodą (3×100 ml), nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃ (3×100 ml) oraz ponownie wodą (2×100 ml). Warstwę octanową suszono nad bezwodnym MgSO₄,

odsączonego środka suszającego, a rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Stałą pozostałość krystalizowano na gorąco z eteru dietylowego. Otrzymano 23 g (112,5 mmol, 96%) produktu w postaci bezbarwnych kryształów o *tt* 88-90°C (lit.¹⁴⁶ 89-90°C).

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1,34 (s, 6H, 2xCH₃), 2,21 (s, 3H, CH₃C_{sp2}), 2,42 (s, 3H, CH₃ C_{sp2}), 2,65 (s, 2H, CH₂), 6,72 (s, 1H, Ar), 6,78 (s, 1H, Ar),

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 20,4; 23,0; 27,6; 35,1; 45,0; 115,8; 127,3; 129,5; 136,3; 137,3; 151,8; 168,4

2-(3-hydroksy-1,1-dimetylopropylo)-3,5-dimetylofenol **30**



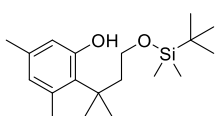
W kolbie kulistej o pojemności 1 l zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną zabezpieczoną przed dostępem wilgoci umieszczono 7,1 g (184 mmol) LiAlH₄ oraz 500 ml bezwodnego THF. Następnie, stale mieszając, powoli wprowadzono 15 g (74 mmol)

laktonu **29**, po czym mieszanie kontynuowano przez kolejne 4h. Następnie rozłożono nadmiar odczynnika redukującego poprzez stopniowe dodawanie początkowo octanu etylu, kolejno metanolu i finalnie wody. Czynność tę przeprowadzono chłodząc kolbę w lodzie i intensywnie mieszając jej zawartość. Następnie, nadal chłodząc mieszaninę, powoli dodawano 2M kwas solny aż do pełnego rozpuszczenia wytrąconych soli. Powstałą mieszaninę ekstrahowano octanem etylu (3×300 ml), połączone warstwy organiczne przemyto wodą (2×300 ml), nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃ (2×300 ml) i ponownie wodą (2×300 ml). Fazę organiczną osuszone nad bezwodnym MgSO₄, a rozpuszczalnik usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość krystalizowano z bezwodnego DCM. Otrzymano 14 g (67,3 mmol, 91%) produktu **30** w postaci bezbarwnych kryształów o *tt* 112-114°C (lit.¹⁴⁶ 112-114°C).

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1,44 (s, 6H, 2xCH₃), 2,04 (t, *J* = 7,9 Hz, 2H, CH₂), 2,07 (s, 3H, CH₃ Ar), 2,35 (s, 3H, CH₃ Ar), 3,20 (m, 2H, CH₂O), 4,11 (t, *J* = 4,9 Hz, 1H, CH₂OH), 6,28 (s, 1H, Ar), 6,43 (s, 1H, Ar), 8,96 (s, 1H, Ar-OH)

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 20,6; 26,0; 32,3; 40,0; 45,2; 59,6; 116,2; 125,8; 128,9; 135,2; 137,3; 157,4

2-(3-((*O*-*tert*-butylo)dimetylosililo)hydroksy)-1,1-dimetylopropylo)-3,5-dimetylofenol **31**



W dwuszyjnej kolbie kulistej o pojemności 250 ml, zaopatrzonej we wkraplacz oraz chłodnicę zwrotną, umieszczono roztwór 20 g (96 mmol) związku **30** oraz 19,52 g (160 mmol) DMAP w 100 ml bezwodnego DCM. Mieszaninę

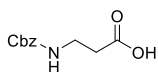
ochłodzono do temperatury 0°C, a następnie wkroplono roztwór 17,40 g (104 mmol) TBDMSCl w 50 ml bezwodnego DCM. Zawartość kolby mieszano przez 2h w temperaturze 0°C, po czym mieszaninę reakcyjną ogrzano do RT i kontynuowano mieszanie przez kolejne 3h. Po tym czasie mieszaninę przemyto kolejno: wodą (3×50 ml), 5% wodnym roztworem NaHCO₃ (3×50 ml) i ponownie wodą (3×50 ml). Frakcję organiczną suszono nad bezwodnym MgSO₄, odsączono środek suszący, a rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość krystalizowano z DCM, otrzymując 28,8 g (86,4 mmol, 90%) produktu **31** w postaci bezbarwnych kryształów o tt 107-109°C (lit.¹⁴⁶107-110°C)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -0,08 (s, 6H, 2xCH₃-Si), 0,79 (s, 9H, *t*Bu-Si), 1,42 (s, 6H, 2xCH₃), 2,05 (s, 3H, CH₃-Ar), 2,09 (m, 2H, CH₂), 2,36 (s, 3H, CH₃-Ar), 3,39 (t, 2H, *J* = 7,4 Hz, CH₂O), 6,28 (s, 1H, Ar), 6,43 (s, 1H, Ar), 8,99 (s, 1H, Ar-OH)

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: -4,7; 18,2; 20,7; 25,9; 26,4; 32,4; 45,5; 61,5; 115,9; 125,9; 128,3; 134,9; 137,3; 157,3

5.2.8 Synteza C-terminalnych połączeń ω-N-acetylo-ω-N-hydroksy-L-ornityny z łącznikiem TML oraz cząsteczką transportowaną

N-benzylloksykarbonylo-β-alanina **32**



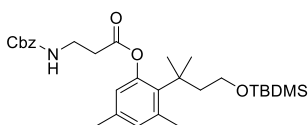
Cbz-β-alaninę zsyntezowano w standardowych warunkach.¹⁹¹

Wychodząc z 10 g (56,2 mmol) β-alaniny i 10 g (11,9 mmol) chloromrówczanu benzylu otrzymano 11,5 g (50 mmol, 89%) produktu w postaci krystalicznego bezbarwnego ciała stałego o tt 103-106°C, (lit.¹⁹² tt 104-106°C).

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2,35 (t, *J* = 6,9 Hz, 1H, NH) 2,51 (q, *J* = 7,1 Hz 2H, CH₂N), 3,33 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H, CH₂CO), 5,13 (s, 2H, CH₂Ph), 7,46 (m, 5H, Ph), 12,2 (bs, 1H, COOH)

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 33,3; 40,4; 66,7; 128,2; 128,3; 137,1; 157,8; 175,1

3-((N-benzylloksykarbonylo)amino)propionian 2-(3-*tert*-butylo-dimetylosililo-hydroksy-1,1-dimetylopropylo)-3,5-dimetylofenyłu **33**

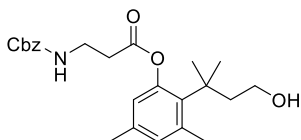


Do kolby kulistej o pojemności 250 ml dodano 4,6 g (14,2 mmol) fenolu **31**, 100 ml bezwodnego DCM, 3,9 g (18 mmol) chronionego aminokwasu **32** oraz 3,74 g (23,4 mmol) DMAP. Roztwór ochłodzono do temperatury 0°C, a następnie wkroplono do niego roztwór 7,38 g (36 mmol) DCC

w 50 ml bezwodnego DCM. Otrzymaną mieszaninę ogrzano do RT i pozostawiono stale mieszając przez 20h. Po tym czasie odsączono osad *N,N*-dicykloheksylomocznika, a przesącz odparowano na wyparce obrotowej. Do pozostałości dodano octan etylu i raz jeszcze przesączono utworzoną zawiesinę. Przesącz przeniesiono do rozdzielacza, warstwę organiczną przemyto 5% wodnym roztworem NaHSO₄ (2x30 ml), wodą (1x30 ml), nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃ (1x30 ml) i solanką (1x30 ml). Warstwę organiczną oddzielono, osuszono nad bezwodnym MgSO₄, oddzielono środek suszący i odparowano rozpuszczalnik. Oczyszczono produkt na drodze chromatografii kolumnowej stosując jako eluent układ heksan/octan etylu 4/1, v/v. Otrzymano 5,85 g (11,1 mmol, 78%) produktu **33** w postaci bezbarwnego oleju.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = -0,05 (s, 6H, 2xCH₃-Si), 0,72 (s, 9H, *t*Bu-Si), 1,37 (s, 6H, 2xCH₃), 1,96 (t, 2H, CCH₂ TML), 2,15 (s, 3H, CH₃-Ar), 2,45 (s, 3H, CH₃-Ar), 2,86 (t, 2H, CH₂CO), 3,32 (t, 2H, CH₂O), 3,38 (q, 2H, CH₂NH), 5,11 (s, 2H, CH₂Ph), 6,66 (s, 1H, Ar), 6,87 (s, 1H, Ar), 7,56 (m, 5H, Ph), 8,12 (s, 1H, NH)

3-((*N*-benzyloksykarbonylo)amino)propionian 2-(3-hydroksy-1,1-dimetylopropylo)-3,5-dimetylofenyłu **34**

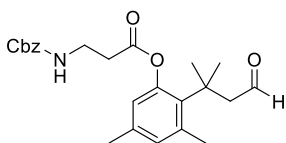


W kolbie kulistej o pojemności 250 ml umieszczono 5,8 g (11 mmol) eteru silylowego **33** oraz 100 ml mieszaniny THF/woda/kwas octowy 3/1/1, v/v/v. Roztwór mieszano w RT przez 6h, po czym rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w 100 ml octanu etylu, przeniesiono do rozdzielacza i przemyto wodą (30 ml), nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃ (2x30 ml) i ponownie wodą (30 ml). Warstwę organiczną osuszono nad bezwodnym MgSO₄, oddzielono środek suszący, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym stosując jako fazę ruchomą mieszaninę heksan/octan etylu, 7/3, v/v. Uzyskano 3,31 g (7,75 mmol, 70%) produktu **34** w postaci bezbarwnego oleju.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1,39 (s, 6H, 2xCH₃), 1,91 (t, 2H, CCH₂ TML), 2,17 (s, 3H, CH₃-Ar), 2,48 (s, 3H, CH₃-Ar), 2,74 (t, 2H, CH₂CO), 3,22 (t, 2H, CH₂O), 3,37 (q, 2H, CH₂NH), 5,05 (s, 2H, CH₂Ph), 6,64 (s, 1H, Ar), 6,83 (s, 1H, Ar), 7,36 (m, 5H, Ph), 7,50 (t, 1H, -OH), 8,33 (s, 1H, NH)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 20,1; 25,2; 32,0; 35,3; 36,8; 39,0; 46,0; 58,7; 65,8; 123,7; 128,2; 128,8; 132,3; 134,3; 135,7; 137,6; 138,3; 149,9; 156,6; 171,0

3-(((benzyloksy)karbonylo)amino)propionian 3,5-dimetylo-2-(2-metylo-4-okso-
butan-2-yl)fenylu **35**

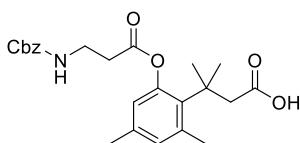


W kolbie kulistej o pojemności 100 ml zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i balon napełniony azotem umieszczono 3,3 g (8 mmol) alkoholu **34** oraz 40 ml bezwodnego DCM. Do roztworu dodano 3,44 g (16 mmol) chlorochromianu(VI) pirydyny i reakcję pozostawiono stale mieszaną w RT przez 1h. Po zakończeniu reakcji odparowano około 3/4 objętości DCM, a pozostałość poddano chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym stosując mieszaninę heksan/octan etylu 7/3, v/v jako eluent. Otrzymano 2,5 g (6,2 mmol, 77%) produktu **35** w postaci żółtego oleju.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 1,46 (s, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 2,17 (s, 3H, CH_3), 2,49 (s, 3H, CH_3), 2,82 (m, 4H, CH_2 , CHO, CH_2CO), 3,32 (m, 2H, CH_2N), 5,04 (s, 2H, CH_2Ph), 6,68 (s, 1H, Ar), 6,85 (s, 1H, Ar), 7,36 (m, 5H, Ph), 7,50 (t, 1H, NH), 9,45 (t, 1H, CHO)

^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3): δ = 20,2; 25,3; 31,5; 36,8; 35,2; 38,1; 56,4; 65,8; 123,7; 128,3; 128,8; 132,5; 133,4; 136,3; 137,6; 138,0; 149,5; 156,5; 171,1; 203,1

kwask 3-(2-(((N-benzyloksykarbonylo)amino)propioksy)-4,6-dimetylofenyl)-3-
metylobutanowy **36**



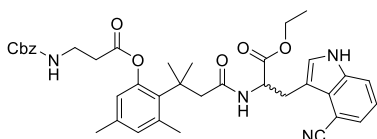
W kolbie kulistej o pojemności 100 ml umieszczono 2,5 g (6,2 mmol) aldehydu **35**, 44 ml mieszaniny aceton/*tert*-butanol/woda (6/4/1, v/v/v) oraz 6,94 g (57,7 mmol) wodorofosforanu(V) potasu i 3,9 ml (2,6 g, 37,2 mmol) 2-metylo-2-butenu. Następnie do powstałej zawiesiny dodano 1,11 g (37,2 mmol) drobno zmielonego chloranu(III) sodu, po czym reakcję pozostawiono stale mieszając w RT na 18h. Po tym czasie mieszaninę wylano na 50 ml nasyconego roztworu NH_4Cl i ekstrahowano eterem dietylowym (3x40 ml). Fazę organiczną przemyto wodą (30 ml), osuszono bezwodnym MgSO_4 , odsączono środek suszący, a rozpuszczalniki odparowano. Otrzymano chromatograficznie czysty produkt, najczęściej w postaci bezbarwnego ciała stałego. Produkt jest zwykle wystarczająco czysty, aby bezpośrednio go wykorzystać w dalszych syntezach. Jeżeli zachodzi taka potrzeba surowy kwas karboksylowy dodatkowo oczyszcza się chromatograficznie stosując chromatografię kolumnową na żelu krzemionkowym w układzie heksan/octan etylu/kwas octowy (10-40% obj. octanu etylu i 1% obj. kwasu octowego). Otrzymano 2,5 g (6 mmol, 97%) produktu **36** w postaci kremowego oleju krzepnącego w niższych temperaturach.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 1,45(s, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 2,16 (s, 3H, CH_3), 2,50 (s, 3H, CH_3), 2,67 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 2,75 (t, 2H, CH_2CO), 3,37 (m, 2H, CH_2N), 5,04 (s, 2H,

CH_2Ph), 6,64 (s, 1H, Ar), 6,80 (s, 1H, Ar), 7,36 (m, 5H, Ph), 7,49 (t, 1H, **NH**), 11,87 (s, 1H, **COOH**)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ = 20,2; 25,3; 31,5; 35,2; 36,8; 38,6; 47,9; 65,8; 123,5; 128,2; 128,8; 132,2; 134,3; 135,6; 137,6; 138,1; 149,7; 156,5; 170,9; 173,1

N-(3-(4-cyano-1*H*-indol-3-yl)-1-etoksy-1-oksypropylo)-3-(2-(((*N*-benzyloksykarbonylo)-3-amino)propioksy)-4,6-dimetylofenylo)-3-metylobutanamid **37**



W kolbie kulistej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i rurkę z chlorkiem wapnia, umieszczono 970 mg (2,3 mmol) kwasu karboksylowego **36**, który rozpuszczono w 20

ml bezwodnego DMF. Następnie do mieszaniny dodano 1,38 g (DEPBT) oraz 1,2 ml (6,9 mmol) DIPEA. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono stale mieszając w temperaturze pokojowej na 5h. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną wylano powoli na 1M roztwór kwasu solnego i ekstrahowano octanem etylu (3x30 ml). Ekstrakty organiczne połączone i przemyto kolejno wodą (1x20 ml), nasyconym roztworem NaHCO_3 (3x30 ml) i solanką (20 ml). Frakcję organiczną osuszono nad bezwodnym MgSO_4 , odsączono środek suszący, przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym stosując jako fazę ruchomą mieszaninę heksan/octan 7/3, v/v. Otrzymano 700 mg (1,2 mmol, 54%) estru aktywnego w postaci bezbarwnego ciała stałego.

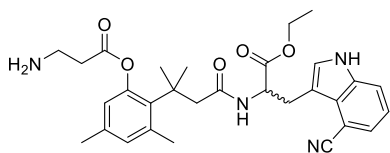
W kolbie kulistej o pojemności 15 ml umieszczono 260 mg (0,45 mmol) estru aktywnego, 5 ml bezwodnego DMF, 120 mg (0,5 mmol) pochodnej cyjanotryptofanu **10** oraz 250 μl (205 mg, 1,6 mmol) DIPEA. Całość mieszano w RT przez 2h, po czym mieszaninę wylano na 100 ml 1M wodnego roztworu HCl, przeniesiono do rozdzielacza i ekstrahowano octanem etylu (5x30 ml). Połączone warstwy organiczne przemyto wodą (3x50 ml), nasyconym roztworem NaHCO_3 (3x50 ml) i solanką (3x50 ml), osuszono nad bezwodnym MgSO_4 , przesączono, a przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej w układzie heksan/octan etylu 3/7, v/v. Otrzymano 220 mg (0,33 mmol, 73%) produktu **37** w postaci oleju.

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 1,05 (t, 3H, CH_3CH_2), 1,34 (d, 6H, 2x CH_3 TML), 1,99 (s, 2H, CH_2CONH), 2,18 (s, 3H, CH_3Ar), 2,39 (s, 3H, CH_3Ar), 2,53 (d, 2H, CH_2), 2,72 (t, 2H, CH_2CO_2), 3,19 (dd, J = 18 Hz, 6,4 Hz 1H, CH_2NH), 4,01 (m, 3H, CH_2NH i CH_2CH_3), 4,54 (m, 1H, **CH**), 5,04 (s, 2H, CH_2Ph), 6,58 (s, 1H, Ar), 6,74 (s, 1H, Ar),

7,22 (t, 1H, Ar), 7,33 (m, 5H, Ph), 7,37 (m, 1H, $NHCH_2$), 7,49 (d, 2H, Ar), 7,72 (d, 1H, Ar), 8,19 (d, 1H, $NHCO$), 11,54 (d, 1H, NH indol)

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ = 20,1; 21,2; 25,1; 26,8; 31,2; 35,3; 36,7; 39,1; 47,6; 53,2; 60,2; 60,7; 65,8; 100,6; 109,6; 117,4; 119,7; 121,3; 125,9; 126,3; 128,2; 128,8; 132,1; 135,1; 135,4; 136,9; 137,6; 138,0; 149,6; 156,6; 170,8; 171,0; 172,3

N-(3-(4-cyano-1*H*-indol-3-yl)-1-etoksy-1-oksypropylo)-3-(2-((3-aminopropioksy)-4,6-dimetylofenylo)-3-metylobutanamid **38**

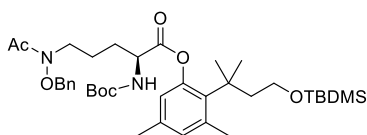


W kolbie kulistej o pojemności 25 ml umieszczono 210 mg (0,32 mmol) związku **37**, 10 ml metanolu oraz 50 mg katalizatora 10% Pd/C. Przez zawiesinę przepuszczano strumień wodoru przez 4h, po czym zawiesinę przesączono przez złożę celitowe, a przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano 140 mg (0,26 mmol, 81%) produktu w postaci bezbarwnego oleju.

1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ = 1,05 (t, 3H, CH_3CH_2 CNT), 1,35 (d, 6H, $2 \times CH_3$ TML), 1,82 (s, 2H, CH_2CONH), 2,22 (s, 3H, CH_3 Ar), 2,42 (s, 3H, CH_3 Ar), 3,11 (d, 1H, CH_2NH), 3,17 (d, 1H, CH_2NH), 3,21 (m, 2H, CH_2CH_3), 3,67 (t, 2H, CH_2CO_2), 3,98 (dd, J = 17,6 Hz, 6,7 Hz 2H, CH_2), 4,13 (m, 1H, CH), 6,73 (s, 1H, Ar), 6,78 (s, 1H, Ar), 7,21 (t, 1H, Ar), 7,44 (s, 1H, Ar), 7,49 (d, 1H, Ar), 7,70 (d, 1H, Ar), 11,56 (d, 1H, NH indol)

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ = 14,7; 19,9; 21,8; 29,5; 30,2; 35,5; 38,4; 39,3; 48,4; 51,3; 61,8; 109,3; 116,1; 120,1; 120,3; 122,9; 124,1; 125,2; 125,6; 130,8; 130,8; 133,8; 135,3; 136,8; 138,6; 151,2; 171,7; 172,8; 173,9

(*S*)-5-(*N*-(benzyloksy)acetamido)-2-((*tert*-butoksykarbonylo)amino)pentanian 2-((4-*tert*-butyłodimetylosililoksy)-2-metylobutan-2-yl)-3,5-dimetylofenyłu **39**



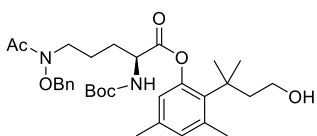
W kolbie kulistej o pojemności 50 ml umieszczono 0,5 g (1,55 mmol) prekursora TML **31**, 0,59 g (1,55 mmol) pochodnej *N*-hydroksyornityny **23** oraz 357 mg (1,86 mmol) chlorowodoru EDCI w 10 ml bezwodnego DMF. Do roztworu dodano 430 μ l (3,1 mmol) Et_3N , po czym reakcję mieszano w RT przez noc. Następnie do mieszaniny poreakcyjnej dodano 30 ml octanu etylu i całość przemyto nasyconym wodnym roztworem $NaHCO_3$ (2x20 ml), 5% wodnym roztworem $NaHSO_4$ (1x20 ml), wodą (20 ml) oraz solanką (20 ml). Warstwę organiczną osuszone nad bezwodnym $MgSO_4$, środek suszący odrzucono, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono stosując chromatografię kolumnową w układzie

heksan/octan etylu, 3/1, v/v uzyskując 830 mg (1,21 mmol, 78%) związku **39** w postaci oleju.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ = -0,05 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$), 0,81 (s, 9H, *t*Bu-Si), 1,43 (m, 15H, Boc i $(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 1,71-2,02 (m, 6H, CHCH_2CH_2 i CH_2C), 2,1 (s, 3H, CH_3CO), 2,17 (s, 3H, CH_3Ar), 2,5 (s, 3H, CH_3Ar), 3,47 (t, J = 7,1 Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{OSi}$), 3,7 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 4,49 (m, 1H CHCH_2), 4,83 (s, 2H, CH_2Ph), 5,16 (d, J = 8,5 Hz, 1H, *NHBoc*), 6,45 (s, 1H, Ar), 6,8 (s, 1H, Ar), 7,37 (m, 5H, Ph);

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ = -5,31; 18,21; 20,12; 20,52; 23,21; 25,22; 25,92; 28,30; 29,41; 31,82; 39,11; 45,90; 53,87; 60,75; 76,37; 79,99; 122,50; 128,73; 128,99; 129,19; 132,55; 134,13; 136,13; 138,58; 149,68; 155,36; 171,93

(*S*)-5-(*N*-(benzyloksy)acetamido)-2-((*tert*-butoksykarbonylo)amino)pentanian 2-(4-hydroksy-2-metylo)butan-2-ylo-3,5-dimetylofenylu **40**

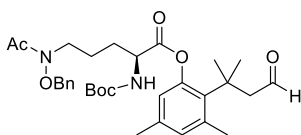


Do kolby kulistej o pojemności 100 ml wprowadzono 750 mg (1,1 mmol) związku **39** rozpuszczonego w 50 ml mieszaniny THF/ H_2O / AcOH , 1/1/3, v/v/v. Reakcję pozostawiono w RT przez 4h, po czym rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a stałą pozostałość rozpuszczono w 20 ml octanu etylu. Mieszaninę przemyto wodą (20 ml), nasyconym wodnym roztworem NaHCO_3 (2x20 ml) oraz ponownie wodą (20 ml). Warstwę organiczną osuszono nad bezwodnym MgSO_4 , osad oddzielono i odrzucono, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej stosując mieszaninę heksan/octan etylu 7/3, v/v jako eluent. Uzyskano 526 mg (0,9 mmol, 82%) czystego alkoholu **40** w formie bezbarwnego oleju.

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 1,34 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 1,37 (s, 9H, Boc), 1,61-1,84 (m, 4H, CHCH_2CH_2), 1,86 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1,97 (s, 3H, CH_3CO), 2,12 (s, 3H, CH_3Ar), 2,45 (s, 3H, CH_3Ar), 3,17 (q, J = 3,17 Hz, 2H, CH_2O), 3,63 (m, 2H, CH_2N), 4,16 (m, 1H CHCH_2), 4,85 (s, 2H, CH_2Ph), 6,43 (s, 1H, Ar), 6,8 (s, 1H, Ar), 7,36-7,44 (m, 5H, Ph), 7,48 (d, J = 8,0 Hz, 1H, *NHBoc*);

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 20,55; 21,77; 25,63; 28,38; 29,03; 32,56; 32,60; 39,62; 46,48; 54,85; 60,72; 76,19; 79,41; 122,95; 128,9; 129,11; 129,88; 132,19; 134,57; 135,74; 138,42; 151,16; 156,45; 171,52; 172,71

(S)-5-(N-(benzyloksy)acetamido)-2-((tert-butoksykarbonylo)amino)pentanian
3,5-dimetylo-2-(2-metylo-4-oksobutan-2-ylo)fenylu **41**

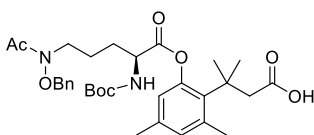


Do kolby kulistej o pojemności 100 ml umieszczonej w łaźni sporządzonej z suchego lodu oraz acetonu wprowadzono 50 ml bezwodnego DCM i naczynie ochłodzono do -78°C . W tej temperaturze dodano 0,15 ml (1,76 mmol) chlorku oksalilu, po czym wdroplono 0,28 ml (3,96 mmol) DMSO w 1 ml DCM utrzymując niską temperaturę układu (poniżej -60°C). Po 15 min do mieszaniny wprowadzono 500 mg (0,88 mmol) alkoholu **40** rozpuszczonego w 1 ml bezwodnego DCM i reakcję pozostawiono na 1,5h w -78°C . Następnie, do kolby wdroplono 1,2 ml trietyloaminy i mieszaninę pozostawiono do powolnego ogrzania do RT. Po osiągnięciu temperatury pokojowej dodano 5 ml DCM oraz 5 ml wody i zawartość kolby mieszano do wydzielenia się dwóch widocznych warstw. Warstwę wodną ekstrahowano DCM (2x10 ml), a połączone warstwy organiczne przemyto solanką (10 ml), osuszono nad bezwodnym MgSO_4 , środek suszący odrzucono, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskany olej rozpuszczono w 20 ml octanu etylu, przemyto 5% wodnym roztworem NaHSO_4 (2x10 ml), nasyconym wodnym roztworem NaHCO_3 (2x10 ml) oraz solanką (10 ml). Warstwy organiczne osuszono nad bezwodnym MgSO_4 , środek suszący odrzucono, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskano 330 mg (0,58 mmol, 66%) aldehydu **41** w postaci oleju.

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 1,36 (s, 9H, Boc), 1,40 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 1,44 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 1,61-1,85 (m, 4H, CHCH_2CH_2), 2,0 (s, 3H, CH_3CO), 2,12 (s, 3H, CH_3Ar), 2,46 (s, 3H, CH_3Ar), 2,81 (qd, J = 17 Hz, 2,1 Hz, 2H, CH_2CHO), 3,64 (m, 2H, CH_2N), 4,18 (m, 1H CHCH_2), 4,87 (s, 2H, CH_2Ph), 6,48 (s, 1H, Ar), 6,81 (s, 1H, Ar), 7,37-7,44 (m, 5H, Ph), 7,55 (d, J = 7,8 Hz, 1H, NHBoc), 9,42 (s, 1H, CHO);

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 20,06; 21,14; 25,35; 27,77; 28,57; 31,5; 31,64; 38,16; 54,26; 56,40; 75,67; 79,02; 122,98; 128,89; 129,10; 129,86; 132,46; 133,67; 135,28; 136,36; 138,06; 150,2; 156,04; 170,26; 172,44; 202,91

(S)-5-(N-(benzyloksy)acetamido)-2-((tert-butoksykarbonylo)amino)pentanian
3,5-dimetylo-2-(2-metylo-4-karboksylobutan-2-ylo)fenylu **42**



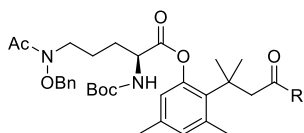
Do kolby kulistej o pojemności 250 ml wprowadzono 310 mg (0,55 mmol) aldehydu **41**, 55 ml mieszaniny aceton/tBuOH/woda 6/4/1, v/v/v, 120 mg (0,82 mmol) KH_2PO_4 , 350 μl (3,28 mmol) 2-metylobut-2-enu oraz 300 mg (3,28 mmol) NaClO_2 . Mieszaninę reakcyjną mieszano w RT przez 6h, po czym powoli dodano 15 ml nasyconego wodnego roztworu $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Następnie za pomocą 1M wodnego roztworu HCl doprowadzono pH mieszaniny do ok. 2 i ekstrahowano octanem etylu (3x20 ml). Połączone warstwy organiczne przemyto solanką (2x10 ml), osuszono nad bezwodnym MgSO₄, środek suszący odrzucono, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono stosując chromatografię kolumnową oraz układ heksan/octan etylu/kwas octowy 70/30/1, v/v/v, jako eluent. Otrzymano 310 mg (0,53 mmol, 97%) produktu **42** w postaci delikatnie żółtego oleju.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1,36 (s, 9H, (CH₃)₃C), 1,39 (s, 3H, Boc), 1,42 (s, 3H, (CH₃)₂C), 1,62-1,9 (m, 4H, CHCH₂CH₂), 2,0 (s, 3H, CH₃CO), 2,11 (s, 3H, CH₃Ar), 2,46 (s, 3H, CH₃Ar), 2,7 (m, 2H, CH₂COO), 3,63 (m, 2H, CH₂N), 4,18 (m, 1H CHCH₂), 4,85 (s, 2H, CH₂Ph), 6,46 (s, 1H, Ar), 6,77 (s, 1H, Ar), 7,37-7,44 (m, 5H, Ph), 7,5 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H, NHBoc), 11,73 (bs, 1H, COOH);

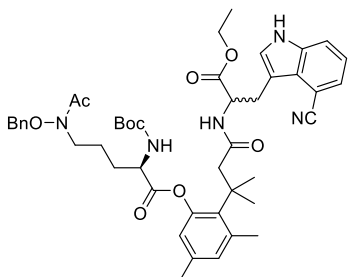
¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 20,1; 23,81; 25,29; 27,83; 28,56; 31,37; 31,53; 31,69; 38,62; 47,76; 54,26; 75,92; 79,02; 122,77; 128,90; 129,11; 129,88; 132,11; 134,51; 135,61; 138,20; 150,16; 156,21; 172,30; 172,3; 173,1

Związki **43ab** – przepis ogólny



Do kolby kulistej o pojemności 50 ml wprowadzono 150 mg (0,26 mmol, 1 eq) kwasu **42** rozpuszczonego w 10 ml bezwodnego DMF, 1,1 eq pochodnej: tryptofanu **10** lub cispentacyny **15**, 110 mg (0,28 mmol, 1,1 eq) HBTU oraz 140 μl (0,81 mmol, 3,1 eq) DIPEA. Mieszaninę reakcyjną mieszano w RT przez noc, po czym zawartość kolby wylano na 15 ml 1M wodnego roztworu HCl. Mieszaninę ekstrahowano octanem etylu (3x30 ml), a połączone warstwy organiczne przemyto nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃ (3x30 ml), wodą (30ml) oraz solanką (30 ml). Warstwę octanową osuszono nad bezwodnym MgSO₄, osad odrzucono, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono stosując cieczerową chromatografię kolumnową.

N-(3-(4-cyano-1*H*-indol-3-yl)-1-etoksy-1-oksypropan-2-yl)-3-(2-((2*S*)-5-(*N*-(benzyloksy)acetamido)-2-((*tert*-butoksykarbonylo)amino)-1-oksy-pentyl)-4,6-dimetylofenyl)-3-metylobutanamid **43a**

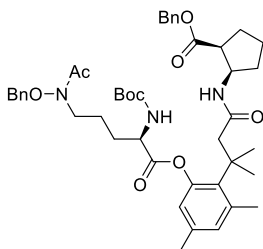


Wychodząc z 83 mg (0,26 mmol) pochodnej tryptofanu **10** po oczyszczeniu związku z zastosowaniem chromatografii kolumnowej oraz mieszaniny heksan/octan etylu 1/1, v/v, jako eluenta, uzyskano 180 mg (0,2 mmol, 84%) związku **43a** w postaci bezbarwnego oleju.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1,01 (2t, *J* = 7,1 Hz, 3H, CH₃CH₂O), 1,3 (2s, 3H, (CH₃)₂C), 1,2-1,36 (m, 12H, Boc oraz (CH₃)₂C), 1,62-1,85 (m, 4H, CHCH₂CH₂), 1,97 (s, 3H, CH₃CO), 2,07 (2s, 3H, CH₃Ar), 2,31 (s, 3H, CH₃Ar), 2,51 (m, 2H, CH₂COO), 3,16 (m, 1H, CHCH₂), 3,3 (m, 1H, CHCH₂), 3,61 (m, 2H, CH₂N), 3,95 (m, CH₃CH₂O), 4,12 (m, 1H, CHCH₂), 4,51 (m, 1H, CHCH₂), 4,84 (AB, 2H, CH₂Ph), 6,41 (s, 1H, TML Ar), 6,68 (s, 1H, Ar), 7,18-7,51 (m, 9H, Ph oraz Ar), 7,68 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, NHBoc), 7,84 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H, NHCO), 11,47 (2s, 1H, NH indol);

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 14,5; 20,77; 21,21; 25,33; 23,74; 27,77; 26,87; 28,55; 31,23; 31,42; 47,74; 53,19; 53,23; 54,28; 60,66; 75,66; 78,82; 100,67; 109,6; 117,4; 119,65; 121,29; 122,74; 125,89; 126,29; 128,08; 128,88; 129,1; 129,87; 132,04; 135,25; 135,49; 136,84; 138,11; 150,33; 156,2; 170,87; 172,18; 172,22; 172,38

N-((1*R*,2*S*)-2-((benzyloksy)karbonylo)-cyklopentyl)-3-(2-((2*S*)-5-(*N*-(benzyloksy)acetamido)-2-((*tert*-butoksykarbonylo)amino)-1-oksy-pentyl)-4,6-dimetylofenyl)-3-metylobutanamid **43b**



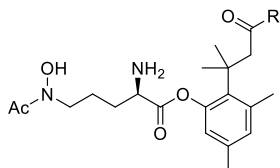
Wychodząc z 62 mg (0,28 mmol) pochodnej cispentacyny **15** po oczyszczeniu związku z zastosowaniem chromatografii kolumnowej oraz mieszaniny heksan/octan etylu 2/1, v/v, jako eluenta, uzyskano 187 mg (0,2 mmol, 83%) związku **43b** w postaci bezbarwnego oleju.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1,34 (s, 3H, (CH₃)₂C), 1,35 (s, 9H, Boc), 1,41 (s, 3H, (CH₃)₂C), 1,41-1,88 (m, 10H, CHCH₂CH₂ oraz 3xCH₂), 1,98 (s, 3H, CH₃CO), 2,09 (s, 3H, CH₃Ar), 2,32 (m, 1H, CH₂CON), 2,41 (s, 3H, CH₃Ar), 2,56 (m, 1H, CH₂CON), 3,29 (m, 1H, CHCO), 3,62 (m, 2H, CH₂CH₂N), 4,19 (m, 1H, CHNH), 4,26 (m, 1H

CHCH_2), 4,83-5,01 (m, 4H, NOCH_2Ph oraz $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 6,43 (s, 1H, Ar), 6,74 (s, 1H, Ar), 7,23-7,51 (m, 11H, 2xPh- oraz NHBoc);

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 20,05; 21,3; 25,39; 26,74; 25,42; 28,55; 31,23; 31,49; 31,59; 38,65; 39,13; 39,23; 47,53; 48,06; 52,33; 54,17; 65,73; 75,64; 78,88; 128,3; 128,34; 128,74; 128,89; 129,10; 129,86; 132,12; 135,26; 135,57; 136,59; 138,23; 150,16; 156,21; 170,26; 172,51; 172,58; 173,12

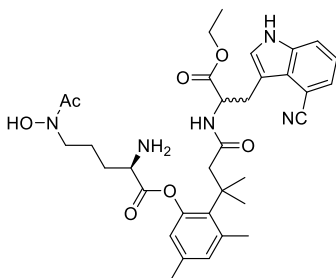
Związki **44ab** – przepis ogólny



W kolbie kulistej o pojemności 15 ml umieszczono 0,19 mmol związku **43a** lub **43b** oraz 9 ml DCM i 3 ml TFA. Mieszaninę pozostawiono w RT przez 1h, po czym rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Oleistą pozostałość rozpuszczono w 10 ml

metanolu i dodano 10 mg katalizatora 10% Pd/C. Następnie przez zawiesinę przepuszczano wodór, a po kilku godzinach mieszaninę przesączono przez celit pod zmniejszonym ciśnieniem. Osad kilkakrotnie przemyto sporą objętością metanolu, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem.

N-(3-(4-cyano-1*H*-indol-3-yl)-1-etoksy-1-oksypropan-2-yl)-3-(2-((2*S*)-5-(*N*-(hydroksy)acetamido)-2-amino-1-oksy-pentyl)-4,6-dimetylofenyl)-3-metylobutanamid **44a**



Wychodząc z 160 mg (0,19 mmol) związku **43a**, otrzymano 94 mg (0,15 mmol, 78%) związku **44a** w postaci oleju jako mieszaninę diastereoizomerów.

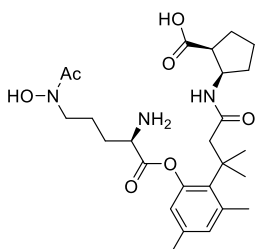
^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 1,01 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 1,36 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 1,49-1,83 (m, 4H, CHCH_2CH_2), 1,99 (2s, 3H, CH_3CO), 2,09 (2s, 3H, CH_3Ar), 2,38 (2s, 3H, CH_3Ar), 2,51 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CON TML}$), 3,04 (m, 1H, CHCH_2), 3,5 (m, 1H, CHCH_2), 3,64 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 4,05 (m, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 4,4 oraz 4,44 (2m, 1H, CHCH_2), 4,73 (m, 1H, CHCH_2), 6,49 (s, 1H, Ar), 6,72 (s, 1H, Ar), 7,09-7,56 (m, 4H, Ar);

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 12,91; 18,75; 21,82; 24,09; 23,1; 27,15; 26,56; 29,11; 30,48; 38,89; 53,49; 59,46; 60,61; 60,81; 100,34; 109,37; 115,54; 116,48;

117,81; 119,27; 120,75; 122,03; 125,46; 126,29; 127,04; 127,89; 132,58; 136,46;
136,89; 138,24; 148,90; 162,77; 171,95; 172,28; 172,74

ESI-MS: obliczono dla $C_{32}H_{39}N_5O_7$ 633,316, znaleziono m/z 634,4 $[M+H]^+$.

N-((1*R*,2*S*)-2-karboksylo-cyklopentyl)-3-(2-((2*S*)-5-(*N*-(hydroksylo)acetamido)-2-amino-1-oksypentyl)-4,6-dimetylofenyl)-3-metylobutanamid **44b**



Wychodząc z 150 mg (0,19 mmol) związku **43b**, otrzymano 82 mg (0,16 mmol, 85%) związku **44b** w postaci oleju. $[\alpha]_D^{20} +7,5$ (c1,2, MeOH)

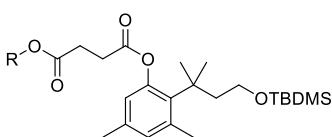
1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 1,42-1,50 (dd, J = 24 Hz, 14.2 Hz, 6H, (CH_3) $_2$ C), 1,53-1,84 (m, 10H, $CHCH_2CH_2$ oraz $3 \times CH_2$), 2,0 (s, 3H, CH_3CO), 2,12 (s, 3H, CH_3Ar), 2,37 (m, 1H, CH_2CON), 2,44 (s, 3H, CH_3Ar), 2,54 (m, 1H, CH_2CON), 3,31 (m, 1H, $CHCO$), 3,44 (m, 1H, $CHNH$), 3,56-3,76 (m, 2H, CH_2CH_2N), 4,17 (m, 1H $CHCH_2$), 4,49 (m, 1H, $CONH$), 6,56 (s, 1H, Ar), 6,76 (s, 1H, Ar), 7,85 (N-OH)

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ = 19,88; 20,08; 21,55; 21,86; 24,03; 23,85; 30,36; 31,94; 39,44; 45,03; 53,43; 54,26; 56,7; 61,76; 125,72; 126,62; 129,59; 131,38; 141,9; 154,08; 165,5; 168,55; 168,6; 172,32

ESI-MS: obliczono dla $C_{26}H_{39}N_3O_7$ 505,278, znaleziono m/z 506,3 $[M+H]^+$.

5.2.9 Synteza N-terminalnych połączeń ω -*N*-acetylo- ω -hydroksy-L-ornityny z łącznikiem TML oraz cząsteczką transportowaną

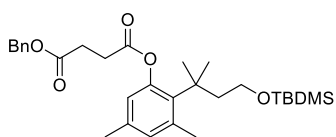
Związki **45ab** – przepis ogólny



W kolbie kulistej o pojemności 25 ml umieszczono 0,5 g (1,55 mmol, 1 eq) prekursora TML **31**, 357 mg (1,86 mmol, 1,2 eq) chlorowodoru EDCl, 1 eq wybranego monoestru kwasu bursztynowego

(benzylowego lub *tert*-butylowego) oraz 10 ml bezwodnego DCM. Następnie dodano 430 μ l (3,1 mmol, 2 eq) trietyloaminy i reakcję pozostawiono w RT przez noc. Po standardowej obróbce (patrz przepis dla związku **39**) produkty **45ab** oczyszczono stosując chromatografię kolumnową oraz układ heksan/octan etylu 4/1, v/v, jako eluent.

bursztynian (2-(4-(*tert*-butyłodimetylosililoksy)-2-metylobutan-2-ylo)-3,5-dimetylofenylo)-benzylu **45a**

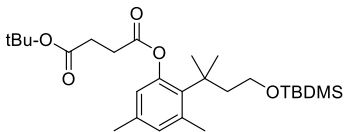


Wychodząc z 0,5 g (1,55 mmol) prekursora TML **31** oraz 322 mg (1,55 mmol) wodorobursztynianu benzylu uzyskano 613 mg (1,32 mmol, 85%) związku **45a** w postaci oleju.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = -0,09 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$), 0,78 (s, 9H, *t*Bu-Si), 1,37 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 1,92 (t, J = 7,4 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2,13 (s, 3H, CH_3Ar), 2,43 (s, 3H, CH_3Ar), 2,71 (t, J = 6,3 Hz, 2H, CH_2CO_2), 2,81 (t, J = 6,4 Hz, 2H, CH_2CO_2), 3,38 (t, J = 7,3 Hz, 2H, CH_2O), 5,1 (s, 2H, CH_2Ph), 6,50 (s, 1H, Ar), 6,80 (s, 1H, Ar), 7,29-7,33 (m, 5H, Ph)

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ = -4,83; 18,03; 20,02; 25,14; 25,88; 28,73; 29,98; 31,92; 38,87; 45,99; 60,74; 66,83; 122,96; 128,24; 128,30; 128,59; 132,35; 133,96; 135,70; 135,97; 138,35; 149,74; 171,10; 172,01

bursztynian (2-(4-(*tert*-butyłodimetylosililoksy)-2-metylobutan-2-ylo)-3,5-dimetylofenylo)-*tert*-butylu **45b**

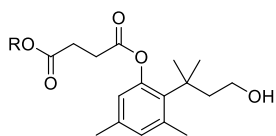


Wychodząc z 0,5 g (1,55 mmol) prekursora TML **31** oraz 270 mg (1,55 mmol) wodorobursztynianu *tert*-butylu uzyskano 626 mg (1,26 mmol, 81%) związku **45b** w postaci oleju.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = -0,9 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$), 0,78 (s, 9H, *t*Bu-Si), 1,38 (s, 9H, Boc), 1,39 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 1,92 (t, J = 7,3 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2,14 (s, 3H, CH_3Ar), 2,45 (s, 3H, CH_3Ar), 2,53 (t, J = 6,62 Hz, 2H, CH_2CO_2), 2,72 (t, J = 6,58 Hz, 2H, CH_2CO_2), 3,39 (t, J = 7,48 Hz, 2H, CH_2O), 6,53 (s, 1H, Ar), 6,80 (s, 1H, Ar);

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = -4,87; 18,08; 20,01; 25,15; 26,23; 28,15; 30,07; 32,05; 39,17; 46,02; 60,83; 80,45; 123,37; 132,25; 134,00; 135,58; 138,24; 150,06; 171,44; 171,74

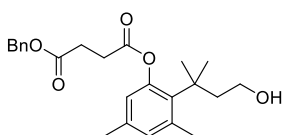
związeki **46ab** – przepis ogólny



W kolbie kulistej o pojemności 100 ml umieszczono 50 ml mieszaniny THF/woda/kwas octowy 1/1/3, v/v/v oraz związek **45ab**. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono w RT przez 4h, po czym rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczono w 20 ml octanu etylu i przeniesiono do rozdzielacza. Warstwę octanową przemyto wodą (20 ml), nasyconym wodnym roztworem NaHCO_3 (2x20 ml) oraz ponownie wodą (10

ml). Warstwę organiczną osuszono nad bezwodnym MgSO_4 , osad odrzucono, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono stosując cieczową chromatografię kolumnową w układzie heksan/octan etylu 7/3, v/v.

bursztynian (2-(4-hydroksylo-2-metylobutan-2-ylo)-3,5-dimetylofenylo)-benzylu
46a

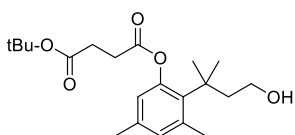


Wychodząc z 600 mg (1,2 mmol) związku **45a** uzyskano 432 mg (0,91 mmol, 76%) związku **46a** w postaci oleju.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 1,38 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 1,91 (t, J = 7,8 Hz, 2H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}-\text{CH}_2$), 2,17 (s, 3H, CH_3Ar), 2,48 (s, 3H, CH_3Ar), 2,75 (m, 2H, CH_2CO_2), 2,84 (m, 2H, CH_2CO_2), 3,21 (t, J = 6,8 Hz, 2H, CH_2O), 4,12 (bs, 1H, $-\text{OH}$), 5,14 (s, 2H, CH_2Ph), 6,51 (s, 1H, Ar), 6,84 (s, 1H, Ar), 7,36 (m, 5H, Ph);

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ = 19,92; 25,22; 28,77; 30,14; 32,05; 38,88; 45,88; 58,66; 66,2; 123,40; 128,36; 128,47; 128,87; 132,22; 134,41; 135,68; 136,50; 138,36; 149,86; 171,55; 172,21

bursztynian (2-(4-hydroksylo-2-metylobutan-2-ylo)-3,5-dimetylofenylo)-*tert*-butylu **46b**

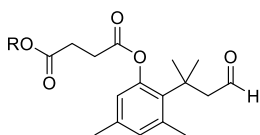


Wychodząc z 600 mg (1,29 mmol) związku **45b** uzyskano 344 mg (0,98 mmol, 76%) związku **46b** w postaci oleju.

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 1,39 (s, 9H, Boc), 1,40 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 1,90 (t, J = 7,9 Hz, 2H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}-\text{CH}_2$), 2,15 (s, 3H, CH_3Ar), 2,48 (s, 3H, CH_3Ar), 2,55 (dd, J = 7,5 Hz, 5,4 Hz, 2H, CH_2CO_2), 2,76 (dd, J = 7,5 Hz, 5,4 Hz, 2H, CH_2CO_2), 3,20 (m, 2H, CH_2O), 4,20 (t, J = 5,0 Hz, 1H, OH), 6,54 (s, 1H, Ar), 6,81 (s, 1H, Ar)

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 19,37; 24,58; 27,48; 29,68; 31,30; 38,41; 45,43; 58,06; 79,78; 122,79; 131,55; 133,79; 135,04; 137,73; 149,28; 170,92; 171,25

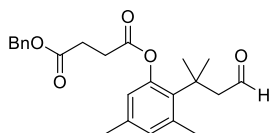
związki **47ab** – przepis ogólny



Do kolby kulistej o pojemności 100 ml umieszczonej w łaźni sporządzonej z suchego lodu oraz acetonu wprowadzono 50 ml bezwodnego DCM i ochłodzono do -78°C . W tej temperaturze dodano 1,2 eq chlorku oksalilu, po czym wkroplono 5 eq DMSO w 1 ml DCM utrzymując niską temperaturę

układu (poniżej -60°C). Po 15 min do mieszaniny wprowadzono 1 eq związku **46ab** rozpuszczonego w 10 ml bezwodnego DCM i reakcję pozostawiono na 1,5h w temperaturze -78°C. Następnie, do kolby wkroplono 15 eq trietyloaminy, a mieszaninę pozostawiono do powolnego ogrzania do RT. Po osiągnięciu temperatury pokojowej dodano 10 ml DCM oraz 10 ml wody i zawartość kolby mieszano do utworzenia się dwóch widocznych warstw. Po standardowej obróbce poreakcyjnej (patrz przepis dla związku **41**) uzyskano wystarczająco czysty produkt **47ab**, który użyto w dalszych etapach bez dodatkowego oczyszczania.

bursztynian (3,5-dimetylo-2-(2-metylo-4-oksobutan-2-ylo)fenylo)-benzylu 47a

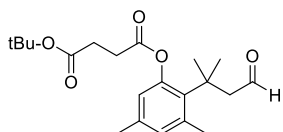


Wychodząc z 420 mg (0,84 mmol) alkoholu **46a** uzyskano 370 mg (0,74 mmol, 88%) aldehydu **47a**.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 1,57 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 2,25 (s, 3H, CH_3Ar), 2,56 (s, 3H, CH_3Ar), 2,83 (m, 4H, 2x CH_2CO_2), 2,91 (m, 2H, CH_2CHO), 5,18 (s, 2H, CH_2Ph), 6,61 (s, 1H, Ar), 6,87 (s, 1H, Ar), 7,37 (m, 5H, Ph), 9,55 (t, J = 2,4 Hz, 1H, CHO);

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ = 20,45; 25,1; 28,67; 29,6; 31,60; 37,82; 56,41; 66,42; 123,24; 128,26; 128,34; 128,60; 132,77; 136,90; 137,85; 149,14; 171,02; 171,88; 202,77

bursztynian (3,5-dimetylo-2-(2-metylo-4-oksobutan-2-ylo)fenylo)-tert-butylu 47b

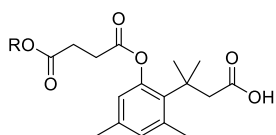


Wychodząc z 320 mg (0,69 mmol) alkoholu **46b** uzyskano 280 mg (0,61 mmol, 88%) aldehydu **47b**.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 1,37 (s, 9H, Boc), 1,46 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 2,15 (s, 3H, CH_3Ar), 2,47 (s, 3H, CH_3Ar), 2,54 (dd, J = 7,3 Hz, 5,5 Hz, 2H, CH_2CO_2), 2,76 (dd, J = 7,3 Hz, 5,4 Hz, 2H, CH_2CO_2), 2,88 (d, J = 2,2 Hz, 2H, CH_2CHO), 6,58 (s, 1H, Ar), 6,85 (s, 1H, Ar), 9,44 (t, J = 2,3 Hz, 1H, CHO);

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 19,9; 25,19; 28,09; 30,1; 31,40; 37,96; 56,31; 80,59; 123,56; 132,17; 133,51; 136,12; 138,10; 149,60; 171,61; 171,99; 202,74

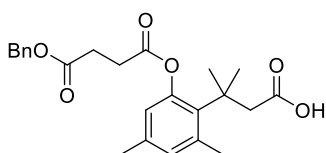
Związki 48ab – przepis ogólny



W kolbie kulistej o pojemności 250 ml umieszczono 1 eq aldehydu **47ab**, 55 ml mieszaniny aceton/tBuOH/woda 6/4/1, v/v/v, 1,5 eq KH_2PO_4 , 6 eq NaClO_2 oraz 6 eq 2-metylobut-2-enu. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono w RT na ok. 6h, po czym dodano powoli 20 ml nasyconego wodnego roztworu

Na₂S₂O₃. Następnie, za pomocą 1M wodnego roztworu HCl doprowadzono pH mieszaniny do ok. 2 i przeprowadzono standardową izolację (patrz przepis dla związku **42**). Produkty oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej stosując mieszaninę heksan/octan etylu/kwas octowy 70/30/1 jako eluent.

bursztynian (3,5-dimetylo-2-(2-metylo-4-karboksylobutan-2-ylo)fenylo)-benzylu **48a**

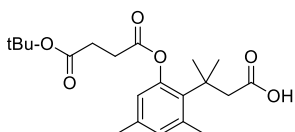


Wychodząc z 350 mg (0,7 mmol) aldehydu **47a** uzyskano 330 mg (0,64 mmol, 92%) związku **48a** w postaci żółtego oleju.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1,57 (s, 6H, (CH₃)₂C), 2,23 (s, 3H, CH₃Ar), 2,54 (s, 3H, CH₃Ar), 2,80 (t, J = 6,7 Hz, 2H, CH₂CO₂), 2,84 (s, 2H, (CH₃)₂CCH₂CO₂), 2,90 (t, J = 6,6 Hz, 2H, CH₂CO₂), 5,17 (s, 2H, CH₂Ph), 6,57 (s, 1H, Ar), 6,82 (s, 1H, Ar), 7,35 (m, 5H, Ph);

¹³C NMR (125MHz, CDCl₃): δ = 20,18; 25,21; 28,76; 29,85; 31,28; 38,61; 47,6; 66,72; 122,92; 128,25; 128,31; 128,59; 132,54; 133,32; 135,66; 136,32; 138,03; 149,38; 171,37; 172,11; 177,26

bursztynian (3,5-dimetylo-2-(2-metylo-4-karboksylobutan-2-ylo)fenylo)-tert-butylu **48b**

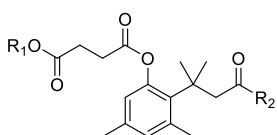


Wychodząc z 270 mg (0,58 mmol) aldehydu **47b** uzyskano 250 mg (0,52 mmol, 90%) związku **48b** w postaci żółtego oleju.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1,41 (s, 9H, Boc), 1,48 (s, 6H, (CH₃)₂C), 2,17 (s, 3H, CH₃Ar), 2,47 (s, 3H, CH₃Ar), 2,58 (dd, J = 7,3 Hz, 5,6 Hz, 2H, CH₂CO₂), 2,71 (s, 2H, CH₂CO₂), 2,78 (dd, J = 7,4 Hz, 5,5 Hz, 2H, CH₂CO₂), 6,55 (s, 1H, Ar), 6,80 (s, 1H, Ar), 11,79 (s, 1H, COOH);

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 20,12; 25,16; 28,36; 30,21; 31,26; 38,45; 48,14; 80,51; 123,17; 132,00; 134,25; 135,70; 138,0; 149,74; 171,56; 171,82; 173,2

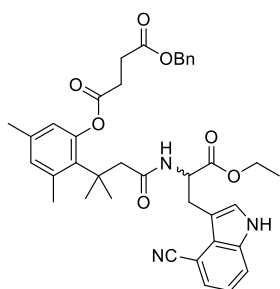
związki **49ab** – przepis ogólny



W kolbie kulistej o pojemności 25 ml umieszczono 1 eq kwasu **48a** i 1,1 eq pochodnej tryptofanu **11** lub 1 eq kwasu **48b** i 1,1 eq pochodnej cispentacyny **12**. Do

kolby dodano 10 ml bezwodnego DMF, 1,1 eq HBTU oraz 3,1 eq DIPEA. Reakcję pozostawiono w RT przez noc, po czym mieszaninę wylano na 1M wodny roztwór HCl umieszczony w rozdzielaczu. Izolację produktów przeprowadzono analogicznie, jak dla związków **43ab**, a otrzymane surowe produkty oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej.

bursztynian 2-(4-((3-(4-cyano-1*H*-indol-3-yl)-1-etoksy-1-oksypropan-2-yl)amino)-2-metylo-4-oksybutan-2-yl)-3,5-dimetylofenylo-benzylu **49a**

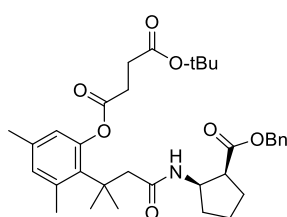


Wychodząc z 310 mg (0,6 mmol) kwasu **48a**, 170 mg (0,66 mmol) pochodnej **11**, 250 mg HBTU (0,66 mmol) oraz 250 μ l (1,86 mmol) DIPEA otrzymano 330 mg (0,52 mmol, 86%) związku **49a** w postaci bezbarwnego oleju w postaci racemicznej.

^1H (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 1,02 (t, J = 7,1 Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 1,32 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 1,33 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 2,10 (s, 3H, CH_3Ar), 2,37 (s, 3H, CH_3Ar), 2,51 (m, 2H, CH_2CON), 2,70 (dt, J = 12,8 Hz, 5,9 Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2$), 3,16 (dd, J = 14,9 Hz, 9,4 Hz, 1H, CH_2CH) 3,33 (dd, J = 14,9 Hz, 9,4 Hz, 1H, CH_2CH), 3,97 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 4,52 (m, 1H, CHCH_2), 5,10 (s, 2H, CH_2Ph), 6,43 (s, 1H, Ar), 6,72 (s, 1H, Ar), 7,20-7,69 (m, 9H, Ph oraz Ar), 8,14 (d, J = 7,4 Hz, 1H, CONH), 11,52 (s, 1H, NH indol);

^{13}C NMR (125MHz, DMSO- d_6): δ = 14,24; 21,25; 25,25; 26,79; 29,05; 29,89; 31,21; 39,06; 47,74; 53,22; 60,75; 66,23; 100,55; 109,62; 117,41; 121,27; 123,15; 125,90; 126,37; 128,16; 128,34; 128,45; 128,84; 132,04; 135,13; 135,41; 136,46; 136,82; 138,01; 149,74; 170,72; 171,8; 172,23; 172,43

bursztynian 2-(4-(((1*R*,2*S*)-2-(benzyloksykarbonylo)cyklopentyl)amino)-2-metylo-4-oksybutan-2-yl)-3,5-dimetylofenylo-*tert*-butylu **49b**



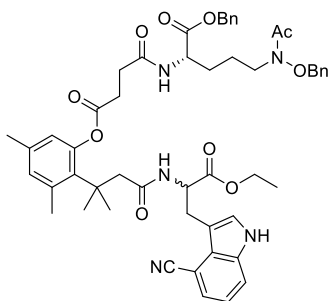
Wychodząc z 230 mg (0,48 mmol) kwasu **48b**, 115 mg (0,53 mmol) pochodnej cispentacyny **12**, 200 mg HBTU (0,53 mmol) oraz 200 μ l (1,49 mmol) DIPEA otrzymano 200 mg (0,36 mmol, 74%) związku **49b** w postaci bezbarwnego oleju.

^1H (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 1,36 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 1,37 (s, 9H, Boc), 1,41 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 1,42-1,92 (m, 6H, 3x CH_2), 2,12 (s, 3H, CH_3Ar), 2,43 (s, 3H, CH_3Ar), 2,37 (m, 1H, CH_2CON), 2,52 (m, 1H, CH_2CON), 2,54 (t, J = 6,5 Hz, 2H, CH_2CO_2), 2,73 (m,

2H, CH_2CO_2), 2,89 (m, 1H, CHCO CP), 4,28 (m, 1H, CHNH CP), 4,88 (AB, $J = 12,6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 6,50 (s, 1H, Ar), 6,75 (s, 1H, Ar), 7,31 (m, 5H, Ph), 7,39 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, CONH);

^{13}C NMR (125MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 20,09; 25,46; 22,04; 26,89; 28,19; 30,12; 30,18; 31,32; 31,68; 39,02; 47,63; 48,8; 52,34; 66,07; 80,56; 123,31; 132,10; 135,20; 135,55; 138,16; 128,38; 128,71; 136,57; 149,89; 171,58; 171,98; 173,19$

N-((2*S*)-5-((*N*-benzyloksy)acetamido)-1-benzyloksy-1-oksyptan-2-ylo)-4-(2-(4-((3-(4-cyano-1*H*-indol-3-ylo)-1-etoksy-1-oksypropan-2-ylo)amino)-2-metylo-4-oksybutan-2-ylo)-3,5-dimetylofenylo)-4-oksybutanamid **50a**



W kolbie kulistej o pojemności 25 ml umieszczono 310 mg (0,49 mmol) związku **49a**, 10 ml metanolu oraz 30 mg katalizatora 10% Pd/C. Przez zawiesinę przepuszczano strumień/ gazowy wódór i mieszaninę pozostawiono na kilka godzin w RT. Następnie zawiesinę przesączono przez celit, osad kilkukrotnie przemyto metanolem, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem.

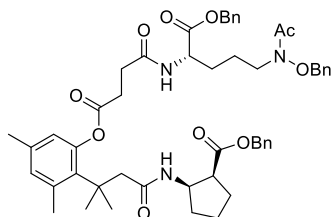
Uzyskaną oleistą pozostałość rozpuszczono w 10 ml bezwodnego DMF i do roztworu dodano 185 mg (0,32 mmol) ω -*N*-acetylo- ω -*N*-hydroksyornityny **23**, 205 mg (0,54 mmol) HBTU oraz 205 μl (1,52 mmol) DIPEA. Mieszaninę pozostawiono w RT przez noc, po czym zawartość kolby wylano na 1M wodny roztwór HCl. Izolację wykonano analogicznie, jak dla związków **43ab**, a otrzymany produkt oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej stosując układ heksan/octan etylu 1/1, v/v jako eluent. Uzyskano 255 mg (0,28 mmol, 58%) związku **50a** w postaci oleju jako mieszaninę diastereoizomerów.

^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 1,02$ (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 1,32 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 1,33 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 1,53-1,71 (m, 4H, CH_2CH_2), 1,97 (s, 3H, CH_3CO), 2,08 (s, 3H, CH_3Ar), 2,36 (s, 3H, CH_3Ar), 2,52 (m, 4H, CH_2CO_2 oraz $\text{CH}_2\text{-CONH}$) 2,71 (m, 2H, CH_2CO_2), 3,16 (dd, $J = 14,8$ Hz, 9,5 Hz, 1H, CH_2CH) 3,33 (m, 1H, CH_2CH), 3,56 (m, 2H, NCH_2), 3,97 (m, 2H, CH_2O), 4,33 (m, 1H, CHCH_2), 4,52 (m, 1H, CHCH_2CH_2), 4,80 (s, 2H, CH_2Ph), 5,08 (s, 2H, NOCH_2Ph), 6,51 (s, 1H, Ar), 6,70 (s, 1H, Ar), 7,21-7,69 (m, 14H, 2xPh oraz Ar), 8,14 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, CONH), 8,43 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, CONH), 11,51 (s, 1H, NH indol);

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 14,46; 20,73; 21,35; 25,22; 23,53; 26,94; 28,63; 29,85; 31,19; 31,14; 31,23; 39,09; 44,01; 47,61; 52,24; 53,2; 60,75; 66,61; 75,74; 100,51; 109,63; 117,41; 119,67; 121,27; 123,28; 125,89; 126,30; 128,12; 128,23;$

128,43; 128,88; 129,09; 129,88; 131,95; 135,18; 135,38; 136,33; 136,82; 137,92;
149,95; 170,74; 171,51; 171,52; 172,1; 172,23; 172,29

N-((2*S*)-5-((*N*-benzyloksy)acetamido)-1-benzyloksy-1-oksyptan-2-ylo)-4-(2-(4-((1*R*,2*S*)-2-((benzyloksy)karbonylo)cyklopentylamino)-2-metylo-4-oksybutan-2-ylo)-3,5-dimetylofenylo)-4-oksybutanamid **50b**

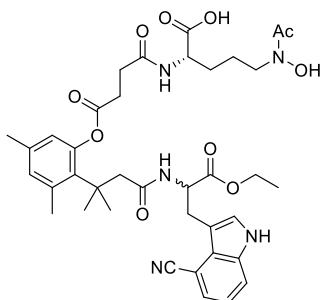


W kolbie kulistej o pojemności 25 ml umieszczono 180 mg (0,32 mmol) związku **49b** oraz 12 ml mieszaniny DCM/TFA 3/1, v/v. Roztwór pozostawiono w RT przez 1h, po czym rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a oleistą pozostałość rozpuszczono w 10 ml DMF. Kolejno dodano 120 mg (0,32 mmol) ω-*N*-acetylo-ω-*N*-hydroksyorнитyny **23**, 133 mg (0,35 mmol) HBTU oraz 133 μl (1 mmol) DIPEA i mieszaninę pozostawiono w RT na noc. Po tym czasie zawartość kolby wylano na 1M wodny roztwór HCl. Izolację wykonano analogicznie, jak dla związków **43ab**, a otrzymane produkty oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej stosując układ heksan/octan etylu 1/1, v/v jako eluent. Uzyskano 180 mg (0,21 mmol, 65%) związku **50b** w postaci oleju.

¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1,35 (s, 3H, (CH₃)₂C), 1,41 (s, 3H, (CH₃)₂C), 1,42-1,92 (m, 10H, 3xCH₂ oraz CH₂CH₂), 1,95 (s, 3H, CH₃CO), 2,1 (s, 3H, CH₃-Ar), 2,35 (s, CH₂-CONH), 2,42 (s, 3H, CH₃-Ar), 2,52 (m, 2H, CH₂CO₂), 2,71 (m, 2H, CH₂CO₂), 2,88 (m, 1H, -CH-CO), 3,56 (m, 2H, NCH₂), 4,27 (m, 1H, CHNH), 4,33 (m, 1H, CHCH₂), 4,8 (s, 2H, CH₂Ph), 4,88 oraz 4,99 (AB, *J* = 8,4 Hz, 2H, CH₂Ph), 5,06 (s, 2H NOCH₂Ph), 6,52 (s, 1H, Ar), 6,72 (s, 1H, Ar), 7,35 (m, 16H, 3xPh oraz CONH), 8,43 (d, *J* = 8,42 Hz, 1H, CONH);

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 20,09; 25,35; 20,5; 23,50; 25,65; 26,76; 28,68; 29,15; 29,88; 30,14; 31,55; 31,4; 39,18; 47,42; 47,56; 47,97; 52,21; 52,37; 65,91; 66,29; 75,75; 116,05; 123,31; 125,79; 128,12; 128,30; 128,33; 128,43; 128,74; 128,83; 128,89; 129,09; 129,87; 131,98; 135,19; 135,39; 136,34; 136,61; 138,03; 149,97; 170,27; 171,38; 171,48; 172,17; 172,3; 173,19

N-((2*S*)-5-((*N*-hydroksy)acetamido)-1-karboksylopentan-2-ylo)-4-(2-(4-((3-(4-cyano-1*H*-indol-3-ylo)-1-etoksy-1-oksypropan-2-ylo)amino)-2-metylo-4-oksybutan-2-ylo)-3,5-dimetylofenylo)-4-oksybutanamid **51a**



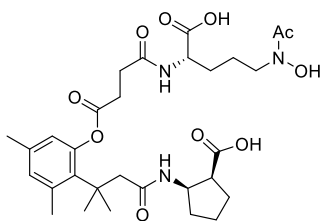
W kolbie kulistej o pojemności 25 ml umieszczono 230 mg (0,26 mmol) związku **50a**, 10 ml metanolu oraz 30 mg katalizatora 10% Pd/C. Przez zawiesinę przepuszczano strumień gazowego wodoru w czasie kilku godzin, po czym zawiesinę przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem przez celit. Osad wielokrotnie przemyto metanolem, a przesącz odparowano do sucha otrzymując 170 mg (0,24 mmol, 91%) związku **51a** w postaci oleju jako mieszaninę diastereoizomerów.

¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1,03 (t, 3H, CH₃CH₂O), 1,32 (s, 3H, (CH₃)₂C), 1,33 (s, 3H, (CH₃)₂C), 1,46-1,85 (m, 4H, CH₂CH₂), 1,94 (s, 3H, CH₃CO), 2,11 (s, 3H, CH₃Ar), 2,37 (s, 3H, CH₃Ar), 2,51 (m, 2H, CH₂CO₂), 2,71 (m, 2H, CH₂CO₂), 3,15 (s, 2H, CH₂CONH), 3,43-3,78 (m, 4H, CH₂CH oraz NCH₂) 3,98 (m, 2H, CH₃CH₂O), 4,14 (m, 1H, CHCH₂), 4,50 (m, 1H, CHCH₂CH₂), 6,50 (s, 1H, Ar TML), 6,70 (s, 1H, Ar TML), 7,19 (t, 1H, Ar), 7,37 (s, 1H, Ar), 7,47 (d, 1H, Ar), 7,7 (d, 1H, Ar), 8,08 (bs, 1H, CONH), 8,16 (d, 1H, CONH), 10,06 (bs, 1H, -OH), 11,62 (s, 1H, NH indol);

¹³C NMR (125MHz, DMSO-*d*₆): δ = 14,87; 20,82; 20,82; 26,29; 24,94; 28,49; 30,74; 31,56; 31,71; 32,56; 32,69; 41,06; 49,03; 54,74; 55,17; 55,2; 62,79; 102,65; 109,26; 116,46; 119,18; 120,69; 122,80; 125,44; 126,29; 127,09; 127,20; 131,87; 133,72; 133,85; 136,08; 136,87; 137,95; 151,65; 173,9; 173,92; 174,25; 172,45; 174,49; 174,69

ESI-MS: obliczono dla C₃₈H₄₇N₅O₁₀ 733,33, znaleziono *m/z* 734,3 [M+H]⁺.

N-((2*S*)-5-((*N*-hydroksy)acetamido)-1-karboksylopentan-2-ylo)-4-(2-(4-((1*R*,2*S*)-2-karboksylocyklopentyloamino)-2-metylo-4-oksybutan-2-ylo)-3,5-dimetylofenylo)-4-oksybutanamid **51b**



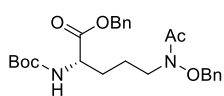
W kolbie kulistej o pojemności 25 ml umieszczono 160 mg (0,19 mmol) związku **50b**, 10 ml metanolu oraz 20 mg katalizatora 10% Pd/C. Przez zawiesinę przepuszczano wodór przez kilku godzin, po czym mieszaninę przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem przez celit. Osad wielokrotnie spłukano metanolem, a przesącz odparowano do sucha otrzymując 110 mg (0,19 mmol, 98%) związku **51b** w postaci oleju. [α]_D²⁰ +7,8 (c0,9, MeOH)

^1H (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 1,26-2,07 (m, 10H, $3\times\text{CH}_2$ oraz CH_2CH_2), 1,51 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 1,63 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 1,98 (s, 3H, CH_3CO), 2,08 (s, 3H, CH_3Ar), 2,20 (s, 3H, CH_3Ar), 2,42 (dd, J = 13,3 Hz, 5,4 Hz, 1H, CH_2CONH), 2,6-3,03 (m, 6H, CH_2CONH , $\text{OC-CH}_2\text{CH}_2\text{-CO}$, CHCO), 3,57 (dt, J = 12 Hz, 5,7 Hz, 2H, NCH_2CH_2), 4,14 (m, 1H, CHNH), 4,30 (m, 1H, CHCH_2), 6,64 (s, 1H, Ar), 6,83 (s, 1H, Ar);

^{13}C NMR (125MHz, DMSO- d_6): δ = 18,85; 21,57; 24,4; 21,88; 22,87; 27,70; 29,30; 30,03; 31,06; 31,19; 31,5; 39,57; 48,99; 52,21; 54,61; 61,35; 66,44; 122,95; 132,03; 133,47; 135,95; 137,91; 150,07; 171,92; 172,12; 172,52; 172,69; 177,76

ESI-MS: obliczono dla $\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_{10}$ 605,29, znaleziono m/z 606,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

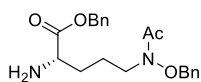
(S)- ω -N-acetylo- ω -N-benzyloksy- α -N-*tert*-butoksykarbonyloornitynian benzylu 52



W kolbie kulistej o pojemności 25 ml umieszczono 250 mg (0,42 mmol) ω -N-acetylo- ω -N-benzyloksy- α -N-*tert*-butoksykarbonylo-L-ornityny **23** rozpuszczonej w 20 ml mieszaniny woda/1,4-dioksan 1/1, v/v oraz 180 mg (2,2 mmol) NaHCO_3 . Następnie wkroplono 150 μl (1,3 mmol) chlorku benzylu i reakcję pozostawiono w RT przez noc. Po tym czasie 1,4-dioksan odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a do pozostałości dodano wodny roztwór 1M HCl doprowadzając pH do ok. 2. Zawartość kolby przeniesiono do rozdzielacza i ekstrahowano octanem etylu (4x30 ml). Połączone warstwy organiczne przemyto dwukrotnie solanką (2x50 ml), osuszono nad bezwodnym MgSO_4 , środek suszący oddzielono, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskany surowy produkt oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej stosując układ heksan/octan etylu 4/1, v/v jako eluent. Otrzymano 150 mg (0,32 mmol, 76%) produktu w postaci oleju.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 1,34 (s, 9H, Boc), 1,52–1,65 (m, 4H, CHCH_2CH_2), 1,96 (s, 3H, CH_3CO), 3,56 (m, 2H, CH_2N), 4,00 (m, 1H, CHCH_2), 4,83 (s, 2H, CH_2Ph), 5,10 (s, 2H, CH_2Ph), 7,27-7,43 (m, 10H, $2\times\text{Ph}$)

(2S)- ω -N-acetylo- ω -N-benzyloksyornitynian benzylu 53

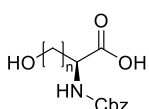


W kolbie kulistej o pojemności 15 ml umieszczono 150 mg (0,32 mmol) estru benzyłowego ornityny **52** oraz 16 ml mieszaniny DCM/TFA 3/2, v/v. Reakcję pozostawiono w RT na 1h, po czym rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt rozpuszczono w 50 ml octanu etylu i przeniesiono do rozdzielacza. Warstwę organiczną przemyto nasyconym wodnym roztworem NaHCO_3 (2x50 ml) oraz solanką (1x40 ml), osuszono nad bezwodnym MgSO_4 , środek suszący oddzielono, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano 118 mg (0,32 mmol, 100%) produktu w postaci bezbarwnego oleju.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 1,56–1,64 (m, 4H, CHCH_2CH_2), 2,05 (s, 3H, CH_3CO), 3,64 (m, 2H, CH_2N), 4,11 (m, 1H, CHCH_2), 5,02 (s, 2H, CH_2Ph), 5,16 (s, 2H, CH_2Ph), 7,27–7,43 (m, 10H, 2xPh),

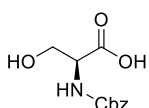
5.2.10 Synteza potencjalnych inhibitorów enzymatycznych szlaku biosyntezy L-metioniny

Związki **59ab** – przepis ogólny



W kolbie kulistej o pojemności 250 ml umieszczono 1 eq aminokwasu, 100 ml mieszaniny woda/1,4-dioksan 1/1, v/v, 4 eq NaHCO_3 oraz 1,2 eq chloromrówczanu benzylu. Reakcję pozostawiono w RT przez noc, po czym zawartość kolby przeniesiono do rozdzielacza i przemyto dwoma porcjami octanu etylu (2x20 ml). Do warstwy wodnej dodano 1M wodny roztwór HCl doprowadzając pH do ok. 2 i ekstrahowano octanem etylu (4x30 ml). Połączone warstwy organiczne przemyto solanką (30 ml), osuszono nad bezwodnym MgSO_4 , środek suszący oddzielno, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskany produkt wykorzystano w następnym etapie bez dodatkowego oczyszczania.

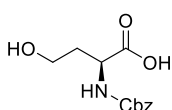
N-benzylloksykarbonylo-L-seryna **59a**



Wychodząc z 1g (9,5 mmol) L-seryny, 3,2 g (38,1 mmol) NaHCO_3 oraz 1,6 ml (11,4 mmol) chloromrówczanu benzylu uzyskano 2 g (8,5 mmol, 89%) Cbz-seryny **59a** w postaci białego proszku o tt 117-120°C (lit.¹⁹³ tt 118-119°C).

^1H (500 MHz, CDCl_3): δ = 2,29 (t, 1H, OH), 3,96 (m, 1H, CH_2), 4,04 (m, 1H, CH_2), 4,51 (m, 1H, CH), 5,14 (s, 2H, CH_2Ph), 5,78 (d, 1H, NH), 7,37 (m, 5H, Ph)

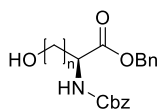
N-benzylloksykarbonylo-L-homoseryna **59b**



Wychodząc z 1g (8,4 mmol) L-homoseryny, 2,8 g (33,6 mmol) NaHCO_3 oraz 1,4 ml (10,1 mmol) chloromrówczanu benzylu uzyskano 1,8 g (7,3 mmol, 87%) Cbz-homoseryny **59b**.

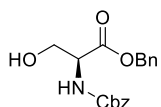
^1H (500 MHz, CDCl_3): δ = 1,74 (t, 1H, OH), 2,19 (m, 2H, CH_2), 3,66 (m, 1H, CH_2), 3,72 (m, 1H, CH_2), 4,62 (m, 1H, CH), 5,18 (s, 2H, CH_2Ph), 5,72 (d, 1H, NH), 7,38 (m, 5H, Ph)

Związki **60ab** – przepis ogólny



W kolbie kulistej o pojemności 250 ml umieszczono 1 eq aminokwasu, 100 ml etanolu oraz 0,5 eq CsCO₃. Mieszaninę pozostawiono na 1h w RT, po czym rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w 100 ml bezwodnego DMF i dodano 1,5 eq bromku benzylu. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono stale mieszaną w RT przez noc stale mieszając, po czym zawartość kolby rozcieńczono 50 ml wody i ekstrahowano octanem etylu (3x40 ml). Połączone ekstrakty organiczne przemyto wodą (2x30 ml), solanką (30 ml), wysuszono nad bezwodnym NaSO₄, środek suszący odrzucono, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskane produkty oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej stosując heksan/octan etylu 5/1, v/v, jako eluent.

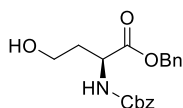
N-benzyloksykarbonylo-L-serynian benzylu **60a**



Wychodząc z 2 g (8,5 mmol) Cbz-L-seryny, 1,4 g (4,3 mmol) węglanu cezu oraz 1,2 ml (10,2 mmol) bromku benzylu otrzymano 1,8 g (5,5 mmol, 65%) estru **60a**.

¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 2,29 (t, 1H, **OH**), 3,95 (m, 1H, **CH**₂), 4,02 (m, 1H, **CH**₂), 4,51 (m, 1H, **CH**), 5,14 (s, 2H, **CH**₂Ph), 5,24 (s, 2H, **CH**₂Ph), 5,78 (d, 1H, **NH**), 7,37 (m, 10H, Ph)

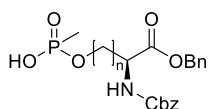
N-benzyloksykarbonylo-L-homoserynian benzylu **60b**



Wychodząc z 1,8 g (7,3 mmol) Cbz-L-homoseryny, 1,2 g (3,7 mmol) węglanu cezu oraz 1,05 ml (8,8 mmol) bromku benzylu otrzymano 1,7 g (5 mmol, 68%) estru **60b**.

¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 1,72 (t, 1H, **OH**), 2,23 (m, 2H, **CH**₂), 3,66 (m, 1H, **CH**₂), 3,72 (m, 1H, **CH**₂), 4,67 (m, 1H, **CH**), 5,15 (s, 2H, **CH**₂Ph), 5,21 (s, 2H, **CH**₂Ph), 5,72 (d, 1H, **NH**), 7,38 (m, 10H, Ph)

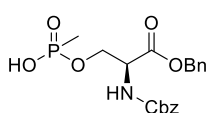
Związki **61ab** – przepis ogólny



W kolbie kulistej o pojemności 100 ml umieszczono 26,6 g (0,25 mol) dichlorku metylofosfonowego oraz 40 ml toluenu. Do mieszaniny dodano 2,25 g (0,25 mol) wody w temperaturze nie przekraczającej 60°C w okresie 30 min. Kolejno Następnie roztwór ogrzano do 110°C i pozostawiono w tej temperaturze na przez 4h, po czym przez mieszaninę przepuszczono kilkakrotnie strumień powietrza w celu usunięcia gazowego HCl. Kolejno wprowadzono 0,25 mol związku **60a** lub **60b** i zawartość kolby pozostawiono na przez 2h w temperaturze 100°C.

Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej stosując układ chloroform /metanol/woda 60/10/1, v/v/v jako eluent.

N-benzylksoxykarbonylo-O-(hydroksy(metylo)fosforylo)-L-serynian benzylu 61a



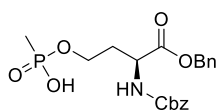
Wychodząc z 1,5 g (4,55 mmol) związku **60a** uzyskano 0,74 g (1,82 mmol, 40%) związku **61a**.

^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,37$ (d, $J = 18,0$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{-P}$), 4,29 (m, 1H, CH_2), 4,42 (m, 1H, CH_2), 4,62 (m, 1H, CH), 5,23 (s, 2H, CH_2Ph), 5,21 (s, 2H, CH_2Ph), 7,36 (m, 10H, 2xPh)

^{31}P (202,4 MHz, CDCl_3): $\delta = 34,25$

ESI-MS: obliczono dla $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{NO}_7\text{P}$ 407,11, znaleziono m/z 408 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-benzylksoxykarbonylo-O-(hydroksy(metylo)fosforylo)-L-homoserynian benzylu 61b



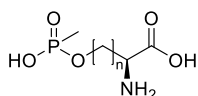
Wychodząc z 1,5 g (4,37 mmol) związku **60a** uzyskano 1 g (2,4 mmol, 55%) związku **61a**.

^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 1,28$ (d, $J = 17,2$ Hz, 3H, CH_3P), 1,91 (m, 1H, CHCH_2), 2,06 (m, 1H, CHCH_2), 3,94 (m, 2H, CH_2O), 4,24 (m, 1H, CH), 5,03 (ab, 2H, CH_2Ph), 5,13 (s, 2H, CH_2Ph), 7,33 (m, 10H, 2xPh), 7,85 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, NH)

^{31}P (202,4 MHz, CDCl_3): $\delta = 27,73$

ESI-MS: obliczono dla $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{NO}_7\text{P}$ 421,13, znaleziono m/z 422 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

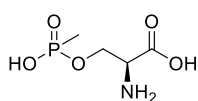
Związki 54 i 55 – przepis ogólny



W kolbie kulistej o pojemności 50 ml umieszczono 1 eq związku **61a** lub **61b**, 0,05 eq katalizatora 10% Pd/C oraz 20 ml metanolu. Przez roztwór przepuszczano wodór przez 4h,

Po tym czasie zawartość kolby przesączono przez celit, osad odrzucono, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem.

O-(hydroksy(metylo)fosforylo)-L-seryna **54**



Wychodząc z 0,7 g (1,72 mmol) związku **61a** uzyskano 315 mg (1,72 mmol) związku **54**.

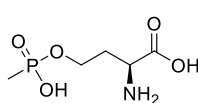
^1H (500 MHz, D_2O): δ = 1,18 (d, J = 17,4 Hz, 3H, CH_3P), 4,08 (m, 1H, CH_2), 4,11 (t, 1H, CH), 4,21 (m, 1H, CH_2)

^{13}C (125 MHz, D_2O): δ = 10,13, 11,22, 54,88, 62,35, 171,46

^{31}P (202,4 MHz, D_2O): δ = 27,48

ESI-MS: obliczono dla $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{NO}_5\text{P}$ 183,03, znaleziono m/z 184 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

O-(hydroksy(metylo)fosforylo)-L-homoseryna **55**



Wychodząc z 0,9 g (2,14 mmol) związku **61b** uzyskano 420 mg (2,14 mmol) związku **55**.

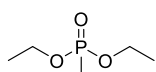
^1H (500 MHz, D_2O): δ = 1,19 (d, J = 16,6 Hz, 3H, CH_3P), 2,08 (m, 1H, CH_2), 2,21 (m, 1H, CH_2), 3,94 (m, 2H, CH_2O), 4,07 (m, 1H, CH)

^{13}C (125 MHz, D_2O): δ = 10,14, 30,45, 11,23, 50,96, 60,26, 171,92

^{31}P (202,4 MHz, D_2O): δ = 28,51

ESI-MS: obliczono dla $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{NO}_5\text{P}$ 197,05, znaleziono m/z 198 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

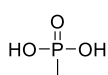
Metylofosfonian dietylu **62**



Do kolby kulistej o pojemności 50 ml wprowadzono 1 ml (5,88 mmol) fosforynu trietylowego oraz 370 μl (5,94 mmol) jodometanu. Zawartość kolby ogrzano do 100°C i w tej temperaturze pozostawiono przez 2h. Następnie mieszaninę poreakcyjną odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem uzyskując 715 mg (4,7 mmol, 80%) produktu w postaci białego osadu.

^1H (500 MHz, CDCl_3): δ = 1,19 (m, 6H, CH_3), 1,29 (d, J = 17,1 Hz, 3H CH_3P), 3,92 (m, 4H, CH_2)

Kwas metylofosfonowy **63**



Do kolby kulistej o pojemności 50 ml dodano 700 mg (4,6 mmol) metylofosfonianu dietylowego **62** oraz 20 ml 1M wodnego roztworu HCl. Mieszaninę ogrzano do 150°C i w tej temperaturze prowadzono reakcję przez 24h. Po tym czasie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość ogrzano do temperatury 100°C i pozostawiono na kilka

godzin w tej temperaturze do całkowitego odparowania pozostałej wody i zanieczyszczeń. Uzyskano 340 mg (3,54 mmol, 77%) produktu w postaci białego osadu.

^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,23$ (d, $J = 17,1$ Hz, 3H, CH_3)

Dichlorek kwasu metylofosfonowego **64**

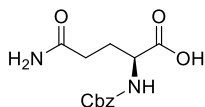


Do kolby kulistej o pojemności 25 ml dodano 650 mg (4,27 mmol) kwasu metylofosfonowego **63**, 15 ml chloroformu oraz katalityczną ilość trietyloaminy (20 μl). Do mieszaniny wprowadzono 600 μl chlorku oksalilu i kolbę ogrzano do 70°C . Mieszaninę reakcyjną pozostawiono aż do zaniku osadu, ok. 6h. Zawartość kolby destylowano pod zmniejszonym ciśnieniem i zbierano frakcję wrzącą w 85°C pod ciśnieniem 47 mmHg.¹⁹⁴ Uzyskano 270 mg (2,04 mmol) oleju zawierającego niewielkie ilości zanieczyszczeń.

^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,56$ (d, $J = 18,1$ Hz, 3H, CH_3)

^{31}P (202,4 MHz, CDCl_3): $\delta = 26,92$

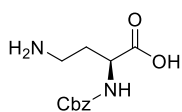
N-benzyloksykarbonylo-L-glutamina **65**



Do kolby kulistej o pojemności 100 ml wprowadzono 5 g (34,2 mmol) L-glutaminy, 40 ml mieszaniny woda/1,4-dioksan 1/1, v/v oraz 5,75 g (68,5 mmol) wodorowęglanu sodu. Do mieszaniny dodano wkroplono 5,8 ml (41 mmol) chloromrówczanu benzylu i reakcję pozostawiono w RT na przez noc. Po tym czasie odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem dioksan, a do pozostałości dodano 1M wodny roztwór HCl do uzyskania przez roztwór pH ok. 2. Zawartość kolby przeniesiono do rozdzielacza i ekstrahowano octanem etylu (3x30 ml), a połączone warstwy organiczne przemyto wodą (20 ml) i solanką (20 ml). Warstwę octanową osuszono nad bezwodnym MgSO_4 , środek suszący oddzielono, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono stosując chromatografię kolumnową w układzie heksan/octan etylu 1/1, v/v, Uzyskano 8,3 g (29,75 mmol, 87%) produktu w postaci ciała stałego o tt $135-137^\circ\text{C}$ (lit.¹⁹⁵ tt 137°C). $[\alpha]_D^{20} -9,1$ (c1, H_2O), lit.¹⁹⁶ $[\alpha]_D^{20} -8,9$ (c1, H_2O).

^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 1,87$ (m, 1H, CH_2), 1,98 (m, 1H, CH_2), 2,18 (m, 2H, CH_2), 4,01 (m, 1H, CH), 5,05 (s, 2H, CH_2Ph), 6,78 (d, 1H, NH), 7,42 (m, 5H, Ph), 7,67 (d, NH_2)

Kwas (S)-2-N-benzylloksykarbonylo-2,4-diaminobutanowy 66a

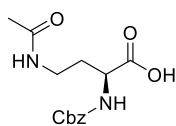


Do kolby kulistej o pojemności 100 ml dodano 5 g (17,85 mmol) L-glutaminy, 10 ml THF, 1,2 ml wody oraz 6,8 g (21,45 mmol) PIDA. Zawiesinę ochłodzono do 4°C i w tej temperaturze prowadzono reakcję przez 8h, po czym rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wyizolowano stosując chromatografię kolumnową w układzie chloroform/metanol/woda 7/4/1, v/v/v. Uzyskano 2 g (7,94 mmol, 44%) czystego produktu w postaci białego osadu o skręcalności $[\alpha]_D^{20}$ -9,6 (c1, H₂O), (lit.¹⁹⁷ $[\alpha]_D^{20}$ -9,6 (c1, H₂O)).

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ = 1,69 (m, 1H, CH₂CH), 1,88 (m, 1H, CH₂CH), 2,82-2,91 (m, 2H, NH₂CH₂), 3,6 (m, 1H, CH₂CH), 4,99 (s, 2H, CH₂Ph), 6,59 (d, 1H, NH), 7,24-7,39 (m, 5H, Ph)

¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 1,84-1,92 (m, 2H, CH₂CH), 1,94 (s, 3H CH₃CO), 3,27 (t, 2H, CH₂NH), 4,2 (m, 1H, CHCH₂), 5,13 (s, 2H, CH₂Ph), 7,36-7,49 (m, 5H, Ph)

Kwas (S)-2-N-benzylloksykarbonylo-4-N-acetylo-2,4-diaminobutanowy 67a

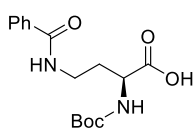


W kolbie kulistej o pojemności 25 ml umieszczono 500 mg (1,98 mmol) związku **66a**, 5 ml pirydyny oraz 188 μl (1,98 mmol) bezwodnika octowego. Reakcję pozostawiono w RT przez noc, po czym do mieszaniny dodano 1M wodny roztwór HCl doprowadzając do pH ok. 2. Zawartość kolby przeniesiono do rozdzielacza i ekstrahowano octanem etylu (3x20 ml). Połączone warstwy organiczne ekstrahowano 5% wodnym roztworem NaHCO₃ (3x20 ml). Połączone warstwy wodne zakwaszono 1M roztworem HCl i ponownie ekstrahowano octanem etylu (3x20 ml). Warstwy octanowe połączone i przemyto solanką (10 ml), osuszono nad bezwodnym MgSO₄, środek suszący oddzielono, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej stosując układ chloroform/metanol/kwas octowy 65/10/1, v/v/v jako eluent. Uzyskano 350 mg (1,18 mmol, 60%) produktu w postaci białego osadu.

¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 1,84-1,92 (m, 2H, CH₂CH), 1,94 (s, 3H CH₃CO), 3,27 (t, 2H, CH₂NH), 4,2 (m, 1H, CHCH₂), 5,13 (s, 2H, CH₂Ph), 7,36-7,49 (m, 5H, Ph)

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 25,87, 30,57, 37,59, 52,52, 69,06, 128,21, 133,43, 136,33, 159,05, 168,41, 175,43

Kwas (*S*)-2-*N*-*tert*-butyloksykarbonylo-4-*N*-benzoilo-2,4-diaminobutanowy
67b

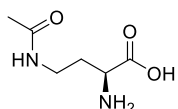


W kolbie kulistej o pojemności 50 ml umieszczono 1 g (4,79 mmol) Boc-chronionego kwasu L-2,4-diaminobutanowego **66b**, 390 mg (9,63 mmol) NaOH oraz 20 ml mieszaniny woda/1,4-dioksan 1/1, v/v. Roztwór ochłodzono do 0°C, a następnie wkraplano 670 µl (5,75 mmol) chlorku benzoilu. Reakcję pozostawiono w RT przez noc, po czym do kolby dodano 1M wodny roztwór HCl doprowadzając pH do 2. Mieszaninę ekstrahowano eterem dietylowym (3x20 ml), a połączone ekstrakty organiczne przemyto solanką (1x20 ml), osuszono nad bezwodnym MgSO₄, środek suszący oddzielono, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej stosując układ heksan/octan etylu/kwas octowy 60/40/1 v/v/v, jako eluent. Otrzymano 1,24 g (4,02 mmol, 84%) produktu w postaci białego proszku.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1,36 (s, 9H, Boc), 1,79 (m, 1H, CH₂CH), 1,97 (m, 1H, CH₂CH), 3,27-3,32 (m, 2H, CH₂NH), 3,97 (m, 1H, CHCH₂), 7,14 (m, 5H, Ph), 12,5 (bs, 1H, COOH)

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 28,64, 30,97, 36,88, 51,89, 78,49, 127,59, 128,65, 131,5, 134,94, 156,00, 166,68, 174,43

kwas (*S*)-4-*N*-acetylo-2,4-diaminobutanowy **56**



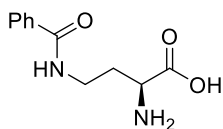
W kolbie kulistej o pojemności 50 ml umieszczono 350 mg (1,19 mmol) związku **67a**, 5 ml THF oraz 10 mg katalizatora 10% Pd/C. Przez zawiesinę przepuszczano wodór i reakcję prowadzono przez 4h. Po tym czasie mieszaninę przesączono przez celit, osad przemyto kilkakrotnie wodą i odrzucono, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano 187 mg (1,17 mmol, 98%) produktu w postaci białego osadu o skręcalności [α]_D²⁰ -10,7 (c1,4, EtOH).

¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 1,96 (s, 3H, CH₃CO), 1,97-2,12 (m, 2H, CH₂CH), 3,22-3,28 (m, 1H, CH₂NH), 3,31-3,37 (m, 1H, CH₂NH), 3,68 (dd, *J* = 7,6 i 5,6 Hz, 1H, CHCH₂)

¹³C NMR (500 Hz, D₂O): δ = 21,6, 30,0, 35,3, 52,3, 174,1, 174,6

ESI-MS: obliczono dla C₆H₁₂N₂O₃ 160,08 znaleziono *m/z* 161 [M+H]⁺.

kwask (S)-4-N-benzoilo-2,4-diaminobutanowy 57



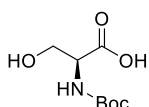
W kolbie kulistej o pojemności 50 ml umieszczono 1 g (3,11 mmol) związku **67b**, 9 ml DCM oraz 3 ml TFA, Zawartość kolby mieszano w RT przez 2h, po czym rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Do pozostałości dodano 0,5 ml DCM oraz 10 ml eteru dietylowego, co skutkowało wypadnięciem białego osadu, który odsączono i kilkakrotnie przemyto eterem dietylowym. Produkt przeprowadzono w formę soli chlorkowej stosując mieszaninę HCl/dioksan. Otrzymano 0,74 g (2,86 mmol, 92%) produktu w postaci białego osadu o skręcalności $[\alpha]_D^{20} +3$ (c1, H₂O).

¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 2,0 (m, 2H, CH₂CH), 3,3 (m, 2H, CH₂NH), 3,87 (t, 1H, CHCH₂), 7,18-7,44 (m, 5H, Ph)

¹³C NMR (500 MHz, DMSO-d₆): 27,74, 30,8, 36,8, 127,68, 129,02, 132,02, 135,03, 166,8, 170,82

ESI-MS *m/z*: obliczono dla C₁₁H₁₄N₂O₃ 222,10 [MH]⁺ znaleziono *m/z* 223 [M+H]⁺.

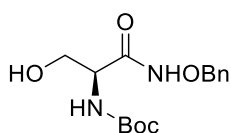
N-tert-butoksykarbonylo-L-seryna 68



W kolbie kulistej o pojemności 250 ml umieszczono 5 g (47,6 mmol) L-seryny, 10,1 g (95,2 mmol) Na₂CO₃ oraz 100 ml mieszaniny woda/1,4-dioksan 1/1, v/v. Kolejno roztwór ochłodzono do 0°C i dodano 15,6 g (71,4 mmol) Boc₂O. Mieszaninę ogrzano do RT i pozostawiono na noc, po czym odparowano dioksan pod zmniejszonym ciśnieniem, a do pozostałości dodano 50 ml wody. Warstwę wodną przemyto eterem dietylowym (2x30 ml) i zakwaszono 1M wodnym roztworem HCl do pH ok. 2. Zawiesinę przeniesiono do rozdzielacza i ekstrahowano octanem etylu (3x40 ml), a połączone warstwy organiczne przemyto wodą (30 ml) i solanką (30 ml), osuszono nad bezwodnym MgSO₄, środek suszący oddzielono, a filtrat odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskano 8,5 g (41,4 mmol, 87%) surowego oleju, który użyto do kolejnej reakcji. $[\alpha]_D^{20} +1,1$ (c1, CH₃OH), lit.¹⁹⁸ $[\alpha]_D^{20} +1,2$ (c1, CH₃OH).

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ = 1,36 (s, 9H, Boc), 3,61 (d, 2H, CH₂), 3,95 (m, 1H, CH), 6,72 (d, 1H, NH)

(S)-N-(N-tert-butoksykarbonylo-serylo)-O-benzylohydroksyloamina 69

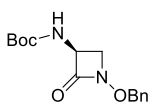


W kolbie kulistej o pojemności 250 ml umieszono 8,5 g (41,4 mmol) Boc-L-seryny rozpuszczonej w 100 ml THF. Do roztworu dodano 15,6 g (98 mmol) chlorowodoru O-benzylohydroksyloaminy rozpuszczonego w 400 ml

wody. Doprowadzono pH roztworu do 4,5 przy użyciu 50% wodnego roztworu NaOH. Następnie dodano w kilku porcjach roztwór 20 g (98 mmol) DCC w 300 ml THF, tak aby otrzymać pH 4,5; w razie potrzeby pH obniżano 6M wodnym roztworem HCl. Reakcję kontynuowano przez 3h stale monitorując pH. Po tym czasie odparowano THF pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość przesączono zbierając osad. Osad zawieszono w 300 ml gorącego octanu etylu, a nierozpuszczony dicykloheksylomocznik odsączono. Octan etylu odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem uzyskując surowy produkt, który oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej stosując octan etylu jako eluent. Produkt krystalizowano z układu heksan/octan etylu uzyskując 9,5 g (30,64 mmol, 74%) związku **67** w postaci białych kryształów o tt 131-133°C (lit.¹⁶⁹ tt 130-131°C); $[\alpha]_D^{20}$ -38,1 (c1, CH₃OH), (lit.¹⁶⁹ $[\alpha]_D^{20}$ -37,7 (c1,94, CH₃OH)).

¹H NMR (500 Hz, CDCl₃): δ = 1,43 (s, 9H, Boc), 3,55 (m, 1H, CH₂), 3,65 (m, 1H, CH₂) 4,46 (m, 2H, CH₂), 4,84 (s, 2H, CH₂Ph), 5,85 (d, 1H, NH), 7,47 (m, 5H, Ph), 7,51 (bs, 1H, NHO)

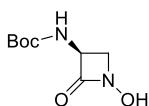
(S)-3-(N-(*tert*-butoksykarbonylo)amino)-1-benzyloksi-azetydyn-2-on **70**



W kolbie kulistej o pojemności 250 ml umieszczono 8 g (25,8 mmol) związku **69** oraz 6,85 g (25,8 mmol) Ph₃P rozpuszczonych w 40 ml THF. Do roztworu wkroplono 4,1 ml (25,8 mmol) DIAD w 50 ml THF. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono w temperaturze 50°C przez 6h. Po tym czasie rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a z pozostałości wyizolowano produkt stosując chromatografię kolumnową w układzie heksan/octan etylu 1/1, v/v. Uzyskano 3,2 g (15,1 mmol, 58%) czystego produktu **69** w postaci oleju. $[\alpha]_D^{20}$ -4 (c1, CH₃OH), lit.¹⁶⁹ $[\alpha]_D^{20}$ -3,9 (c2,65, CH₃OH).

¹H NMR (500 Hz, CDCl₃): δ = 1,48 (s, 9H, Boc), 3,18 (m, 1H, CH₂), 3,28 (m, 1H, CH₂), 4,55 (t, 1H, CH), 5,05 (s, 2H, CH₂Ph), 7,45 (m, 5H, Ph)

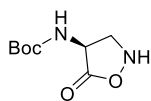
(S)-3-(N-(*tert*-butoksykarbonylo)amino)-1-hydroksy-azetydyn-2-on **71**



W kolbie kulistej o pojemności 50 ml umieszczono 3,15 g (14,86 mmol) związku **70** rozpuszczonego w 10 ml metanolu. Do kolby dodano 10 mg katalizatora 10% Pd/C i przez mieszaninę przepuszczano gazowy wodór. Po 2h zawartość kolby przesączono przez celit, kilkakrotnie przemywając osad metanolem, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano 3 g (14,86 mmol, 100%) produktu w postaci białego osadu o tt 124-128°C, lit.¹⁶⁹ tt 122-124,5°C; $[\alpha]_D^{20}$ -23 (c1, CH₃OH), lit.¹⁶⁹ $[\alpha]_D^{20}$ -21,1 (c1,07, CH₃OH).

$^1\text{H NMR}$ (500 Hz, CDCl_3): $\delta = 1,47$ (s, 9H, Boc), 3,21 (m, 1H, CH_2), 3,32 (m, 1H, CH_2), 4,56 (t, 1H, CH)

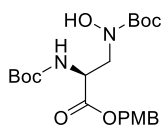
(S)-(4-(*N-tert*-butoksykarbonylo)amino)-1,2-oksazolidyn-5-on **72**



W kolbie kulistej o pojemności 50 ml umieszczono 2,95 g (14,61 mmol) związku **71** rozpuszczonego w 20 ml THF. Do kolby dodano 2,45 g (29,22 mmol) etanotiolanu sodu i reakcję pozostawiono w RT przez 48h. Po tym czasie odparowano rozpuszczalniki pod zmniejszonym ciśnieniem, a z pozostałości izolowano produkt stosując chromatografię kolumnową w układzie heksan/octan etylu 1/1, v/v. Uzyskano 1,92 g (9,5 mmol, 65%) produktu w postaci białego osadu.

$^1\text{H NMR}$ (500 Hz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 1,37$ (s, 9H, Boc), 3,36 (m, 1H, CH_2), 3,62 (m, 1H, CH_2), 4,55 (m, 1H, CH), 7,41 (d, 1H, NHBoc), 8,27 (bs, 1H, NHO)

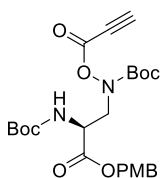
(S)-*N,N'*-di(*tert*-butoksykarbonylo)- ω -*N*-hydroksy-2,3-diaminopropanian 4-metoksybenzylu **73**



W kolbie kulistej o pojemności 50 ml umieszczono 1,9 g (9,4 mmol) związku **71** rozpuszczonego w 20 ml mieszaniny THF/woda 1/1, v/v. Następnie dodano 3,32 g (9,4 mmol) węglanu cezu i mieszaninę reakcyjną pozostawiono w RT przez 4h. Po tym czasie do kolby wprowadzono 2,05 g (9,4 mmol) Boc_2O i reakcję kontynuowano w RT przez 1h, po czym odparowano THF pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość liofilizowano. Uzyskany osad rozpuszczono w 30 ml bezwodnego DMF, dodano katalityczne ilości NaI (20 mg) oraz 1,4 ml (10,34 mmol) chlorku 4-metoksybenzoilu. Mieszaninę reakcyjną ogrzano do temperatury 40°C i pozostawiono w tej temperaturze przez 24h. Po tym czasie zawartość kolby odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a produkt izolowano z mieszaniny na drodze chromatografii kolumnowej stosując układ heksan/octan etylu 2/1, v/v. jako eluent. Uzyskano 0,84 g (1,23 mmol, 20%) czystego produktu w postaci oleju.

$^1\text{H NMR}$ (500 Hz, CDCl_3): $\delta = 1,43$ (s, 9H, Boc), 1,46 (s, 9H, Boc), 2,45 (s, 3H, OCH_3), 3,68 (m, 1H, CH_2), 3,90 (m, 1H, CH_2), 4,64 (m, 1H, CH), 5,16 (s, 2H, CH_2Ph) 5,38 (d, 1H, NHBoc), 7,11-7,73 (m, 4H, Ph)

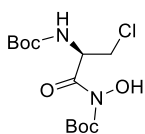
(*S*)-*N,N'*-di(*tert*-butoksykarbonylo)- ω -*N*-propargiloksy-2,3-diaminopropanian
4-metoksybenzylu **74**



W kolbie kulistej o pojemności 50 ml umieszczono 800 mg (1,17 mmol) związku **72** rozpuszczonego w 20 ml DCM. Dodano 82 mg (1,17 mmol) kwasu propargilowego oraz 240 mg (1,17 mmol) DCC. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono w RT przez noc. Po tym czasie odsączono powstały osad dicykloheksylomocznika, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem i zawieszono w octanie etylu, po czym ponownie odsączono osad, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej stosując układ heksan/octan etylu 7/3, v/v, jako eluent. Uzyskano 270 mg (0,55 mmol, 47%) produkt w postaci oleju.

$^1\text{H NMR}$ (500 Hz, CDCl_3): δ = 1,43 (s, 9H, Boc), 1,46 (s, 9H, Boc), 2,45 (s, 3H, OCH_3), 3,7 (m, 1H, CH_2), 3,88 (m, 1H, CH_2), 4,27 (t, 1H, CH), 4,65 (m, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 5,16 (s, 2H, CH_2Ph) 5,39 (d, 1H, NHBoc), 7,11-7,73 (m, 4H, Ph)

(*R*)-*N,N'*-di(*tert*-butoksykarbonylo)- β -chloroalanino-*N'*-hydroksyamid **75**

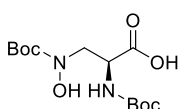


W kolbie kulistej o pojemności 50 ml umieszczono 1 g (4,3 mmol) *N*-*tert*-butoksykarbonylo- β -chloro-*L*-alaniny, 572 mg (4,3 mmol) *N*-*tert*-butoksykarbonylo-hydroksyoaminy oraz 826 mg (4,3 mmol) EDCI rozpuszczone w 50 ml bezwodnego DCM. Reakcję pozostawiono w RT przez 15 h. Po tym czasie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczono w 50 ml octanu etylu i przemyto wodą (2x30 ml), osuszono nad bezwodnym MgSO_4 , środek suszący oddzielono, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano 1,25 g (3,7 mmol, 86 %) produktu w postaci białego osadu.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 1,45 (s, 9H, Boc), 1,49 (s, 9H, Boc), 3,88 (dd, 1H, J = 11,0 Hz, 4,0 Hz, CH_2CH), 4,0 (dd, 1H, J = 11,0 Hz, 4,0 Hz, CH_2CH), 4,87 (m, 1H, CH_2CH), 5,41 (d, 1H, $-\text{NHCO}-$), 7,96 (s, 1H, $-\text{NHO}-$)

$^{13}\text{C NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 27,96, 28,21, 44,75, 53,29, 80,96, 83,87, 154,82, 154,95, 168,93

Kwas (*S*)-*N,N'*-di(*tert*-butoksykarbonylo)- ω -*N*-hydroksy-2,3-diaminopropanowy
76

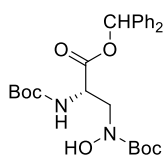


W kolbie kulistej o pojemności 100 ml umieszczono 1,2 g (3,5 mmol) związku **75** rozpuszczonego w 50 ml bezwodnego DMF. Kolbę ochłodzono do 0°C , po czym wprowadzono 140 mg (3,5 mmol, 60% zawiesina w oleju mineralnym) NaH . Mieszaninę reakcyjną

pozostawiono w tej temperaturze na przez 3h, po czym do mieszaniny dodano 685 mg (0,18 mmol) Cs₂CO₃ rozpuszczonego w 10 ml wody i reakcję kontynuowano w RT na przez kolejną godzinę. Po tym czasie zawartość kolby przeniesiono do rozdzielacza i przemyto eterem dietylowym (2x10 ml), a następnie za pomocą 1M wodnego roztworu KHSO₄ doprowadzono pH warstwy wodnej do ok. 2. Otrzymany roztwór ekstrahowano octanem etylu (3x20 ml), po czym połączone ekstrakty organiczne przemywano wodą (3x10 ml), osuszono nad bezwodnym MgSO₄, środek suszący oddzielono, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano 850 mg (2,66 mmol, 76%) żółtego oleju, który użyto w następnym etapie bez dodatkowego oczyszczania.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1,42 (s, 9H, Boc), 1,45 (s, 9H, Boc), 3,75 (dd, 1H, J = 11,0 Hz, 4,0 Hz, CH₂CH), 3,92 (dd, 1H, J = 11,0 Hz, 4,0 Hz, CH₂CH), 4,59 (m, 1H, CH₂CH), 5,49 (d, 1H, -NHCO-)

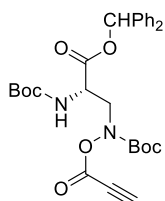
(S)-N,N'-di(*tert*-butoksykarbonylo)-ω-N-hydroksy-2,3-diaminopropanian difenyłometylu **77**



W kolbie kulistej o pojemności 100 ml umieszczono 800 mg (2,5 mmol) związku **76** rozpuszczonego w 10 ml acetonitrylu, a następnie wkrapłano roztwór 485 mg (2,5 mmol) difenyłodiazometanu (przygotowany wg, metody Klimovica)¹⁷⁹ w 30 ml acetonitrylu do momentu stałego fioletowego zabarwienia mieszaniny reakcyjnej. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono w RT przez 3h, po czym wkrapłano kwas octowy do zaniku barwy (kilka kropel). Następnie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a produkt oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej stosując układ heksan/octan etylu 8/2, v/v jako eluent. Otrzymano 850 mg (1,75 mmol, 70%) produktu w postaci oleju.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1,42 (s, 9H, Boc), 1,46 (s, 9H, Boc), 3,75 (m, 1H, CH₂CH), 3,93 (m, 1H, CH₂CH), 4,76 (m, 1H, CH₂CH), 5,40 (d, 1H, -NHCO), 6,93 (s, 1H, CHPh₂), 7,23-7,4 (m, 10H, 2xPh), 8,1 (s, 1H, NOH)

(S)-N,N'-di(*tert*-butoksykarbonylo)-ω-N-propargiloksy-2,3-diaminopropanian difenyłometylu **78**



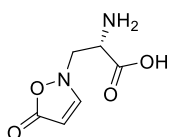
W kolbie kulistej o pojemności 50 ml umieszczono 800 mg (1,64 mmol) związku **77**, 184 mg (2,62 mmol) kwasu propargilowego oraz 15 ml bezwodnego DCM. Do mieszaniny dodano 380 mg (1,97 mmol) EDCI i pozostawiono w RT przez noc. Po tym czasie odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość zawieszono w 10 ml octanu etylu. Powstały osad

dicykloheksylomocznika odsączono, a przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono stosując chromatografię kolumnową w układzie heksan/octan etylu 7/3, v/v. Otrzymano 740 mg (1,38 mmol, 84%) produktu w postaci białego osadu.

^1H NMR (500 MHz, DMSO-d): δ = 1,36 (s, 9H, Boc), 1,37 (s, 9H, Boc), 3,48 (m, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 3,84 (m, 1H, CH_2CH), 4,0 (m, 1H, CH_2CH), 4,36 (m, 1H, CH_2CH), 4,95 (d, 1H, $-\text{NHCO}$), 6,74 (s, 1H, CHPh_2), 7,21,-7,45 (m, 10H, 2xPh)

^{13}C NMR (500 MHz, DMSO-d): δ = 27,95; 28,54; 52,12; 60,12; 72,37; 77,57; 79,01; 83,31; 81,4; 125,7; 128; 21; 128,81,140,49; 140,50; 153,82; 153,99; 155,69; 169,2

(S)- β -(1,2-oksazol-5-on-2-yl)-L-alanina **58**



W kolbie kulistej o pojemności 25 ml umieszczono 700 mg (1,3 mmol) związku **78** oraz 10 ml 98% kwasu mrówkowego. Mieszaninę ogrzano do 35°C i pozostawiono w tej temperaturze przez noc. Po tym czasie odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczono w 15 ml wody, którą przemyto eterem dietylowym (2x5 ml). Warstwę wodną liofilizowano do uzyskania stałego osadu, z którego izolowano produkt stosując metodę preparatywnej TLC w układzie DCM/metanol/woda 7/4/1, v/v/v. Uzyskano 80 mg (0,47 mmol, 36%) czystego produktu w postaci białego osadu.

^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 3,98 (t, 1H, CHCH_2), 4,18 (m, 2H, CHCH_2), 5,15 (d, J = 3,5 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$), 8,12 (d, J = 3,5 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$);

^{13}C NMR (125 MHz, D_2O): δ = 52,82, 53,14, 86,7, 154,15, 171,33, 174,4

ESI-MS: obliczono dla $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4$ 172,05, znaleziono m/z 171,0 $[\text{M}-\text{H}]^+$.

Literatura

- [1] Temkin E, Adler A, Lerner A, Carmeli Y. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: biology, epidemiology, and management. *Ann N Y Acad Sci.* **2014**; 1323: 22-42.
- [2] Patterson TF. Advances and challenges in management of invasive mycoses. *Lancet.* **2005**; 366: 1013-1025.
- [3] Mathew BJ, Nath M. Recent approaches to antifungal therapy for invasive mycoses. *ChemMedChem.* **2009**; 24: 310.
- [4] Pages J-M, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol.* **2008**; 6: 893-903.
- [5] Fernández L, Hancock REW. Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. *Clin Microbiol Rev.* **2013**; 26: 163-163.
- [6] Dietz GP, Bahr M. Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach. *Mol Cell Neurosci.* **2004**; 27: 85-131.
- [7] Skwarecki AS, Nowak M, Milewska M. Synthetic strategies in construction of organic low molecular-weight carrier-drug conjugates. *Bioorg Chem.* **2020**; 104: 104311.
- [8] Skwarecki AS, Nowak MG, Milewska MJ. Synthetic strategies in construction of organic macromolecular carrier-drug conjugates. *Org Biomol Chem.* **2020**; 18: 5764-5783.
- [9] Huang Y, Jiang Y, Wang H, Wang J, Shin MC, Byun Y, He H, Liang Y, Yang VC. Curb challenges of the "Trojan Horse" approach: smart strategies in achieving effective yet safe cell-penetrating peptide-based drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* **2013**; 65: 1299-315.
- [10] Mislin GL, Schalk IJ. Siderophore-Dependent Iron Uptake Systems as Gates for Antibiotic Trojan Horse Strategies against *Pseudomonas Aeruginosa*. *Metallomics.* **2014**; 6: 408-420.
- [11] Santos H, Bimbo L, Peltonen L, Hirvonen J. Inorganic nanoparticles in targeted drug delivery and imaging. *W Targeted Drug Delivery: Concepts and Design*, ed. Devarajan PV, Jain S. Springer International Publishing AG, 2014, 571-613

- [12] Saravanakumar K, Hu X, Ali DM, Wang M-H. Emerging strategies in stimuli-responsive nanocarriers as the drug delivery system for enhanced cancer therapy. *Curr Pharm Des.* **2019**; 25: 2609–2625.
- [13] Majumder J, Taratula O, Minko T. Nanocarrier-based systems for targeted and site specific therapeutic delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* **2019**; 144: 57–77.
- [14] Chen S, Hao X, Liang X, Zhang Q, Zhang C, Zhou G, Shen S, Jia G, Zhang J. Inorganic nanomaterials as carriers for drug delivery. *J Biomed Nanotechnol.* **2016**; 12: 1–27.
- [15] Paul W, Sharma CP. Inorganic nanoparticles for targeted drug delivery. W *Biointegration of Medical Implant Materials.* ed. Sharma CP. Woodhead Publishing, 2020, 333–373.
- [16] Jana P, Dev A. Carbon quantum dots: A promising nanocarrier for bioimaging and drug delivery in cancer. *Mater Today Commun.* **2022**; 32: 104068.
- [17] Mallakpour S, Soltanian S. Surface functionalization of carbon nanotubes: fabrication and applications, *RSC Adv.* **2016**; 6: 109916–109935.
- [18] Jha R, Singh A, Sharma P, Fuloria NK. Smart carbon nanotubes for drug delivery system: a comprehensive study. *J Drug Delivery Sci Technol.* **2020**; 58: 101811.
- [19] Prajapati SK, Malaiya A, Kesharwani P, Soni D, Jain A. Biomedical applications and toxicities of carbon nanotubes. *Drug Chem Toxicol.* **2019**; 234: 298–319.
- [20] Basheer BV, George JJ, Siengchin S, Parameswaranpillai J. Polymer grafted carbon nanotubes – synthesis, properties, and applications: a review. *Nano-Struct. Nano-Objects* **2020**; 22: 10042.
- [21] Paliwal R, Paliwal SR, Kenwat R, Kurmi B, Sahu MK. Solid lipid nanoparticles: a review on recent perspectives and patents. *Expert Opin Ther Pat.* **2020**; 30: 179-194.
- [22] Hathout RM, Gad HA, Abdel-Hafez SM, Nasser N, Khalil N, Ateyya T, Amr A, Yasser N, Nasr S, Metwally AA. Gelatinized core liposomes: A new Trojan horse for the development of a novel timolol maleate glaucoma medication. *Int J Pharm.* **2019**; 556: 192-199.
- [23] Chirag M, Gowda DV, Babu S, Famna Roohi NK. A comprehensive review on dendrimers in current advanced drug delivery. *Int J Res Pharm Sci.* **2020**; 11: 1055–1066.

- [24] Sandoval-Yanez C, Rodriguez CC. Dendrimers: amazing platforms for bioactive molecule delivery systems. *Materials (Basel)* **2020**; 13: 570.
- [25] Santos A, Veiga F, Figueiras A. Dendrimers as pharmaceutical excipients: synthesis, properties, toxicity and biomedical applications. *Materials (Basel)* **2020**; 13: 65.
- [26] Skwarecki AS, Milewski S, Schielmann M, Milewska MJ. Antimicrobial molecular nanocarrier-drug conjugates. *Nanomedicine*. **2016**; 12: 2215-2240.
- [27] Pooga M, Langel U. Classes of cell-penetrating peptides. *Methods Mol Biol*. **2015**; 1324: 3-28.
- [28] Neilands JB. Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem*. **1995**; 270: 26723-26726.
- [29] Möllmann U, Heinisch L, Bauernfeind A, Köhler T, Ankel-Fuchs D. Siderophores as drug delivery agents: Application of the “Trojan Horse” strategy. *Biometals*. **2009**; 22: 615-624.
- [30] Ge D, Wu D, Wang Z, Shi W, Wu T, Zhang A, Hong A, Wang J, Zhang Y, Ren L. Cellular Uptake Mechanism of Molecular Umbrella. *Bioconjug Chem*. **2009**; 20: 2311-2316.
- [31] Janout V, Regen SL. Bioconjugate-Based Molecular Umbrellas. *Bioconjug Chem*. **2009**; 20: 183-192.
- [32] Hider RC, Kong X. Chemistry and biology of siderophores, *Nat Prod Rep*. **2010**; 27: 637-657.
- [33] Gallo M, Defaus S, Andreu D. 1988–2018: Thirty years of drug smuggling at the nano scale. Challenges and opportunities of cell-penetrating peptides in biomedical research. *Arch Biochem Biophys*. **2019**; 661: 74-86.
- [34] Haas H. Fungal siderophore metabolism with a focus on *Aspergillus fumigatus*. *Nat Prod Rep*. **2014**; 31: 1266-1276.
- [35] Raymond KN, Allred BE, Sia AK. Coordination Chemistry of Microbial Iron Transport. *Acc Chem Res*. **2015**; 48: 2496-2505.
- [36] Boukhalfa H, Crumbliss AL. Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *Biometals*. **2002**; 15: 325-339.
- [37] Sah S, Singh R. Siderophore: Structural and Functional Characterisation – A Comprehensive Review. *Agriculture*. **2015**; 61: 97-114.

- [38] Griffiths GL, Sigel SP, Payne SM, Neilands JB. Vibriobactin, a siderophore from *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem*. **1984**; 259: 383-385.
- [39] Luo M, Lin H, Fischbach MA, Liu DR, Walsh CT, Groves JT. Enzymatic tailoring of enterobactin alters membrane partitioning and iron acquisition. *ACS Chem Biol*. **2006**; 1: 29-32.
- [40] Hotta K, Kim C-Y, Fox DT, Koppish AT. Siderophore-mediated iron acquisition in *Bacillus anthracis* and related strains, *Microbiology*, **2010**, 156, 1918-1925.
- [41] Capon RJ, Stewart M, Ratnayake R, Lacey E, Gill JH. Citromycetins and bilains A-C: new aromatic polyketides and diketopiperazines from Australian marine-derived and terrestrial *Penicillium* spp, *J Nat Prod*. **2007**; 70: 1746-1752.
- [42] Drechsel H, Jung G, Winkelmann, G. Stereochemical characterization of rhizoferrin and identification of its dehydration products. *Biometals*. **1992**; 5: 141-148.
- [43] Munzinger M, Tarkaz K, Budzikiewicz H. *S,S*-rhizoferrin (enantiomer of rhizoferrin) – a siderophore of *Ralstonia (Pseudomonas) pickettii* DSM6297 – the optical antipode of *R,R*-rhizoferrin isolated from fungi. *Biometals* **1999**; 12: 189-193.
- [44] Lawlor MS, O'Connor C, Miller VL. Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection. *Infect Immun*. **2007**; 75: 1463-1472.
- [45] Zscherp R, Coetzee J, Vornweg J, Grunenberg J, Herrmann J, Müller R, Klahn P. Biomimetic enterobactin analogue mediates iron-uptake and cargo transport into *E. coli* and *P. aeruginosa*. *Chem Sci*. **2021**; 12: 10179-10190.
- [46] Hider RC. Siderophore Mediated Absorption of Iron. *Struct Bonding*. **1984**; 58: 25-87
- [47] Carrano CJ, Drechsel H, Kaiser D, Jung G, Matzanke B, Winkelmann G, Rochel N, Albrecht-Gary AM. Coordination Chemistry of the Carboxylate Type Siderophore Rhizoferrin: The Iron(III) Complex and Its Metal Analogs. *Inorg Chem*. **1996**; 35: 6429-6436.
- [48] Carrano CJ, Raymond KN. Synthesis and characterization of iron complexes of rhodotorulic acid: a novel dihydroxamate siderophore and potential chelating drug. *JCS Chem Comm*. **1978**; 12: 501-502.

- [49] Grinter R, Lithgow T. Determination of the molecular basis for coprogen import by Gram-negative bacteria. *IUCrj*. **2019**; 6: 401-411.
- [50] Stefaniak J, Nowak MG, Skwarecki AS. Rhodotorulic Acid and its Derivatives: Synthesis, Properties, and Applications. *Curr Med Chem*. **2024**; 31: 6614-6629.
- [51] Das A, Prasad R, Srivatsava A, Giang PH, Bhatnagar K, Varma A. Fungal Siderophores: Structure, Functions and Regulation, W *Microbial Siderophores. Soil Biology*. ed. Varma A, Chincholkar SB. Springer, 2007; 12: 1-42.
- [52] Matzanke BF. Iron Storage in Fungi. W *Metal ions in fungi*, CRC Press, 1994; 11: 179-214.
- [53] Carrano CJ, Raymond KN. Coordination chemistry of microbial iron transport compounds: rhodotorulic acid and iron uptake in *Rhodotorula pilimanae*. *J Bacteriol*. **1978**; 136: 69-74.
- [54] Hantke K. Election procedure for deregulated iron transport mutants (*fur*) in *Escherichia coli* K 12: *fur* not only affects iron metabolism. *Mol Gen Genet*. **1983**; 191: 301-306.
- [55] Winkelmann G. Handbook of microbial iron chelates. CRC Press, 1991; 65-105.
- [56] Choi S, Kronstad JW, Jung WH. Siderophore Biosynthesis and Transport Systems in Model and Pathogenic Fungi. *J Microbiol Biotechnol*. **2024**; 34: 1551-1562.
- [57] Heymann P, Ernst JF, Winkelmann G. Identification and substrate specificity of a ferrichrome-type siderophore transporter (Arn1p) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett*. **2000**; 186: 221-227.
- [58] Heymann P, Ernst JF, Winkelmann G. Identification of a fungal triacetylfusarinine C siderophore transport gene (TAF1) in *Saccharomyces cerevisiae* as a member of the major facilitator superfamily. *Biometals*. **1999**; 12: 301-306.
- [59] Lesuisse E, Simon-Casteras M, Labbe P. Siderophore-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: the SIT1 gene encodes a ferrioxamine B permease that belongs to the major facilitator superfamily. *Microbiology (Reading)* **1998**; 14412: 3455-3462.

- [60] Heymann P, Ernst JF, Winkelmann G. A gene of the major facilitator superfamily encodes a transporter for enterobactin (Enb1p) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biometals*. **2000**; 13: 65-72.
- [61] Pelletier B, Beaudoin J, Philpott CC, Labbé S. Fep1 represses expression of the fission yeast siderophore-iron transport system. *Nucleic Acids Res*. **2003**; 31: 4332-4344.
- [62] Hu CJ, Bai C, Zheng XD, Wang YM, Wang Y. Characterization and functional analysis of the siderophore-iron transporter CaArn1p in *Candida albicans*. *J Biol Chem*. **2002**; 277: 30598-30605.
- [63] Kim Y, Yun CW, Philpott CC. Ferrichrome induces endosome to plasma membrane cycling of the ferrichrome transporter, Arn1p, in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. **2002**; 21: 3632-3642.
- [64] Nilius AM, Farmer SG. Identification of extracellular siderophores of pathogenic strains of *Aspergillus fumigatus*. *J Med Vet Mycol*. **1990**; 28: 395-403.
- [65] Heymann P, Gerads M, Schaller M, Dromer F, Winkelmann G, Ernst JF. The siderophore iron transporter of *Candida albicans* (Sit1p/Arn1p) mediates uptake of ferrichrome-type siderophores and is required for epithelial invasion. *Infect Immun*. **2002**; 70: 5246-5255.
- [66] Lesuisse E, Knight SA, Camadro JM, Dancis A. Siderophore uptake by *Candida albicans*: effect of serum treatment and comparison with *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **2002**; 19: 329-340.
- [67] Nevitt T, Thiele DJ. Host iron withholding demands siderophore utilization for *Candida glabrata* to survive macrophage killing. *PLoS Pathog*. **2011**; 7: e1001322.
- [68] Krewulak KD, Peacock RS, Vogel HJ. Periplasmic binding proteins involved in bacterial iron uptake. W *Ion Transport in Bacteria*. ed. Crosa H, Mey AR, Payne SM. ASM Press, 2004; 113-132.
- [69] Locher KP, Rees B, Koebnik R, Mitschler A, Moulinier L, Rosenbusch JP, Moras D. Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA receptor: crystal structures of free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes. *Cell*. **1998**; 95: 771-778.
- [70] van der Helm D. Structure of Outer Membrane Receptor Proteins. W *Iron Transport in Bacteria*. ed. Crosa H, Mey AR, Payne SM. ASM Press, 2004; 49-65.

- [71] Braun V, Braun M, Killmann H. Ferrichrome- and Citrate-Mediated Iron Transport. *W Iron Transport in Bacteria*. ed. Crosa H, Mey AR, Payne SM. ASM Press, 2004; 158-177.
- [72] Noinaj N, Guillier M, Barnard TJ, Buchanan SK. TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annu Rev Microbiol.* **2010**; 64: 43-60.
- [73] Braun V, Günthner K, Hantke K, Zimmermann L. Intracellular activation of albomycin in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* **1983**; 156: 308-315.
- [74] Wencewicz TA, Mollmann U, Long TE, Miller MJ. Is drug release necessary for antimicrobial activity of siderophore-drug conjugates? Syntheses and biological studies of the naturally occurring salmycin “Trojan Horse” antibiotics and synthetic desferridanoxamine-antibiotic conjugates. *Biometals* **2009**; 22: 633-648.
- [75] Kong H, Cheng W, Wei H, Yuan Y, Yang Z, Zhang X. An overview of recent progress in siderophore-antibiotic conjugates. *Eur J Med Chem.* **2019**. 182: 111615.
- [76] Vértesy L, Aretz W, Fehlhaber H-W, Kogler H. Salmycin A-D, Antibiotika aus *Streptomyces violaceus*, DSM 8286, mit Siderophor-Aminoglycosid-Struktur. *Helv Chim Acta.* **1995**; 78: 46-60.
- [77] Wencewicz A, Long TE, Mollmann U, Miller MJ. Trihydroxamate Siderophore–Fluoroquinolone Conjugates Are Selective Sideromycin Antibiotics that Target *Staphylococcus aureus*. *Bioconjug Chem.* **2013**; 24: 473-486.
- [78] Ghosh M, Miller MJ. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Isocyanuratebased Antifungal and Macrolide Antibiotic Conjugates: Iron Transport-mediated Drug Delivery. *Bioorg Med Chem.* **1995**; 3: 1519-1525.
- [79] Zheng T, Bullock JL, Nolan EM. Siderophore-mediated cargo delivery to the cytoplasm of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*: syntheses of monofunctionalized enterobactin scaffolds and evaluation of enterobactincargo conjugate uptake. *J Am Chem Soc.* **2012**; 134: 18388-18400.
- [80] Lin H, Fischbach MA, Liu DR, Walsh CT. *In vitro* characterization of salmochelins and enterobactin trilactone hydrolases IroD, IroE, and fes. *J Am Chem Soc.* **2005**; 127: 11075-11084.

- [81] Zheng T, Nolan EM. Enterobactin-Mediated Delivery of β -Lactam Antibiotics Enhances Antibacterial Activity against Pathogenic *Escherichia coli*. *J Am Chem Soc.* **2014**; 136: 9677-9691
- [82] Chairatana P, Zheng T, Nolan EM. Targeting virulence: salmochelin modification tunes the antibacterial activity spectrum of β -lactams for pathogenselective killing of *Escherichia coli*. *Chem Sci.* **2015**; 6: 4458-4471
- [83] Raymond KN, Dertz EA, Kim SS. Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **2003**; 10: 3584-3588.
- [84] Ji C, Miller PA, Miller MJ. Iron Transport-Mediated Drug Delivery: Practical Syntheses and *In Vitro* Antibacterial Studies of Tris-Catecholate Siderophore- Aminopenicillin Conjugates Reveals Selectively Potent Antipseudomonal Activity. *J Am Chem Soc.* **2012**; 134: 9898-9901.
- [85] Fardeau S, Dassonville-Klimpt A, Audic N, Sasaki A, Pillon M, Baudrin E, Mullie C, Sonnet P. Synthesis and antibacterial activity of catecholate-ciprofloxacin conjugates. *Bioorg Med Chem.* **2014**; 22: 4049-4060.
- [86] Tengfei Z, Nolan EM. Evaluation of (acyloxy)alkyl ester linkers for antibiotic release from siderophore-antibiotic conjugates. *Bioorg Med Chem Lett.* **2015**; 25: 4987-4991.
- [87] Liu R, Miller PA, Vakulenko SB, Stewart NK, Boggess WC, Miller MJ. A synthetic dual drug sideromycin induces Gram-negative bacteria to commit suicide with a Gram-positive antibiotic. *J Med Chem.* **2018**; 61: 3845-3854.
- [88] Katsube T, Echols R, Ferreira JCA, Krenz HK, Berg JK, Galloway C. Cefiderocol, a Siderophore Cephalosporin for Gram-Negative Bacterial Infections: Pharmacokinetics and Safety in Subjects with Renal Impairment. *J Clin Pharmacol.* **2017**; 57: 584-591.
- [89] Milner SJ, Snelling AM, Kerr KG, Abd-El-Aziz A, Thomas GH, Hubbard RE, Routledge A, Duhme-Klair A-K. Probing linker design in citric acid-ciprofloxacin conjugates. *Bioorg Med Chem.* **2014**; 22: 4499-4505.
- [90] Milner SJ, Seve A, Snelling AM, Thomas GH, Kerr KG, Routledge A, Duhme-Klair A-K. Staphyloferrin A as siderophore-component in fluoroquinolone-based Trojan horse antibiotics. *Org Biomol Chem.* **2013**; 11: 3461-3468.
- [91] Okoh OA, Klahn P. Trimethyl Lock - A Multifunctional Molecular Tool for Drug Delivery, Cellular Imaging and Stimuli-responsive Materials. *ChemBioChem.* **2018**; 19: 1668-1694

- [92] Dias GG, King A, de Moliner F, Vendrell M, da Silva Júnior EN. Quinone-based fluorophores for imaging biological processes. *Chem Soc Rev.* **2018**; 47: 12–27.
- [93] Levine MN, Raines RT. Trimethyl lock: a trigger for molecular release in chemistry, biology, and pharmacology. *Chem Sci.* **2012**; 3: 2412–2420.
- [94] Milstien S, Cohen LA. Stereopopulation control. I. Rate enhancement in the lactonizations of 0-hydroxyhydrocinnamic acids. *J Am Chem Soc.* **1972**; 94: 9158–9165.
- [95] Wang B, Nicolaou MG, Liu S, Borchardt RT. Structural Analysis of a Facile Lactonization System Facilitated by a “Trimethyl Lock”. *Bioorg Chem.* **1996**; 24, 39–49.
- [96] Wang B, Gangwar S, Pauletti GM, Siahaan TJ, Borchardt RT. Synthesis of a Novel Esterase-Sensitive Cyclic Prodrug System for Peptides That Utilizes a “Trimethyl Lock”-Facilitated Lactonization Reaction. *J Org Chem.* **1997**; 62: 1363–1367.
- [97] Ji C, Miller MJ. Chemical syntheses and in vitro antibacterial activity of two desferrioxamine B-ciprofloxacin conjugates with potential esterase and phosphatase triggered drug release linkers. *Bioorg Med Chem.* **2012**; 20: 3828–3836.
- [98] Zheng Y, Yu B, Ji K, Pan Z, Chittavong V, Wang B. Esterase-Sensitive Prodrugs with Tunable Release Rates and Direct Generation of Hydrogen Sulfide. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2016**; 55: 4514–4518.
- [99] Stella VJ, Nti-Addae KW. Prodrug strategies to overcome poor water solubility. *Adv Drug Deliv Rev.* **2007**; 59: 677–694.
- [100] Jana S, Mandlekar S, Marathe P. Prodrug Design to Improve Pharmacokinetic and Drug Delivery Properties: Challenges to the Discovery Scientists. *Curr Med Chem.* **2010**; 17: 3874– 3908.
- [101] Zawilska JB, Wojcieszak J, Olejniczak AB. Prodrugs: a challenge for the drug development. *Pharmacol Rep.* **2013**; 65: 1–14.
- [102] Vyas DM, Ueda Y, Wong H, Matiskella JD, Hauck S, Mikkilineni AB, Farina V, Rose WC, Casazza AM. Phosphatase-Activated Prodrugs of Paclitaxel. W *Taxane Anticancer Agents. ACS Symp Ser.* **1994**; 583: 124–137.
- [103] Mendoza MF, Hollabaugh NM, Hettiarachchi SU, McCarley RL. Human NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase Type I (hNQO1) Activation of Quinone Propionic Acid Trigger Groups. *Biochemistry.* **2012**; 51: 8014–8026.

- [104] Cresteil T, Jaiswal AK. High levels of expression of the NAD(P)H:Quinone oxidoreductase (NQO₁) gene in tumor cells compared to normal cells of the same origin. *Biochem Pharmacol.* **1991**; 42: 1021–1027.
- [105] Maskell, L, Blanche EA, Colucci MA, Whatmore JL, Moody CJ. Synthesis and evaluation of prodrugs for anti-angiogenic pyrrolylmethylidenyl oxindoles. *Bioorg Med Chem Lett.* **2007**; 17: 1575-1578.
- [106] Weerapreeyakul N, Anorach R, Khuansawad T, Yenjai C, Isaka M. Synthesis of bioreductive esters from fungal compounds. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* **2007**; 55:930-935.
- [107] Pitchuanchom S, Sriphana U, Weerapreeyakul N, Yenjai C. Anticancer Activity of the Bioreductive and Non-Bioreductive Zerumbone Derivatives. *Lett Drug Des Discov.* **2011**; 8: 536-543.
- [108] Liu P, Xu J, Yan D, Zhang P, Zeng F, Li B, Wu S. A DT-diaphorase responsive theranostic prodrug for diagnosis, drug release monitoring and therapy. *JCS Chem Comm* **2015**; 51: 9567–9570.
- [109] Ji C, Miller MJ. Siderophore–fluoroquinolone conjugates containing potential reduction-triggered linkers for drug release: synthesis and antibacterial activity. *Biometals.* **2015**; 28: 541-551.
- [110] Unruh DA, Mauldin C, Pastine SJ, Rolandi M, Fréchet JMJ. Bifunctional Patterning of Mixed Monolayer Surfaces Using Scanning Probe Lithography for Multiplexed Directed Assembly. *J Am Chem Soc.* **2010**; 132: 6890–6891.
- [111] Chevalier A, Zhang Y, Khdour OM, Kaye JB, Hecht SM. Mitochondrial Nitroreductase Activity Enables Selective Imaging and Therapeutic Targeting. *J Am Chem Soc.* **2016**; 138: 12009–12012.
- [112] Roldán MD, Pérez-Reinado E, Castillo F, Moreno-Vivián C. Reduction of polynitroaromatic compounds: the bacterial nitroreductases. *FEMS Microbiol Rev.* **2008**; 32: 474–500.
- [113] Shigenaga A, Ogura K, Hirakawa H, Yamamoto J, Ebisuno K, Miyamoto L, Ishizawa K, Tsuchiya K, Otaka A. Development of a reduction-responsive amino acid that induces peptide bond cleavage in hypoxic cells. *ChemBioChem.* **2012**; 13: 968–971.
- [114] Guengerich FP. Human Cytochrome P450 enzymes. *W Cytochrome P450 Structure, Mechanism, and Biochemistry.* ed. de Montellano PRO. Springer, 2015; 523-785.

- [115] Yatzeck MM, Lavis LD, Chao TY, Chandran SS, Raines RT. A highly sensitive fluorogenic probe for cytochrome P450 activity in live cells. *Bioorg Med Chem Lett.* **2008**; 18: 5864–5866.
- [116] Zhou J, Zhang J, Ren H, Dong X, Zheng X, Zhao W. A turn-on fluorescent probe for selective detection of glutathione using trimethyl lock strategy. *J Photochem Photobiol A Chem.* **2018**; 355: 94–100.
- [117] Shigenaga A, Tsuji D, Nishioka N, Tsuda S, Itoh K, Otaka A. Synthesis of a stimulus-responsive processing device and its application to a nucleocytoplasmic shuttle Peptide. *ChemBioChem* **2007**; 8: 1929–1931.
- [118] Mathew BJ, Nath M. Recent approaches to antifungal therapy for invasive mycoses. *ChemMedChem.* **2009**; 24: 310-323.
- [119] Wakieć R, Gabriel I, Prasad R, Becker JM, Payne JW, Milewski S. Enhanced susceptibility to antifungal oligopeptides in yeast strains overexpressing ABC multidrug efflux pumps. *Antimicrob Agents Chemother.* **2008**; 52: 4057-4065.
- [120] Tagliamonte A, Biggio F, Vargiu L, Gessa G. Free tryptophan in serum controls brain tryptophan level and serotonin synthesis. *Life Sci.* **1973**; 12: 277–287.
- [121] Lewis A, Waterhouse C, Jacobs R. Whole-blood and plasma amino acid analysis: gas-liquid and cation-exchange chromatography compared. *Clin Chem.* **1980**; 26: 271–276.
- [122] Motil K, Opekun A, Montandon C, Berthold HK, Davis TA, Klein PD, Reeds PJ, Leucine oxidation changes rapidly after dietary protein intake is altered in adult women but lysine flux is unchanged as is lysine incorporation into VLDL apolipoprotein B-100. *J Nutr.* **1994**; 124: 41–51.
- [123] Gophna U, Bapteste E, Doolittle WF, Biran D, Ron DZ. Evolutionary plasticity of methionine biosynthesis. *Gene.* **2005**; 355: 48-57.
- [124] Nazi I, Scott A, Sham A, Rossi L, Williamson PR, Kronstad JW, Wright GD. Role of homoserine transacetylase as a new target for antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**; 51: 1731–1736.
- [125] Matthews RG, Smith AE, Zhou ZS, Taurog RE, Bandarian V, Evans JC, Ludwig M, Cobalamin-dependent and cobalamin-independent methionine synthases: are there two solutions to the same chemical problem? *Helv Chim Acta.* **2003**; 86: 3939–3954.

- [126] uliman HS, Appling DR, Robertus JD. The gene for cobalamin-independent methionine synthase is essential in *Candida albicans*: A potential antifungal target. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**; 467: 218–226.
- [127] Tsai PW, Chien CY, Yeh YC, Tung L, Chen HF, Chang TH, Lan CY. *Candida albicans* Hom6 is a homoserine dehydrogenase involved in protein synthesis and cell adhesion. *J Microbiol Immunol Infect.* **2017**; 50: 863-871.
- [128] Yamaguchi H, Uchida K, Hiratani T, Nagate T, Watanabe N, Omura S. RI-331, a new antifungal antibiotic. *Ann NY Acad Sci.* **1988**; 544: 188–190.
- [129] Aoki Y, Kongoh M, Nakamura M, Fujii T, Yamazaki T, Shimada H, Arisawa M, A new methionine antagonist that has antifungal activity: mode of action. *Jpn J Antibiot.* **1994**; 40: 127–132.
- [130] Viaene J, Tiels P, Logghe M, Dewaele S, Martinet W, Contreras R. MET15 as a visual selection marker for *Candida albicans*. *Yeast.* **2000**; 16: 1205-1215.
- [131] Brzywczy J, Yamagata S, Paszewski A. Comparative studies on *O*-acetylhomoserine sulfhydrylase: physiological role and characterization of the *Aspergillus nidulans* enzyme. *Acta Biochim Polon.* **1993**; 40: 421-428.
- [132] Ejim LJ, Blanchard JE, Koteva KP, Sumerfield R, Elowe NH, Chechetto JD, Brown ED, Junop MS, Wright GD. Inhibitors of bacterial cystathionine beta-lyase: leads for new antimicrobial agents and probes of enzyme structure and function. *J Med Chem.* **2007**; 50: 755–764.
- [133] Steegborn C, Laber B, Messerschmidt A, Huber R, Clausen T. Crystal structures of cystathionine γ -synthase inhibitor complexes rationalize the increased affinity of a novel inhibitor. *J Mol Biol.* **2001**; 311: 789-801.
- [134] Capobianco JO, Zakula D, Coen ML, Goldman RC. Anti-Candida Activity of Cispentacin: The Active Transport by Amino Acid Permeases and Possible Mechanisms of Action. *Biochem Biophys Res Commun.* **1993**; 190: 1037-1044.
- [135] Wang E, Walsh C. Suicide Substrates for the Alanine Racemase of *Escherichia coli* B. *Biochemistry.* **1978**; 17: 1313-1321.
- [136] Chalyavi F, Gilmartin PH, Schmitz AJ, Fennie MW, Tucker MJ. Synthesis of 5-Cyano-Tryptophan as a Two-Dimensional Infrared Spectroscopic Reporter of Structure. *Angew Chemie Int Ed.* **2018**; 57: 7528-7532.
- [137] Nakao M, Fukuyama S, Kitaike S, Sano S. Synthesis of rhodotorulic acid and its 1,4-dimethylated derivative. *Heterocycles.* **2015**; 90: 1309-1316.

- [138] de Ilarduya AM, Ittobane N, Bermudez M, Alla A, El Idrissi M, Munoz-Guerra S. Poly(α -alkyl γ -glutamate)s of Microbial Origin. 2. On the Microstructure and Crystal Structure of Poly(α -ethyl γ -glutamate)s, *Biomacromolecules*. **2002**; 3: 1078-1086.
- [139] Ma Y, Li Z, Su K, Cheng B. High selective autocatalytic esterification of glutamic acid by benzyl alcohol with CuCl₂ promoting. *Catal Commun*. **2014**; 48: 15-18.
- [140] Bonilla-Reyes E, Sanchez-Carillo A, Vazquez A. Synthesis of L-Kynurenine and Homo-L-Kynurenine via an Aza-Fries Rearrangement. *Synthesis*. **2020**; 52: 3473-3479.
- [141] Jiang C-S, Zhou Z-F, Yang X-H, Lan L-F, Gu Y-C, Ye B-P, Guo Y-W. Antibacterial sorbicillin and diketopiperazines from the endogenous fungus *Penicillium* sp. GD6 associated Chinese mangrove *Bruguiera gymnorrhiza*, *Chin J Nat Med*. **2018**; 16: 0358-0365.
- [142] Munawar S, Zahoor AF, Ali S, Javed S, Irfan M, Kotwica-Mojzych K, Mojzych M. Mitsunobu Reaction: A Powerful Tool for the Synthesis of Natural Products: A Review. *Molecules*. **2022**; 27: e6953.
- [143] Guo L, Liu J, Nargund RP, Pasternak A, Yang L, Ye Z. Triazole beta carboline derivatives as antidiabetic compounds. Patent WIPO. WO2010/051177A1. 2010.
- [144] Wang S, Zhou H, Xu R, Bai L, Mceachern D, Stuckey J, Yang C-Y. Small molecule degraders of stat3. Patent WIPO. WO2020/198435A1. 2020.
- [145] Amsberry KL, Borchardt RT. The lactonization of 2'-hydroxyhydrocinnamic acid amides: a potential prodrug for amines. *J Org Chem*. **1990**; 55: 5867-5877.
- [146] Amsberry KL, Borchardt RT. Amine Prodrugs Which Utilize Hydroxy Amide Lactonization. I. A Potential Redox-Sensitive Amide Prodrug. *Pharm Res*. **1991**; 8: 323-330.
- [147] Amsberry KL, Gerstenberger AE, Borchardt RT. Amine Prodrugs Which Utilize Hydroxy Amide Lactonization. II. A Potential Esterase-Sensitive Amide Prodrug. *Pharm Res*. **1991**; 8: 455-461.
- [148] Tarozzi A, Marchetti C, Nicolini B, D'Amico M, Ticchi N, Pruccoli L, *et al*. Combined inhibition of the EGFR/AKT pathways by a novel conjugate of quinazoline with isothiocyanate. *Eur J Med Chem*. **2016**; 117: 283-291.

- [149] Kawai A, Hara O, Hamada Y, Shioiri T. Stereoselective synthesis of the hydroxy amino acid moiety of Al-77-B, a gastroprotective substance from *Bacillus pumilus* Al-77. *Tetrahedron Lett.* **1988**; 29: 6331-6334.
- [150] Nowak GM. Rozszczepialne koniugaty lipid:antymetabolit o działaniu przeciwdrobnoustrojowym: projektowanie, synteza i ocena właściwości biologicznych. **2023**. TUG. Gdańsk.
- [151] Watanabe S, Watanabe S, Aoki N, Usuki T. Synthesis of the Polyketide (*E*)-Olefin of the Jamaicamides. *Synth Commun.* **2012**; 43: 1397-1403.
- [152] Wünsch M, Schröder D, Fröhr T, Teichmann L, Hedwig S, Janson N, Belu C, Simon J, Heidemeyer S, Holtkamp P, Rudlof J, Klemme L, Hinzmann A, Neumann B, Stammler H-G, Sewald N. Asymmetric synthesis of propargylamines as amino acid surrogates in peptidomimetics. *Beilstein J Org Chem.* **2017**; 13: 2428–2441.
- [153] Gerwien, F, Safyan A, Wisgott S, Brunke S, Kasper L, Hube B. The fungal pathogen *Candida glabrata* does not depend on surface ferric reductases for iron acquisition. *Front Microbiol.* **2017**; 8: 1055.
- [154] Lee JH, Han Y. *Candida albicans* can utilize siderophore during candidastasis caused by apotransferrin. *Arch Pharm Res.* **2006**; 29: 249-255.
- [155] Odoni DI, van Gaal MP, Schonewille T, Tamayo-Ramos, JA, Martins dos Santos VAP, Suarez-Diez M, Schaap PJ. *Aspergillus niger* secretes citrate to increase iron bioavailability. *Front. Microbiol.* **2017**; 8: 1424.
- [156] Garbe E, Miramón P, Gerwien F, Ueberschaar N, Hansske-Braun L, Brandt P, Böttcher B, Lorenz M, Vylkova S. GNP2 Encodes a High-Specificity Proline Permease in *Candida albicans*. *mBio.* **2022**; 13: e0314221.
- [157] Jethwaney D, Höfer M, Khaware RK, Prasad R. Functional reconstitution of a purified proline permease from *Candida albicans*: interaction with the antifungal cispentacin. *Microbiology (UK).* **1997**; 143: 397-404.
- [158] Bernier G, Girjavallabhan V, Murray A, Niyaz N, Ding P, Miller MJ, Malouin F. Desketoneoenactin-siderophore conjugates for *Candida*: evidence of iron transport-dependent species selectivity. *Antimicrob Agents Chemother.* **2005**; 49: 241-248.
- [159] Ardon O, Bussey H, Philpott C, Ward DM, Davis-Kaplan S, Verroneau S, Jiang B, Kaplan J. Identification of a *Candida albicans* ferrichrome transporter and its characterization by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **2002**; 276: 43049–43055.

- [160] Naglik JR, Moyes DL, Wächtler B, Hube B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes Infect.* **2011**; 13: 963-976.
- [161] Kuplińska A, Enzymes of the L-methionine biosynthesis pathway in *Candida albicans* as potential novel targets for antifungal chemotherapy. **2024**. TUG. Gdańsk.
- [162] Chang W, Zhang M, Jin X, Zhang H, Zheng H, Zheng S, Qiao Y, Yu H, Sun B, Hu X, Lou H. Inhibition of fungal pathogenicity by targeting the H₂S-synthesizing enzyme cystathionine β -synthase. *Sci Adv.* **2022**; 8: eadd5366.
- [163] Mirza IA, Nazi I, Kroczyńska M, Wright GD, Berghuis AM. Crystal Structure of Homoserine Transacetylase from *Haemophilus influenzae* Reveals a New Family of α/β -Hydrolases. *Biochemistry.* **2005**; 44: 15768-15773.
- [164] Tran TH, Krishnamoorthy K, Begley TP, Ealick SE. A novel mechanism of sulfur transfer catalyzed by *O*-acetylhomoserine sulfhydrylase in the methionine-biosynthetic pathway of *Wolinella succinogenes*. *Acta Cryst.* **2011**; D67: 831-838.
- [165] Nazi I, Wright GD. Catalytic Mechanism of Fungal Homoserine Transacetylase. *Biochemistry.* **2005**; 44: 13560-13466.
- [166] Kulikova VV, Revtovich SV, Bazhulina NP, Anufrieva NV, Kotlov MI, Koval VS, *et al.* Identification of *O*-acetylhomoserine sulfhydrylase, a putative enzyme responsible for methionine biosynthesis in *Clostridioides difficile*: Gene cloning and biochemical characterizations. *IUBMB Life.* **2019**; 71: 1815-1823.
- [167] Kuplińska A, Rząd K, Stefaniak J, Kozłowska-Tylingo K, Wojciechowski M, Milewski S, Gabriel I. Targeting *Candida albicans* *O*-acetyl-L-homoserine sulfhydrylase (Met15p) in antifungal treatment. *Sci Rep.* **2024**; 14: 28188.
- [168] Schenk SU, Lambein F, Wwener D. Broad antifungal activity of β -isoxazolinonyl-alanine, a non-protein amino acid from roots of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *Biol Fertil Soils.* **1991**; 11: 203-209.
- [169] Nowak MG, Skwarecki AS, Milewska MJ, Amino Acid Based Antimicrobial Agents – Synthesis and Properties. *ChemMedChem.* **2021**; 16: 3513-3544.
- [170] Song X, Liu A-X, Liu S-S, Gao W-C, Wang M-C, Chang J, Enantiopure azetidine-2-carboxamides as organocatalysts for direct asymmetric aldol reactions in aqueous and organic media. *Tetrahedron.* **2014**; 70: 1464-1470.

- [171] Wang T, Kong Y-F, Xu, Y, Fan, J, Xu H-J, Bierer D, Wang J, Shi, J, Li Y-M. Efficient synthesis of hydrocarbon-bridged diaminediacids through nickel-catalyzed reductive cross-coupling. *Tetrahedron Lett.* **2017**; 58: 3970-3973.
- [172] Połec I, Kiełczewska A, Konopski L, Oleksa G, Krukowska H, Legocki J, Alkyl methylphosphonic acids, the degradation products of organophosphorous CWA – preparation and direct quantitative GC-FID analysis. *Cent Eur J Chem.* **2010**; 8: 1251-1265.
- [173] Norlin R, Lindberg G, Synthesis of [¹⁴C] Sarin. *J Label Compd Radiopharm.* **2003**; 46: 599-604.
- [174] Zhang L-H, Kauffman GS, Pesti JA, Yin J. Rearrangement of N_α-Protected L-Asparagines with Iodosobenzene Diacetate. A Practical Route to β-Amino-L-alanine Derivatives. *J Org Chem.* **1997**; 62: 6918-6920.
- [175] Heltweg B, Dequiedt F, Marshall BL, Brauch C, Yoshida M, Nishino N, Verdin, E, Jung M. Subtype Selective Substrates for Histone Deacetylases. *J Med Chem.* **2004**; 47: 5235-5243.
- [176] Baldwin JE, Adlington RM, Birch DM. Synthesis of L-β-(isoxazolin-5-one-2-yl)-alanine: a novel method for the synthesis of N-substituted 3,4-unsubstituted isoxazolin-5-ones. *Tetrahedron Lett.* **1985**; 28: 5931-5934.
- [177] Mattingly PG, Miller MJ. Titanium Trichloride Reduction of Substituted N-Hydroxy-2-azetidiones and Other Hydroxamic Acids. *J Am Chem Soc.* **1980**; 45: 410-415.
- [178] Baldwin JE, Adlington RM, Mellor LC. Synthesis of Chiral Isoxazolidin-5-ones and their Applications to the Synthesis of β-Amino-Alanines and β-(N-Hydroxyamino)-Alanines. *Tetrahedron.* **1994**; 50: 5049-5066.
- [179] Klimovica K, Heidla JX, Romero I, Le TV, Daugulis O. "Sandwich" Diimine-Copper Catalysts for C-H Functionalization by Carbene Insertion. *Angew Chem Int Ed.* **2022**; 61: e202200334.
- [180] Schenk SU, Lambein F, Wwener D. Broad antifungal activity of β-isoxazolinonyl-alanine, a non-protein amino acid from roots of pea (*Pisum sativum L.*) seedlings. *Biol Fertil Soils.* **1991**; 11: 203-209.
- [181] Corso G, Cristofano A, Sapere N, La Marca G, Angiolillo A, Vitale M, Fratangelo R, Lombardi T, Porcile C, Intriери M, Di Costanzo A. Serum amino acid profiles in normal subjects and in patients with or at risk of Alzheimer dementia. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra.* **2017**; 7: 143-159.

- [182] Keller O, Keller WE, Van Look G, Wersin G. *tert*-Butoxycarbonylation of Amino Acids and their Derivatives: *N-tert*-Butoxycarbonyl-L-phenylalanine. *Org Synth.* **1985**; 63: 160-160.
- [183] Biron E, Voyer N. Synthesis of cationic porphyrin modified amino acids. *JCS Chem Comm* **2005**; 37: 4652-4654.
- [184] Yamada F, Kobayashi K, Shimizu A, Aoki N, Somei M. A synthesis method of indole-3-methanamine and/or gramine from indole-3-carboxaldehyde, and its application for the syntheses of brassinin, its 4-substituted analogs, and 1,3,4,5-tetrahydropyrrolo(4,3,2-de)quinoline. *Heterocycles.* **1993**; 36: 2783-2804.
- [185] Davies SG, Russell AJ, Sheppard RL, Smith AD, Thomson JE. Evaluating β -amino acids as enantioselective organocatalysts of the Hajos-Parrish-Eder-Sauer-Wiechert reaction. *Org Biomol Chem.* **2007**; 5: 3190 – 3200.
- [186] Hanselmann R, Zhou J, Ma P, Confalone PN. Synthesis of Cyclic and Acyclic β -Amino Acids via Chelation-Controlled 1,3-Dipolar Cycloaddition. *J Org Chem.* **2003**; 68: 8739 – 8741.
- [187] Wang S, Sun J, Zhang Q, Cao X, Zhao Y, Tang G, Yu B. Amipurimycin: Total Synthesis of the Proposed Structures and Diastereoisomers. *Angew Chem Int Ed.* **2018**; 57: 2884 – 2888.
- [188] Maheswara Rao BL, Nowshuddin S, Jha A, Divi MK, Rao MNA. New reagent for the introduction of Boc protecting group to amines: Boc-OASUD. *Synth Commun.* **2017**. 47: 2127 – 2132.
- [189] Jackson RFW, Wishart N, Wood A, James K, Wythes MJ. Preparation of Enantiomerically Pure Protected 4-Oxo- α -amino Acids and 3-Aryl- α -amino Acids from Serine. *J OrgChem.* **1992**; 57: 3397 – 3404.
- [190] Tietze LF, Gericke KM, Singidi RR, Schubert I. Novel strategies for the synthesis of anthrapyran antibiotics: discovery of a new antitumor agent and total synthesis of (*S*)-espicufolin. *Org Biomol Chem.* **2007**; 5: 1191-1200.
- [191] Featherston AL, Shugrue CR, Mercado BQ, Miller SJ. Phosphothreonine (pThr)-Based Multifunctional Peptide Catalysis for Asymmetric Baeyer-Villiger Oxidations of Cyclobutanones. *ACS Catal.* **2019**; 9: 242-252.
- [192] Malik AK, Qiu H, Sawada T, Takafuji M, Ihara H. Molecular-shape selectivity by molecular gel-forming compounds: Bioactive and shape-constrained isomers through the integration and orientation of weak interaction sites. *JCS Chem Comm* **2011**; 47: 10341 – 10343.

- [193] Scheurer A, Mosset P, Bauer W, Saalfrank RW. A practical route to regiospecifically substituted (*R*)- and (*S*)-oxazolylphenols. *Eur J Org Chem.* **2001**; 16: 3067 – 3074.
- [194] Dawson TP, Chernack J. Process for the manufacture of methyl dichloro phosphine oxide. Patent USA. US2929843A. 1949.
- [195] Kunieda T, Higuchi T, Abe Y, Hirobe M. 3-Alkoxy carbonyl-2-oxazolones and Their Homopolymers as Highly Preservable Amino-Protecting Reagents. *tert*-Butoxy-carbonylation and Benzyloxycarbonylation of Amino Groups. *Chem Pharm Bull.* **1984**; 32: 2174 – 2181.
- [196] Ressler C, Ratzkin H. Synthesis of β -Cyano-L-alanine and γ -Cyano- α -L-aminobutyric Acid, Dehydration Products of L -Asparagine and L -Glutamine; a New Synthesis of Amino Acid Nitriles. *J Org Chem.* **1961**; 26: 3356 – 3360.
- [197] Andruszkiewicz R, Rożkiewicz D. An Improved Preparation of N²-*tert*-Butoxycarbonyl- and N²-Benzyloxycarbonyl-(*S*)-2,4-diaminobutanoic Acids. *Synth Comm.* **2004**, 34: 1049 – 1056.
- [198] Murakami Y, Yanuma H, Usuki T. Total synthesis of the elastin crosslinker (+)-desmopyridine. *Tetrahedron Asymmetry.* **2012**; 23: 1557 – 1563.

Dorobek naukowy

Publikacje w czasopismach z listy Journal Citations Report

1. **Stefaniak-Skorupa J**, Zahoor Rajput H, Maciejewska N, Szweda P, Skwarecki AS, Milewska MJ, Milewski S. Antifungal conjugates incorporating ω -N-acetyl-N-hydroxy-L-ornithine as a molecular carrier, *Sci Rep*, **2025** - w recenzji
2. **Stefaniak-Skorupa J**, Milewska MJ. Ergosterol and Lanosterol Derivatives: Synthesis and Possible Biomedical Applications. *ChemMedChem*. **2025**; 20: e202400984.
3. Skwarecki A, **Stefaniak-Skorupa J**, Nowak MG. Trimethyl lock based tools for drug delivery and cell imaging – synthesis and properties, *Chem Eur J*. **2024**; 31: e202403486.
4. Kuplińska A, Rząd K, **Stefaniak-Skorupa J**, Kozłowska-Tylingo K, Wojciechowski M, Milewski S, Gabriel I. Targeting *Candida albicans* O-acetyl-L-homoserine sulphydrylase (Met15p) in antifungal treatment., *Sci Rep*. **2024**; 14: 28188.
5. **Stefaniak J**, Nowak MG, Skwarecki A. Rhodotorulic acid and its derivatives: synthesis, properties and applications. *Curr Med Chem*. **2024**; 31: 6614 – 6629.
6. **Stefaniak J**, Nowak MG, Wojciechowski M, Milewski S, Skwarecki A. Inhibitors of glucosamine-6-phosphate synthase as potential antimicrobials or antidiabetics – synthesis and properties. *J Enzyme Inhib Med Chem*. **2022**; 37: 1928-1956.
7. Panuszko A, Bruździak P, Śmiechowski M, Stasiulewicz M, **Stefaniak J**, Stangret J. DMSO hydration redefined: Unraveling the hydrophobic hydration of solutes with a mixed hydrophilic–hydrophobic characteristic. *J Mol Liq*. **2019**; 294: 1-53.

Doniesienia konferencyjne

1. **Stefaniak-Skorupa J**, Skwarecki AS, Milewska MJ: Design and synthesis of hydroxamate siderophore:enzymatic inhibitor conjugates containing esterase labile “trimethyl lock” linker, 24rd Tetrahedron Symposium: Catalysis for a sustainable world, Montpellier, Francja, 2024, poster P1.56
2. Gabriel I, Kuplińska A, **Stefaniak-Skorupa J**, Rząd K, Milewski S: *O*-Acetyl-L-homoserine sulfhydrylase: molecular target for antifungals in methionine biosynthetic pathway, 24rd Tetrahedron Symposium: Catalysis for a sustainable world, Montpellier, Francja 2024, poster
3. Kuplińska A, **Stefaniak J**, Rząd K, Gabriel I, Kozłowska-Tylingo K, Milewski S: *Candida albicans* *O*-acetyl-L-homoserine sulfhydrylase (Met15) characterisation with the use of a novel RP-HPLC-MS method, 5th Congress of Polish Biosciences BIO2023 – “Different faces of biosciences” and 52nd Meeting of the Polish Biochemical Society, Szczecin, Polska, 2023, poster
4. **Stefaniak J**, Górska J, Maciejewska N, Skwarecki AS, Milewska MJ: Organic synthesis of novel hydroxamate siderophore and enzymatic inhibitor direct conjugates, 23rd Tetrahedron Symposium: Catalysis for a sustainable world, Gothenburg, Szwecja, 2023, poster P1.071
5. **Stefaniak J**, Skwarecki AS, Milewska MJ: Synteza połączeń siderofor hydroksamowy – inhibitor enzymatyczny zawierających labilny linker “trimethyl lock”, 64-ty Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Lublin, Polska, 2022, poster 01086
6. **Stefaniak J**, Kuplińska A, Gabriel I, Milewska MJ: Synthesis and antifungal evaluation of potential inhibitors of the L-methionine biosynthesis pathway in pathogenic fungal cells, 22nd Tetrahedron Symposium: Catalysis for a sustainable world, Lizbona, Portugalia, 2022, poster 204
7. **Stefaniak J**, Milewska MJ: Synteza potencjalnych inhibitorów szlaku biosyntezy L-metioniny zachodzącej w patogennych komórkach grzybowych. XIV Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, Toruń, Polska, 2021, poster CH7-10