



INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ

POLSKA AKADEMIA NAUK

Mikołaj Chromiński

A-21-6
K-c-125
K-c-127
K-d-134

*Synteza połączeń witaminy B₁₂ z protoporfiryną IX,
potencjalnych aktywatorów cyklicznej guanylowej*

Praca przedstawiona

Radzie Naukowej Instytutu Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk

celem uzyskania tytułu doktora nauk chemicznych

Promotor:

dr hab. Dorota Gryko, prof. nadzw.

Warszawa 2013

Biblioteka Instytutu Chemii Organicznej PAN

O-B.355/13



90000000186677



B. Org. 355/13



INNOVATIVE ECONOMY
NATIONAL COHESION STRATEGY



Fundacja na rzecz Nauki Polskiej

EUROPEAN UNION
EUROPEAN REGIONAL
DEVELOPMENT FUND



Praca doktorska wykonana w ramach projektu:

*Novel approach towards NO-free activators of sGC enzyme
for medical treatment of heart diseases.*

Projekt realizowany w ramach programu TEAM Fundacji na rzecz Nauki Polskiej,
współfinansowany przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego.

Numer grantu: TEAM/2009-3/4



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Badania przedstawione w rozdziale 3.1 wykonano w ramach projektu:

Porfiryny w reakcji Huisgena – czy insercja miedzi jest nieunikniona?

Projekt realizowany w ramach grantu Preludium I Narodowego Centrum Nauki

Numer grantu: UMO-2011/01/N/ST5/05613



THE UNIVERSITY OF TEXAS
HEALTH SCIENCE CENTER AT HOUSTON

Badania biologiczne wykonane zostały przez Emila Martina
w University of Texas Health Science Center w Houston.

Część badań biologicznych przeprowadziłem samodzielnie w trakcie trzytygodniowego
stażu odbytego w grupie Emila Martina okresie 28.04-21.05.2011.

Część wyników przedstawionych w niniejszej pracy została opublikowana w artykułach:

- **Mikołaj Chromiński**, Keith ó Proinsias, Emil Martin, Dorota Gryko, Protoporphyrin IX/Cobyryinate Derived Hybrids – Novel Activators of Soluble Guanylyl Cyclase. *European Journal of Organic Chemistry*, **2013**: 1530–1537.
- **Mikołaj Chromiński**, Dorota Gryko, “Clickable” Vitamin B₁₂ Derivative. *Chemistry – a European Journal*, **2013**, *19*: 5141–5148.
- **Mikołaj Chromiński**, Łukasz Banach, Maksymilian Karczewski, Keith ó Proinsias, Iraida Sharina, Dorota Gryko, Emil Martin, Synthesis and Evaluation of Bifunctional sGC Regulators: Optimization of a Connecting Linker. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2013**, *56 (18)*: 7260–7277.
- **Mikołaj Chromiński**, Agnieszka Lewalska, Dorota Gryko Reduction-free synthesis of stable acetylde cobalamins. *Chemical Communications*, **2013**, DOI: 10.1039/C3CC47210H
- **Mikołaj Chromiński**, Anna Zieleniewska, Maksymilian Karczewski, Dorota Gryko, Porphyrins as substrates in CuAAC – Exclusion of Unwanted Copper Insertion into the Macrocyclic Core, *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, rękopis wstępnie przyjęty do druku

Wyniki przedstawione w rozdziale 3.3 były podstawą zgłoszenia patentowego:

- **Mikołaj Chromiński**, Dorota Gryko, Pochodne witaminy B₁₂ i sposób ich otrzymywania, zgłoszenie_nr P. 400 265.

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy były prezentowane na międzynarodowych konferencjach:

- **YoungChem 2010, Gdańsk**,
„Click” approach towards molecular hybrids of vitamin B₁₂ and protoporphyrin IX – in search of new NO free drugs for heart diseases - prezentacja ustna
- **B₁₂ symposium, 2012, Nancy, Francja**
Protoporphyrin IX/Cobinamide Derived Hybrids Novel Activators of Soluble Guanylyl Cyclase - prezentacja ustna
- **YoungChem 2012, Gdańsk**,
Protoporphyrin IX/Cobinamide Derived Hybrids Novel Activators of Soluble Guanylyl Cyclase- prezentacja ustna
‘Clickable’ Vitamin B₁₂ - poster
- **Frontiers in Chemistry, 2013, Erywań, Armenia**
Natural tetrapyrroles - just “click” it! – prezentacja ustna

Podziękowania

W tym miejscu pragnąłbym podziękować kilku (może kilkunastu) osobom, dzięki którym ta praca miała szansę powstać, a ja miałem szansę nie zwariować, lub zwariować tylko troszkę.

Prof. Dorocie Gryko dziękuję za zaszczyt tworzenia i współtworzenia Zespołu XV, rzucenie na głęboką wodę, cały zestaw kół ratunkowych w pogotowiu, nieustanną motywację metodą kija, marchewki i kija, możliwość pracy w tematyce dziwnej, trudnej i ciekawej.

Byłym i obecnym członkom Zespołu XV dziękuję za specyficzną atmosferę pracy łączącą pierwiastki Chaosu i Ładu (ze nieznaczną przewagą tych pierwszych). W laboratorium po prostu lubiłem przebywać, nawet jak chwilowo nie było nic do roboty.

Rafałowi za umiejętne łączenie ww pierwiastków (w końcu chemik) i funkcję kawalerii.

Sabinie, Dominice, Sylwkowi Maćkowi - towarzyszym spod wyciągu.

Sylwkowi w szczególności dziękuję za pełnienie funkcji współnarzekacza oraz piorunochronu.

Keithowi za głupawki ogólne i szczególne.

Kasi, Ani, Maksowi, Agnieszce i Jarkowi – studentbandzie z którą się użerałem. I nawzajem.

Chłopakom z zespołów III i IX.

Robertowi za rozmowy o wszystkim i o niczym, z przewagą tego ostatniego.

Emilowi, za opiekę za wielką Wielką Wodą i poszerzenie horyzontów.

Starym, biednym, zmęczonym rodzicom dzięki którym wyszedłem na ludzi oraz Witkowi i Jaśkowi którzy na ludzi właśnie wychodzą.

I Uli, za wszystko.

Nie tylko za zaliczenie zerówki w trybie wieczorowym i wystawienie gotowości szkolnej. A psik!

Wykaz stosowanych skrótów

AAC	1,3-dipolarna cykloaddycja azydku do alkinu
AgAAC	katalizowana srebrem 1,3-dipolarna cykloaddycja azydku do alkinu
B₁₂	witamina B ₁₂ , kobalamina
BSA	surowicza albumina wołowa
CA	anhydraza węglanowa
cGMP	cykliczny guanozyno-3',5'-monofosforan
COD	cyklooktadien
Cp*	pentametylocyklopentadienyl
CuAAC	katalizowana miedzią 1,3-dipolarna cykloaddycja azydku do alkinu
DBU	1,8-diazabicyklo(5.4.0)undek-7-en
DCVC	suchokolumnowa chromatografia próżniowa
DIPEA	<i>N,N</i> -dizopropylodetyloamina
DMA	<i>N,N</i> -dimetyloacetamid
DMPU	1,3-dimetylo-3,4,5,6-tetrahydro-2(1H)-pyrimidinon
DTT	ditiotreitól, odczynnik Clelanda
EC50	stężenie wywołujące 50% maksymalnej aktywności
EDC	1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimid
Eq	ekwiwalent
GTP	guanozyno-5'-trifosforan
h	godzina
HMPA	heksametylotriamid kwasu fosforowego
IC50	stężenie inhibitora wywołujące 50% inhibicji
K_i	stała inhibicji
NaAsk	askorbnian sodu
NMP	<i>N</i> -metylopirolidon
PpIX	protoporfiryna IX
R.T.	temperatura pokojowa
RuAAC	katalizowana rutenem 1,3-dipolarna cykloaddycja azydku do alkinu
sGC	cyklaza guanylowa
SPAAC	cykloaddycja azydku do alkinu wynikająca z naprężenia pierścienia
TBTA	tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-ilo)metylo]amina
ZnAAC	katalizowana cynkiem 1,3-dipolarna cykloaddycja azydku do alkinu

Spis treści

1. Założenia i cel pracy	11
2. Część literaturowa.....	15
2.1. 1,3-Dipolarna cykloaddycja azydków do alkinów	15
2.2.1. Wstęp.....	15
2.1.2. CuAAC.....	17
2.1.3. RuAAC.....	22
2.1.4. Zastosowanie innych metali przejściowych.....	24
2.1.5. AAC katalizowana zasadą.....	26
2.1.6. SPAAC.....	26
2.1.7. Podsumowanie	27
2.2. Zastosowanie katalitycznych AAC w syntezie związków biologicznie czynnych	29
2.2.1. Wstęp.....	29
2.2.2. Właściwości 1,2,3-triazolu.....	30
2.2.3. Triazol jako zamiennik grupy amidowej.....	30
2.2.4. Triazol jako zamiennik wiązania podwójnego węgiel –węgiel.....	34
2.2.5. Triazol jako zamiennik furanu	36
2.3. Zastosowanie AAC do syntezy związków hybrydowych	37
2.3.1. Związki hybrydowe.....	37
2.3.2. β -Laktamy	39
2.3.3. Steroidy	44
2.3.4. Sulfonamidy	49
2.3.5. Hybrydy peptydowe	51
2.3.6. Cukry.....	52
2.3.7. Hybrydy różne.....	57
2.3.8. Podsumowanie	62
3. Badania własne	63
3.1. Optymalizacja warunków prowadzenia reakcji AAC porfiryn w formie wolnej zasady	63
3.1.1. Wstęp.....	63
3.1.2. Synteza porfiryn	64
3.1.3. Optymalizacja warunków CuAAC.....	66
3.1.4. Zakres i ograniczenia opracowanej metody.	69
3.1.5. Optymalizacja warunków RuAAC.....	73
3.1.6. Zakres i ograniczenia opracowanej metody	76
3.1.7. Podsumowanie	77

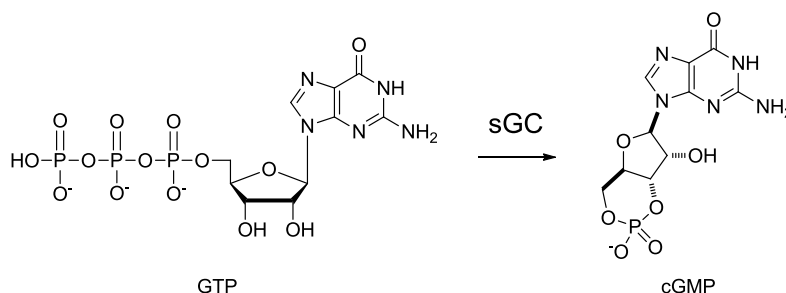
3.2. Synteza i właściwości biologiczne połączeń protoporfiryny IX i pochodnych kobinamidu	79
3.2.1. Wstęp	79
3.2.2. Synteza pochodnych kobinamidu	80
3.2.3. Synteza pochodnych PpIX.....	83
3.2.4. Optymalizacja warunków otrzymywania połączeń hybrydowych	85
3.2.5. Synteza serii połączeń hybrydowych.....	92
3.2.6. Badania nad aktywacją sGC przez związki hybrydowe	97
3.2.7. Podsumowanie.....	100
3.3. Zastosowanie AAC do modyfikacji witaminy B ₁₂	101
3.3.1. Wstęp	101
3.3.2. Optymalizacja syntezy azydkowej pochodnej witaminy B ₁₂	103
3.3.3. Zastosowanie azydkowej pochodnej witaminy B ₁₂ w reakcjach AAC.....	108
3.3.4. Próba syntezy połączenia pochodnych witaminy B ₁₂ i PpIX.	111
3.3.5. Podsumowanie.....	112
3.4. Alkynyłowe pochodne witaminy B ₁₂	113
3.4.1. Wstęp	113
3.4.2. Odkrycie i optymalizacja otrzymywania alkynyłowej pochodnej witaminy B ₁₂	114
3.4.3. Struktura i właściwości alkynyłowej pochodnej witaminy B ₁₂	122
3.4.4. Zakres i ograniczenia opracowanej metody alkynyłowania witaminy B ₁₂	125
3.4.5. Zastosowanie alkynyłowanych pochodnych witaminy B ₁₂ w reakcji CuAAC.	129
3.4.6. Podsumowanie.....	130
4. Podsumowanie i wnioski	131
5. Część eksperymentalna.	133
5.1. Informacje ogólne	133
5.2. Opisy syntezy i charakterystyka nowych związków	135
6. Literatura cytowana.	183

„Każda pożądana zmiana może być uskuteczniiona dzięki zastosowaniu właściwego rodzaju i stopnia siły we właściwy sposób oraz za pomocą odpowiedniego medium wobec odpowiedniego obiektu.”

Alister Crowley, „Magia w teorii i praktyce”

1. Założenia i cel pracy

Cyklaza guanylowa (sGC) jest wewnątrzkomórkowym enzymem odpowiedzialnym za transformację guanozyno-5'-trifosforanu (GTP) w cykliczny guanozyno-3',5'-monofosforan (cGMP) (Schemat 1.1). Poziom stężenia cGMP w komórkach reguluje wiele funkcji, w tym skurcze mięśni gładkich odpowiedzialnych za prawidłową pracę naczyń krwionośnych.¹ Nieprawidłowe funkcjonowanie sGC prowadzi do zaburzeń w syntezie cGMP i powoduje choroby układu sercowo-naczyniowego, w tym chorobę wieńcową i niedokrwienie serca. Ze względu na swą funkcję, sGC jest atrakcyjnym obiektem w poszukiwaniach nowych leków w chorobach układu krążenia.²



Schemat 1.1. Konwersja GTP do cGMP katalizowana przez sGC.

sGC jest heterodimerem zbudowanym z dwóch podjednostek α i β , przy czym w każdej z nich można wyróżnić trzy domeny: regulatorową, centralną odpowiedzialną za tworzenie dimerów oraz katalityczną, w której wiązany jest substrat - GTP. Domena regulatorowa zawiera cząsteczkę hemu, która jest receptorem tlenu azotu (NO). W odpowiedzi na wiązanie się NO do cząsteczki hemu, sGC rozpoczyna produkcję cGMP. Jedną z grup aktywatorów sGC stanowią związki będące donorami NO w warunkach fizjologicznych (np. nitrogliceryna). Wadą tej terapii jest brak selektywności oraz pojawianie się tolerancji lekowej, co skutkuje koniecznością stopniowego zwiększania dawek leków. Poszukiwania regulatorów sGC działających według alternatywnych mechanizmów doprowadziły do odkrycia związków stymulujących sGC niezależnie od NO,^{3, 4} w tym protoporfiryny IX (PpIX, Rysunek 1.1). Ignarro opisał PpIX jako silny, niezależny od NO aktywator sGC działający *in vitro*.^{5, 6} Niestety, w testach *in vivo* PpIX okazała się nieskuteczna ze względu na ograniczoną penetrację błon komórkowych i co za tym

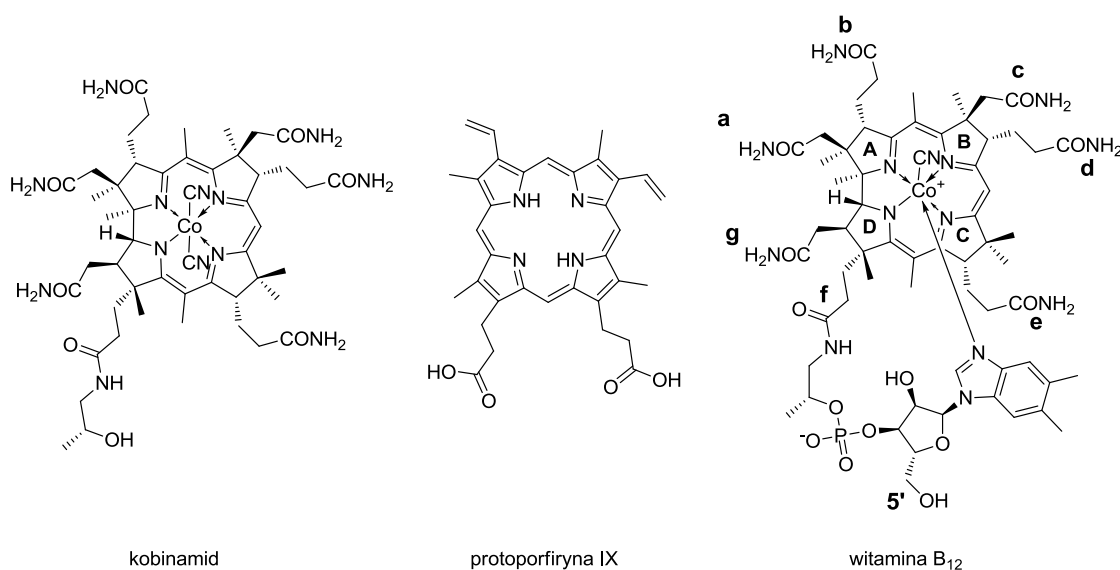
idzie, niską biodostępność. Cechą wspólną obu klas aktywatorów sGC (zależnych i niezależnych od NO) jest działanie w obrębie domeny regulatorowej.

Martin, we współpracy z zespołem XV IChO PAN, odkrył, że kobinamid (Rysunek 1.1) i jego pochodne są umiarkowanie silnymi aktywatorami sGC działającymi według zupełnie innego mechanizmu niż dotychczas znane aktywatory.⁷⁻⁹ Związki te, stymulują pracę sGC poprzez oddziaływanie wyłącznie z domeną katalityczną i wykazują działanie synergistyczne z niezależnymi od NO aktywatorami działającymi w domenie regulatorowej.⁷

Głównym celem mojej pracy było zaprojektowanie i otrzymanie związków będących połączeniami PpIX z kobinamidem oraz witaminą B₁₂ (Rysunek 1.1) jako potencjalnych aktywatorów sGC.

Podstawowym założeniem, na którym oparłem swoją pracę, była potencjalnie wysoka aktywność biologiczna tzw. związków hybrydowych, w których pochodne kobinamidu i PpIX będą ze sobą kowalencyjnie połączone. Spodziewałem się, że tak skonstruowane cząsteczki, złożone z dwóch różnych farmakoforów, będą oddziaływać z sGC w różnych domenach i według różnych mechanizmów, powodując znacznie silniejszą aktywację niż użyte osobno.^{10, 11}

Drugim założeniem, które przyjąłem w trakcie pracy, była możliwość wykorzystania specyficznych szlaków rozpoznawania i wchłaniania witaminy B₁₂ do zwiększenia biodostępności PpIX poprzez stworzenie związku będącego hybrydą B₁₂ i PpIX. Skuteczność takiej strategii dostarczania związków biologicznie czynnych do miejsca ich działania jest udokumentowana w literaturze naukowej.¹²



Rysunek 1.1 Struktury kobinamidu, protoporfiryny IX i witaminy B₁₂.

Realizacja tak postawionego celu obejmowała:

1. Zaprojektowanie połączeń hybrydowych pochodnych PpIX i kobinamidu.

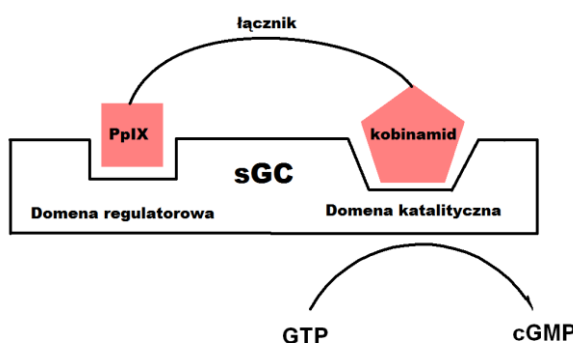
Czynnikami, które musiałem uwzględnić na tym etapie, były wpływ modyfikacji farmakoforów na aktywność biologiczną oraz dostępność metod selektywnej modyfikacji zarówno PpIX jak i kobinamidu.

2. Otrzymanie odpowiednio sfunkcjonalizowanych pochodnych kobinamidu i PpIX oraz opracowanie warunków selektywnej i wydajnej reakcji ich łączenia.

Jako kluczową reakcję w syntezie połączeń hybrydowych wybrałem katalizowaną solami miedzi (I) 1,3-dipolarną cykloaddycję azydku do alkinu (CuAAC). Taka strategia wymagała otrzymania pochodnych kobinamidu i PpIX posiadających grupę azydkową i terminalny alkin. Szczególnym problemem syntetycznym była kwestia insercji miedzi do luki makrocyklicznej porfiryny na końcowym etapie syntezy połączeń hybrydowych.

3. Syntezę serii połączeń kobinamidu z PpIX oraz przebadanie ich pod kątem aktywacji sGC.

Najważniejszym aspektem tej części badań było znalezienie zależności pomiędzy strukturą i długością łącznika pomiędzy jednostkami kobinamidu i PpIX, a zdolnością zaprojektowanych związków hybrydowych do stymulowania sGC (Rysunek 1.2). Badania biologiczne wykonane zostały przez Emila Martina w The University of Texas Health Science Center w Houston. Dzięki uprzejmości Emila Martina, część z przeprowadzonych badań wykonałem samodzielnie.



Rysunek 1.2. Schematyczna zasada postulowanego działania hybrydowych połączeń PpIX i kobinamidu.

4. Zaprojektowanie i otrzymanie pochodnych witaminy B₁₂ zdolnych do wejścia w reakcję CuAAC poprzez wprowadzenie w odpowiednie pozycje grupy azydkowej lub terminalnego alkinu.



W literaturze brak było doniesień na temat zastosowania CuAAC w funkcjonalizacji witaminy B₁₂. Odpowiednią modyfikację struktury witaminy B₁₂ oraz opracowanie efektywnej metody funkcjonalizacji na drodze CuAAC uznałem za atrakcyjne problemy syntetyczne.

5. Otrzymanie połączeń witaminy B₁₂ z PpIX na drodze CuAAC oraz badania ich właściwości biologicznych.

Chemiczne modyfikacje PpIX, kobinamidu i witaminy B₁₂ i ich wpływ na właściwości biologiczne, są tematyką wciąż stosunkowo słabo rozpoznaną i przez to atrakcyjną. Struktura tych związków jest złożona a ich reaktywność często trudna do przewidzenia, co znacznie komplikuje planowanie syntez i interpretację wyników. Z drugiej jednak strony mają one fascynująca skłonność do wchodzenia w wysoce chemoselektywne reakcje, o czym miałem okazję się przekonać.

“Bring me all the elements,

Spread them around my head”

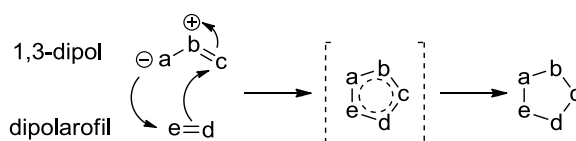
Bruce Dickinson, “The Alchemist”

2. Część literaturowa

2.1. 1,3-Dipolarna cykloaddycja azydków do alkinów

2.2.1. Wstęp

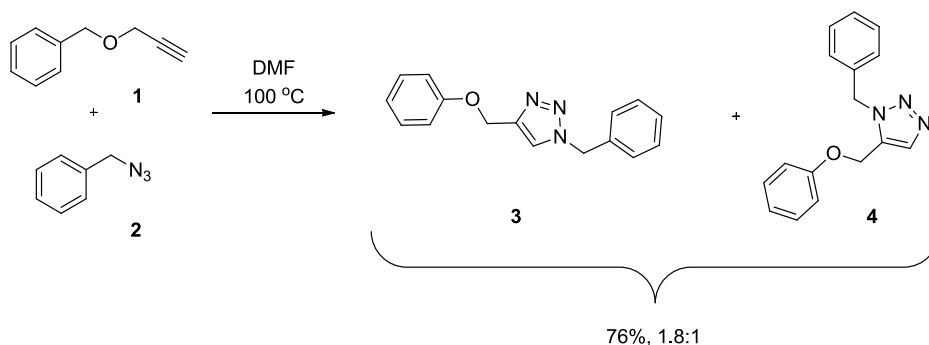
1,3-Dipolarna cykloaddycja jest perykliczną reakcją 1,3-dipoli z dipolarofilami prowadzącą do pięcioczłonowych układów cyklicznych (Schemat 2.1).^{13, 14} 1,3-Dipolami są związki posiadające układ czterech elektronów π zdelokalizowanych pomiędzy trzy sąsiadujące ze sobą atomy i rozdzielony ładunek (np. nitrony, azydki, diazozwiązki, ozon), natomiast dipolarofilem może być alken, alkin a także związek karbonylowy lub imina.



Schemat 2.1. 1,3-dipolarna cykloaddycja.

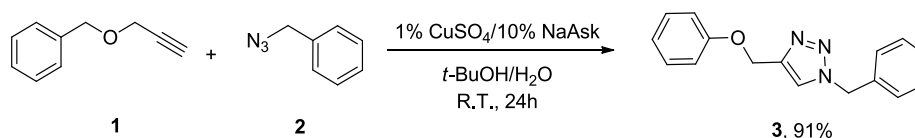
Reakcja ta została odkryta na przełomie XIX i XX wieku,¹⁵ lecz szeroko zakrojone, systematyczne badania przeprowadzone zostały przez Huisgena w latach 60. Na przestrzeni kilkunastu lat zdołał on rozbudować ten dział chemii, ustalić mechanizm, wprowadzić klasyfikację dipoli i opracować optymalne warunki prowadzenia tego typu reakcji.¹⁶ Prace Huisgena wyznaczyły nowe standardy w reakcjach cykloaddycji, jednak wiele ich wariantów, w tym reakcja azydków z alkinami, wymagały zastosowania dość drastycznych warunków i dawały mieszaniny regioizomerów (Schemat 2.2).

Pomimo tych niedogodności, termiczny wariant tej reakcji znalazł szereg zastosowań w syntezie pięcioczłonowych związków heterocyklicznych. Artykuł przeglądowy autorstwa Huisgena, dotyczący szczegółów mechanistycznych 1,3-dipolarnej cykloaddycji, kończy się słowami „It is possible, then, that future studies of 1,3-dipolar cycloadditions will bring to light further new colors and contours”.¹⁷



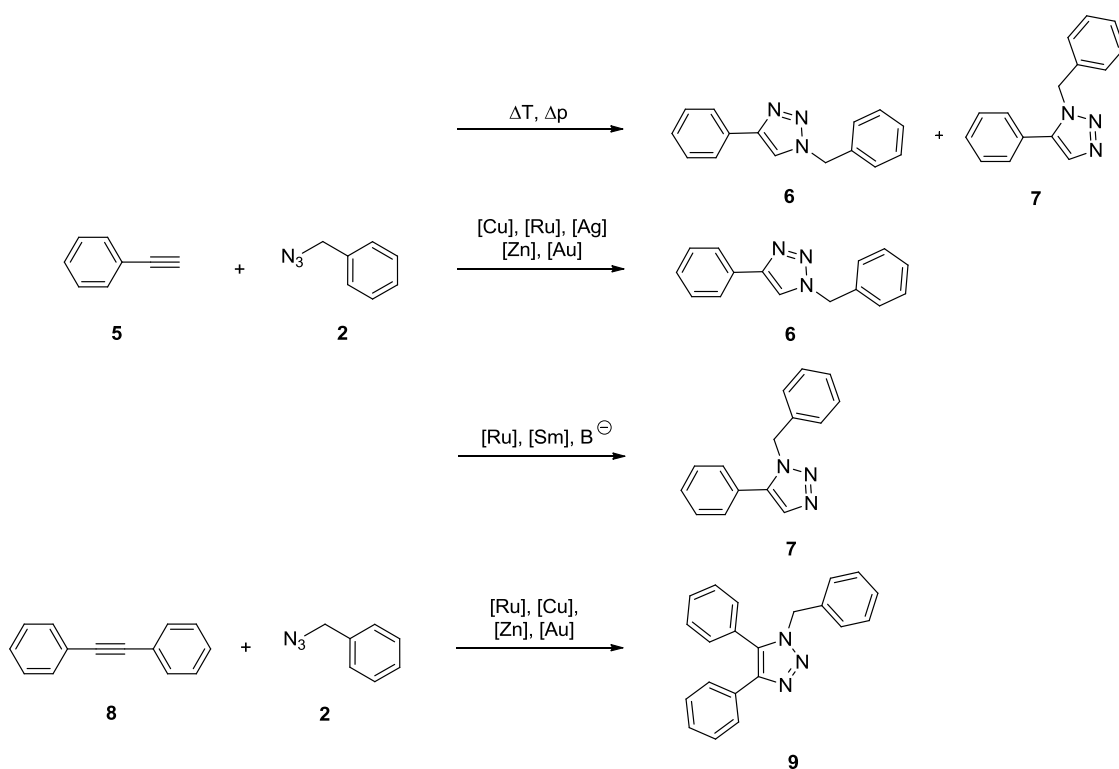
Schemat 2.2. Termiczny wariant 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydku do alkinu.

Te nowe kolory i kształty ujrzały światło dzienne na początku XXI wieku, kiedy to, niezależnie od siebie, Sharpless¹⁸ i Meldal¹⁹ odkryli katalityczny wariant 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydku do alkinu. W obecności katalitycznych ilości soli miedzi(I) następuje reakcja azydku z terminalnym alkinem prowadząca do 1,4-dipodstawionego-1,2,3-triazolu (z ang. *copper catalyzed azide-alkyne cycloaddition*, CuAAC, Schemat 2.3). Reakcja prowadzona w taki sposób nie wymaga ogrzewania, jest regio i chemoselektywna, daje doskonale, niemal ilościowe wydajności.¹⁸ To odkrycie wzbudziło ogromne zainteresowanie i doprowadziło do burzliwego rozwoju tej metodologii.



Schemat 2.3. Katalizowana miedzią (I) 1,3-dipolarna cykloaddycja azydku do alkinu.

Najnowsze doniesienia literaturowe wykazują, że również inne metale takie jak: ruten²⁰ srebro,²¹ samar,²² cynk²³ lub złoto²⁴ mogą być katalizatorami reakcji AAC (Schemat 2.4). Ponadto znane są warianty AAC przebiegające w obecności katalitycznej ilości zasady²⁵ oraz zupełnie spontaniczne reakcje AAC wymagające stosowania, specjalnie do tego celu przygotowanych, cyklicznych alkinów.²⁶



Schemat 2.4. Porównanie nowoczesnych sposobów prowadzenia reakcji AAC

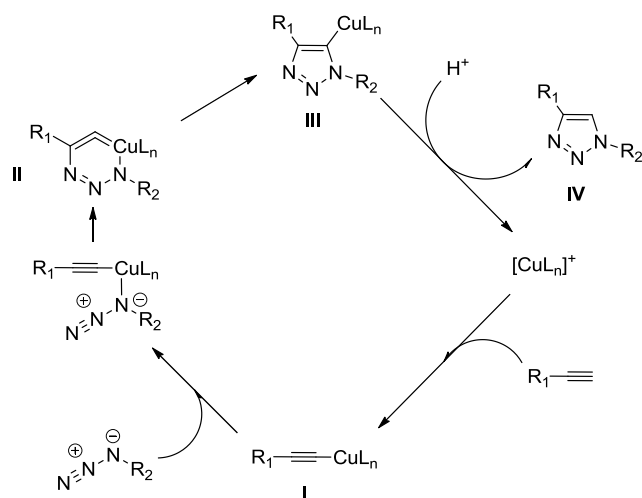
2.1.2. CuAAC

Początkowo badania nad CuAAC skupione były na wyjaśnieniu roli soli miedzi(I) i mechanizmu tej reakcji. Już pierwsza praca opisująca CuAAC zawierała rozważania mechanistyczne tłumaczące rolę miedzi w aktywacji substratów i jej udział w stanach przejściowych (Schemat 2.5).¹⁸ W przeciwieństwie do wariantu termicznego, który jest reakcją pericykliczną, CuAAC jest reakcją przebiegającą przez kilka stanów przejściowych.

Pierwotnie postulowany mechanizm zakładał wytworzenie, w pierwszym etapie, acetylenku miedzi **I**, do którego następnie koordynuje azydek. Cyklizacja przebiegająca poprzez nukleofilowy atak węgla na terminalny atom azotu azydku prowadzi do powstania sześciocząłowego związku metalacyklicznego zawierającego atom miedzi **II**. Następnie przebiega kontrakcja pierścienia, w wyniku której tworzy się triazol **III** miedziowany w pozycji 5. Protonowanie tego związku przejściowego prowadzi do powstania właściwego produktu **IV** i odtworzenia katalizatora miedziowego.

W toku dalszych badań, z wykorzystaniem technik spektroskopowych wspomaganym przez metody obliczeniowe, pojawiły się nowe dowody wskazujące na dużo bardziej złożony przebieg tej reakcji, jednak z zachowaniem pewnych kluczowych etapów opisanych w

mechanizmie Sharplessa (koordynacja azydku do kationu miedzi, protonowanie związku pośredniego **III**).²⁷⁻³⁰



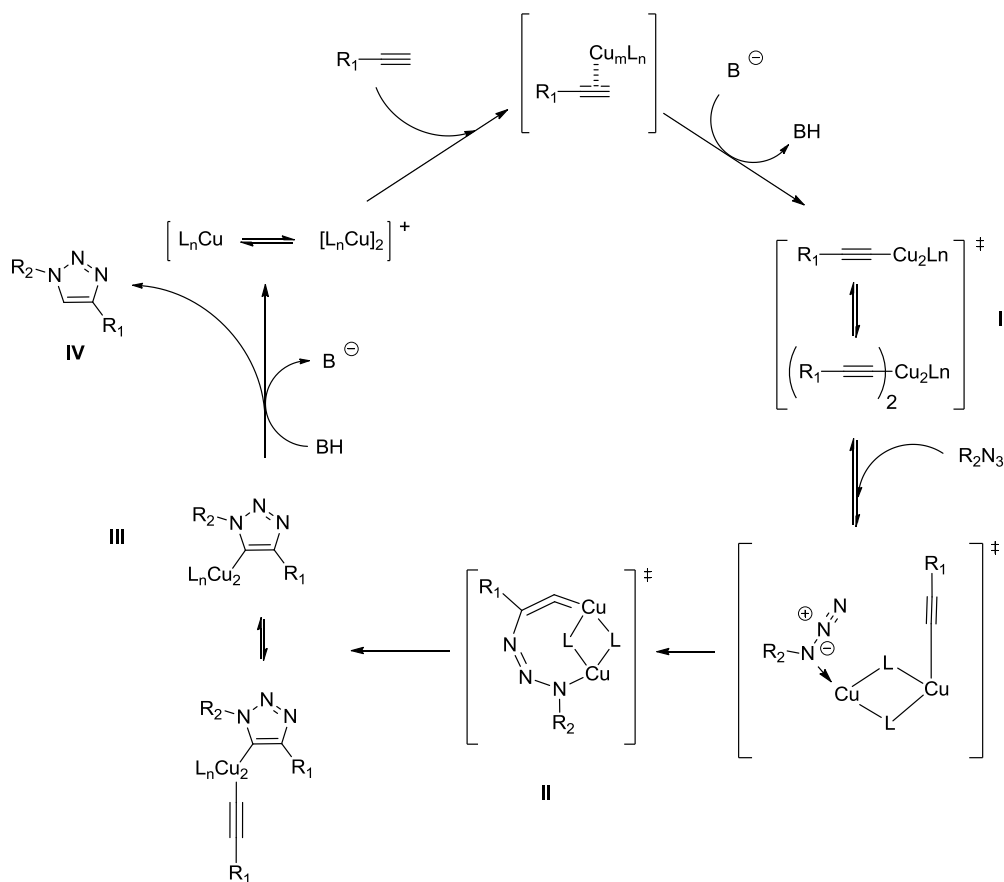
Schemat 2.5. Pierwsza propozycja mechanizmu CuAAC.

Obecnie uważa się, że w stanach przejściowych tej reakcji biorą udział dwa (lub więcej) kationy miedzi koordynowane cząsteczkami rozpuszczalnika lub odpowiednimi ligandami (Schemat 2.6).³¹ Pogląd, że związkami pośrednimi są acetylenki miedzi znajdujące się w skomplikowanych równowagach **I** (Schemat 2.6) przeważa obecnie nad postulatem dotyczącym występowania π -kompleksów miedzi z alkinem jako kluczowych stanów przejściowych.²⁷

W ostatnich latach ukazało się wiele prac przeglądowych bardzo szczegółowo opisujących różne aspekty CuAAC – od rozważań mechanistycznych²⁷ poprzez dyskusję stosowanych systemów katalitycznych^{32,33} aż do wielu monografii poświęconych zastosowaniu CuAAC w różnych dziedzinach chemii. Poniższe zestawienie ma na celu krótkie omówienie dostępnych metodologii i sposobów prowadzenia tego typu procesów.

Wykazano, że aktywną formą katalizatora tej reakcji jest Cu(I), w związku z czym większość prostych soli Cu(I) (np. halogenki), jej tlenki a nawet metaliczna miedź wykazują aktywność katalityczną w CuAAC.³² Związki i kompleksy Cu(I) łatwo się utleniają lub ulegają dysproporcjonowaniu, dlatego też wygodnym sposobem generowania Cu(I) *in situ* jest redukcja soli Cu(II) askorbinianem sodu (NaAsk) lub tris(karboksyetylo)-fosfiną. Układ katalityczny $\text{CuSO}_4/\text{NaAsk}$ jest najczęściej stosowany i z reguły bardzo skuteczny, ograniczony jednak do reakcji prowadzonych w wodzie lub mieszaninach wody z polarnymi rozpuszczalnikami organicznymi (np. alkoholami, DMF, THF).³² W toku tych badań stwierdzono korzystny wpływ różnych dodatków, takich jak: zasady, kwasy oraz ligandy zdolne do stabilizacji Cu(I), na efektywność CuAAC. Ich zastosowanie znacznie skraca czas reakcji, pozwala na zmniejszenie

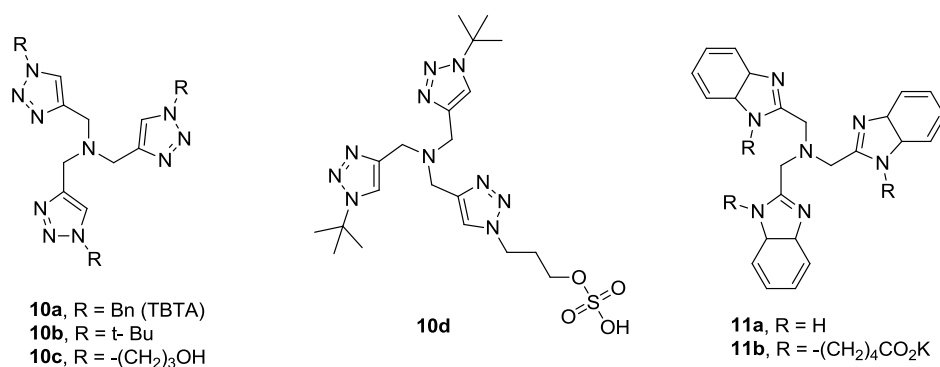
ilości użytego katalizatora, podnosi selektywność reakcji i tolerancję grup funkcyjnych na warunki reakcji oraz znacznie rozszerza zakres rozpuszczalników stosowanych w CuAAC.



Schemat 2.6. Mechanizm CuAAC.

I tak, zaobserwowano, że dodatek kwasów karboksylowych dramatycznie skraca czas reakcji z kilkunastu godzin do niespełna kilku minut. Efekt ten tłumaczono znacznym przyspieszeniem etapu protonowania związku pośredniego **III** (Schematy 2.5 i 2.6).³⁴ Wkrótce okazało się, że użycie karboksylanów Cu(I) zamiast generowania Cu(I) *in situ* pozwala na bardzo efektywne prowadzenie CuAAC, niemal niezależnie od użytego rozpuszczalnika.³⁵ Pełna konwersja i doskonałe wydajności uzyskiwano w ciągu kilkunastu minut, a reakcje prowadzone bez użycia rozpuszczalnika wymagały jedynie 3 sekund przy obecności 1 mol% katalizatora i 20 minut, jeżeli użyto go w ilości 0.01 mol%.

Trzeciorzędowe aminy były pierwszymi zasadami i/lub ligandami jakie wykorzystano do CuAAC.¹⁹ Obecnie układ CuI/*N,N*-diizopropyletyloamina jest jednym z najpopularniejszych układów katalitycznych stosowanych w CuAAC. Kolejne prace opisywały zastosowanie ligandów posiadających atomy azotu o hybrydyzacji sp^2 (iminy, różne pochodne imidazolu i oksazoliny, triazole), z których najlepiej zbadane i najszerszej stosowane są poli 1,2,3-triazole typu **10** (Rysunek 2.1).³⁶



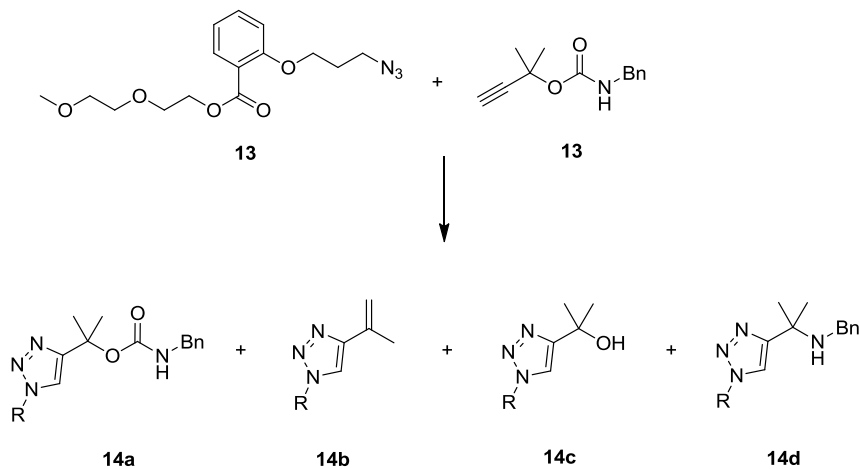
Rysunek 2.1 Ligandy azotowe stosowane w CuAAC.

Podstawą odkrycia ich zdolności do tworzenia wysoce aktywnego kompleksu z Cu(I) były obserwacje sugerujące, że CuAAC prowadzona dla niektórych klas substratów (np. polialkinów) ma charakter autokatalityczny.^{36, 37} Dokładne badania nad tym zjawiskiem doprowadziły do opracowania ligandów typu **10** (Rysunek 2.1), które, jak się okazało, doskonale stabilizują Cu(I). Zastosowanie tej klasy związków umożliwia zmniejszenie ilości soli miedzi do 0.25 mol%.³⁶ Ponadto strukturę liganda łatwo można modyfikować, a co za tym idzie, sterować jego właściwościami. Ligandy **10c** i **10d**³⁸ zawierające w swej strukturze polarne grupy funkcyjne umożliwiają efektywne prowadzenie CuAAC w wodzie, z wykorzystaniem tak skomplikowanych substratów jak białka, DNA a nawet całe, odpowiednio modyfikowane komórki. Podobne, wyjątkowo skuteczne, ligandy azotowe **11a-b** zaprojektowano w oparciu o jednostki benzimidazolowe (Rysunek 2.1). Ich zastosowanie umożliwia użycie katalizatora w ilości rzędu ppm.^{39, 40}

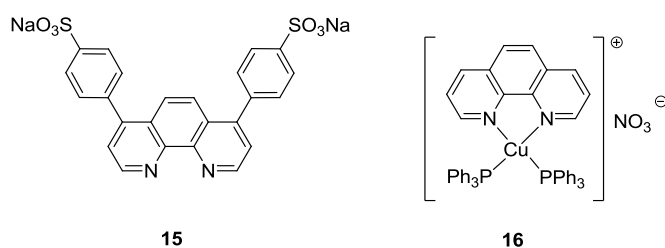
Kolejną klasą ligandów azotowych, które efektywnie promują CuAAC są pochodne pirydyny i fenantroliny. I tak, dodatek pirydyny lub 2,6-lutydyny zauważalnie zwiększa szybkość i selektywność reakcji dla związków zawierających ugrupowania uretanowe (Tabela 2.1, wiersz 3).⁴¹ Autorzy stwierdzili, że silna koordynacja kationu miedzi w kolejnych stanach przejściowych uniemożliwia jego oddziaływanie z grupą karbonylową i zapobiega osłabieniu wiązania węgiel-tlen mogącego prowadzić do rozkładu uretanu.

Opracowanie nowych, aktywnych układów katalitycznych do CuAAC, w szczególności poszukiwania nowych klas ligandów, było i jest przedmiotem intensywnych badań. Sulfonowana, rozpuszczalna w wodzie batofenantrolina **15** (Rysunek 2.2) znalazła zastosowanie w funkcjonalizacji biomolekuł na drodze CuAAC, wykazując lepszą skuteczność niż TBTA (**10a**).⁴² Najnowsze prace opisują zastosowanie trwałego, kationowego kompleksu $[\text{Cu}(\text{Phen})(\text{PPh}_3)_2]\text{NO}_3$ **16** (Rysunek 2.2).⁴³ Reakcje prowadzone wobec tego katalizatora nie wymagają użycia

Tabela 2.1. Wpływ pirydyny na chemoselektywność CuAAC dla odpowiednio sfuncjonalizowanych uretanów.



Katalizator/rozpuszczalnik	Wydajność 14a [%]	Wydajność 14b [%]	Wydajność 14c + 14d [%]
CuSO ₄ /NaAsk/woda	5	5	55
CuI/pirydyna/toluen	77	23	0
CuI/pirydyna	98	2	0



Rysunek 2.2. Pochodne fenantroliny stosowane jako ligandy w CuAAC.

Ligandy fosforowe, znane z klasycznej chemii metali przejściowych, okazały się również użyteczne w CuAAC. Zastosowanie (Ph₃P)₃CuBr lub (EtO)₃P·CuI z dodatkiem zasady (*N,N*-diizopropyletyloaminy lub DBU) i prowadzenie reakcji w reaktorze mikrofalowym pozwoliło na otrzymanie serii oligomerów acylowanych pochodnych cukrowych z bardzo dobrymi wydajnościami.⁴⁴

Bardzo ciekawą klasą związków będących katalizatorami CuAAC są kompleksy Cu(I) z *N*-heterocyklicznymi karbenami.^{45, 46} Kompleksy te są bardzo stabilne, mimo to efektywnie katalizują CuAAC, pozwalając na przeprowadzenie tej reakcji w różnych rozpuszczalnikach (w

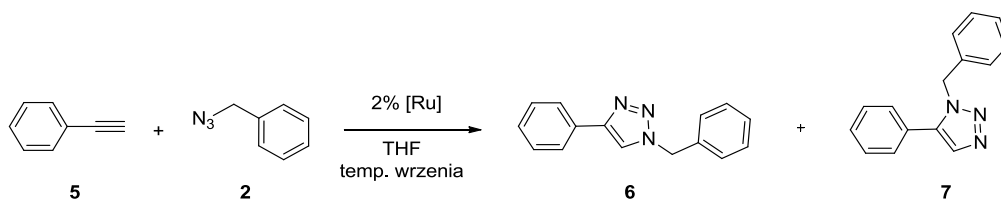
tym w wodzie) lub zupełnie bez rozpuszczalników. Ilość katalizatora wymagana do pełnej konwersji w temperaturze pokojowej nie przekracza 1 mol%, a przy prowadzeniu reakcji w 50 °C mogła zostać zredukowana do 0.005 mol%.

Najnowszym trendem w pracach nad sposobem prowadzenia CuAAC jest opracowanie katalizatorów osadzonych na nośnikach stałych, prowadzenie CuAAC w reaktorach przepływowych oraz młynach kulowych.⁴⁷

2.1.3. RuAAC

Równoległe do badań nad CuAAC, prowadzono prace nad zastosowaniem innych metali przejściowych w reakcji AAC. W 2005 roku Jia i Fokin, czerpiąc inspirację z bogatej chemii alkinów w warunkach katalizy związkami rutenu (cyklooligomeryzacje, cykloaddycje, metateza, reakcja Pausona-Khanda), opisali zastosowanie kompleksów rutenu(II) jako efektywnych katalizatorów AAC.²⁰

Tabela 2.2 Regioselektywność reakcji RuAAC w zależności od struktury katalizatora.



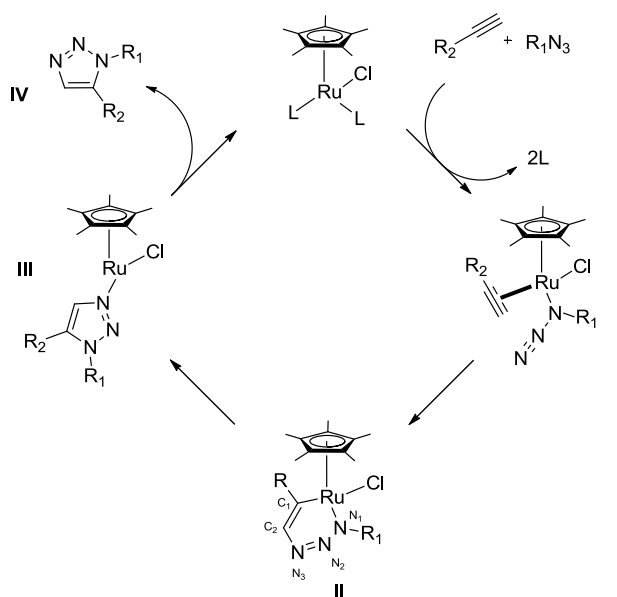
Katalizator [Ru]	Wydajność 6 [%]	Wydajność 7 [%]
Ru(AcO) ₂ (PPh ₃) ₂	46	0
RuH ₂ (CO)(PPh ₃) ₂	56	0
CpRuCl(PPh ₃) ₂	1	13
Cp*RuCl(PPh ₃) ₂	0	100
[Cp*RuCl] ₄	0	100

Intensywne badania wykazały, że w zależności od struktury ligandów w kompleksach rutenu(II), produktem reakcji jest 1,4- lub 1,5- podstawiony 1,2,3-triazol (Tabela 2.2).

Regioselektywność tej reakcji tłumaczy zaproponowany mechanizm.⁴⁸ W przypadku kompleksów nie posiadających ligandów typu cyklopentadienylowego, reakcja przebiega w sposób zbliżony jak w przypadku CuAAC, prowadząc do 1,4-dwupodstawionych triazoli (Tabela 2.2, wiersze 1 i 2).^{49, 50} Reakcje z zastosowaniem kompleksów posiadających ligand

pentametylocyklopentadienylowy (Cp*) dają wyłącznie izomer 1,5- z doskonałą wydajnością (wiersze 4 i 5).

Mechanizm RuAAC katalizowanej kompleksami z ligandem Cp* nie przewiduje tworzenia się acetylenków rutenu jako związków pośrednich, lecz oksydacyjne sprzężanie azydku z alkinem zachodzące w sferze koordynacyjnej rutenu, proces analogiczny do cyklooligomeryzacji alkinów (Schemat 2.7).⁴⁸ Odmienny mechanizm reakcji RuAAC w porównaniu do CuAAC, wyjaśnia reaktywność dwupodstawionych alkinów jako substratów w tej reakcji.



Schemat 2.7. Mechanizm RuAAC.

Dokładne badania eksperymentalne i wspomagane obliczeniami⁴⁸ wykazały, że aktywnym katalizatorem tej reakcji jest [Cp*RuCl]. Bogaty w elektrony ligand Cp* jest elementem struktury zapewniającym doskonałą regioselektywność przyłączenia rutenu do atomu węgla C1 terminalnego alkinu i co za tym idzie pełną regioselektywność reakcji atomu węgla C2 z azotem N3 azydku skoordynowanego przez azot N1 do centrum rutenowego (II, Schemat 2.7). Rolą pozostałych ligandów prekatalizatora Cp*RuCl₂ jest możliwie szybkie oddysocjowanie z wytworzeniem aktywnej formy katalizatora, dlatego trwalsze kompleksy wymagają prowadzenia reakcji w podwyższonych temperaturach, podczas gdy labilnymi ligandami dienowymi (cyklooktadien i norbornadien) są aktywne w temperaturze pokojowej. Cykloaddyccje azydków do alkinów wobec katalizatorów rutenowych mogą być prowadzone w różnych rozpuszczalnikach organicznych, przy czym najwyższe wydajności uzyskiwano prowadząc reakcje w dioksanie lub tetrahydrofuranie przy ilości katalizatora nieprzekraczającej 2 mol%. RuAAC okazała się być reakcją chemoselektywną, efektywną nawet dla wysoce sfunkcjonalizowanych substratów, stając się doskonałym uzupełnieniem CuAAC. Odmienny

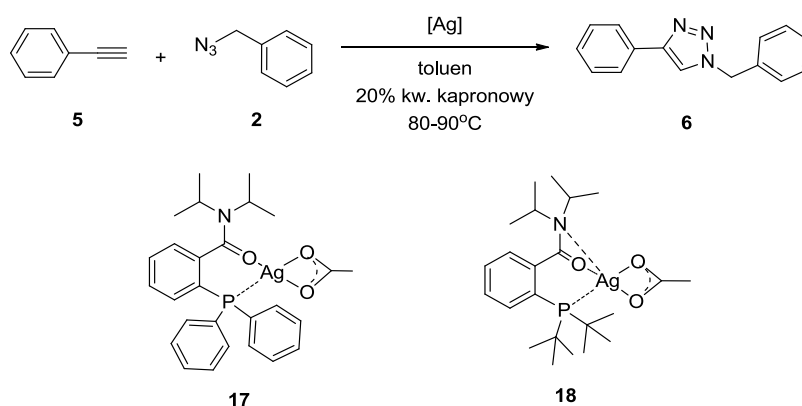
mechanizm RuAAC umożliwia użycie jako substratów dwupodstawionych alkinów dodatkowo rozszerzając zakres stosowalności. Najnowsze doniesienia literaturowe opisują sekwencję reakcji: substytucja nukleofilowa bromu anionem azydkowym/RuAAC prowadzone w jednym naczyniu (one-pot reaction)⁵¹ oraz warunki, w których na drodze RuAAC otrzymać można z doskonałą regioselektywnością 1,4-dwupostawione 1,2,3-triazole.⁵⁰

2.1.4. Zastosowanie innych metali przejściowych

W ostatnim okresie pojawiły się doniesienia o zastosowaniu kompleksów srebra,²¹ samaru,²² metalicznego cynku²³ i nanocząstek złota osadzonych na nośnikach stałych²⁴ jako katalizatorów AAC.

W 2011 McNulty opisał kompleks srebra **17** (Tabela 2.3), który okazał się dobrym katalizatorem reakcji azydków z terminalnymi alkinami, prowadzącej do 1,4-dwupodstawionych 1,2,3-triazoli.²¹ Zaproponowany mechanizm tej reakcji jest analogiczny do mechanizmu CuAAC. W celu efektywnego przeprowadzenia AgAAC konieczny jest dodatek kwasu karboksylowego, którego rolą jest protonowanie związków przejściowych prowadzące do utworzenia pożądanego triazolu i odtworzenia katalizatora. Pierwotne warunki AgAAC wymagały użycia niemal pięciokrotnego nadmiaru azydku, dużych ilości katalizatora **17** (20 mol%) oraz długiego czasu reakcji (Tabela 2.3, wiersz 1).²¹

Tabela 2.3. Porównanie aktywności katalizatorów AgAAC.

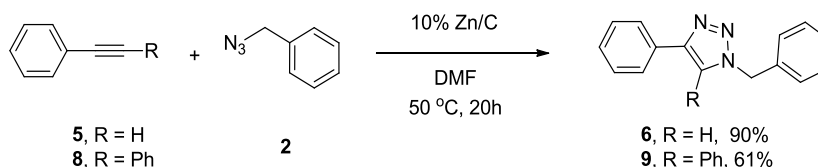


Katalizator	t [h]	Alkin : azydek	Wydajność [%]
17 , 20 mol%	48	1 : 4.8	98
18 , 2 mol%	24	1 : 1.04	98

Poprzez systematyczną modyfikację struktury ligandów zdołano otrzymać katalizator **18** (wiersz 2), w którym kation srebra jest znacznie efektywniej chelatowany.⁵² Skutkuje to większą trwałością kompleksu **18**, który nie rozkłada się w warunkach reakcji, może być z powodzeniem odzyskiwany i użyty ponownie.

Jego zastosowanie pozwala na użycie substratów w ilościach stechiometrycznych, 2 mol% katalizatora i skrócenie czasu reakcji o połowę. AgAAC jest reakcją ogólną, wydajną i może stać się alternatywą dla CuAAC w przypadkach, gdzie użycie związków miedzi jest wykluczone ze względu na ich toksyczność (np. chemia leków).

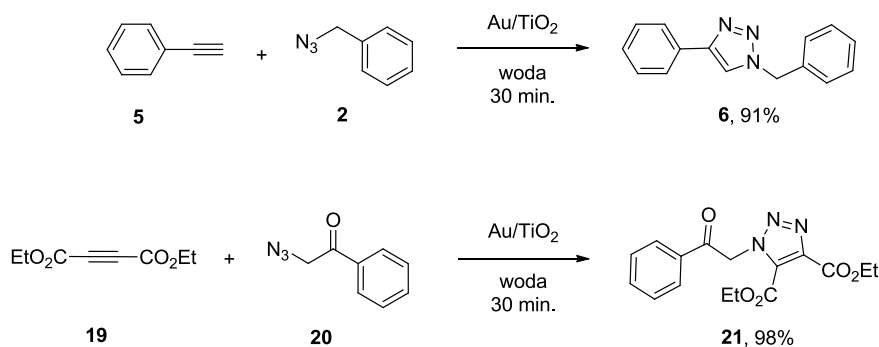
AAC, przebiegająca w obecności cynku osadzonego na węglu aktywnym (Zn/C), odkryta została w roku 2010 (Schemat 2.8).²³ Pomimo swego ograniczenia do alkinów z podstawnikiem arylowym, stanowi ciekawą alternatywę dla CuAAC. Heterogeniczny katalizator łatwo jest oddzielić od mieszaniny poreakcyjnej bez znaczącej utraty aktywności. Ponadto Zn/C katalizuje również reakcję azydków z dwupodstawionymi alkinami, co sugeruje zupełnie inny mechanizm reakcji niż w przypadku CuAAC.



Schemat 2.8. Reakcja ZnAAC.

Ostatnio wykazano, że reakcja AAC może być katalizowana kompleksami metali ziem rzadkich dając 1,5-dwupodstawione 1,2,3-triazole (analogicznie do RuAAC).²² Spośród przebadanych katalizatorów o ogólnym wzorze $\text{Ln}[\text{N}(\text{SiMe}_3)_2]_3$, kompleksy samaru odznaczały się największą aktywnością. Reakcja, chociaż interesująca z teoretycznego punktu widzenia, daje znacznie niższe wydajności niż RuAAC. Ponadto zakres stosowalności ograniczony jest do prostych azydków i alkinów nie posiadających reaktywnych grup funkcyjnych, a sama reakcja wymaga ściśle bezwodnych i beztlenowych warunków.

Najnowszy wariant AAC wykorzystuje nanocząstki złota osadzone na porowatych nanocząstkach TiO_2 (Schemat 2.9).²⁴ Tak zaprojektowany katalizator pozwala na przeprowadzenie cykloaddycji azydku do alkinu z doskonałą regioselektywnością prowadzącą wyłącznie do izomeru 1,4- nowo wytwarzanego 1,2,3-triazolu **6**. Reakcję, z powodzeniem, prowadzono w temperaturze pokojowej, w różnych rozpuszczalnikach (w tym w wodzie), a odzyskany katalizator nie tracił swej aktywności nawet po pięciokrotnym użyciu. Dodatkowymi zaletami tego rozwiązania są: bardzo mała ilość użytego katalizatora (rzędu ppm złota) oraz możliwość zastosowania dwupodstawionych alkinów jako substratów.



Schemat 2.9. Reakcja AuAAC.

2.1.5. AAC katalizowana zasadą

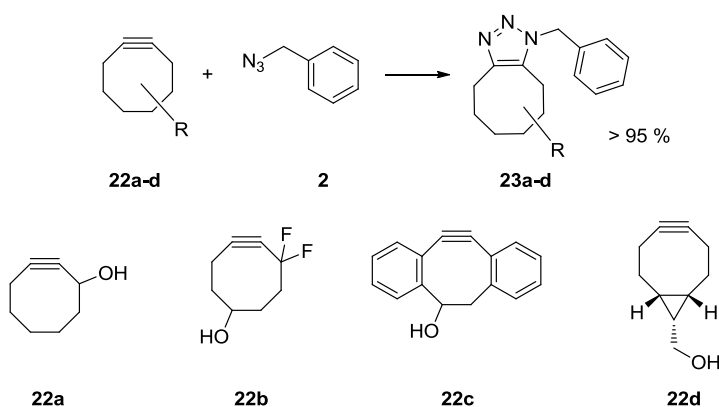
Fokin opracował katalityczny wariant reakcji azydków z terminalnymi alkinami nie wymagający użycia związków metali przejściowych.²⁵ Okazało się, że pochodne fenyloacetyleny reagują z azydkami aromatycznymi w obecności katalitycznej ilości zasady dając 1,5-dwupodstawione 1,2,3-triazole z wydajnościami rzędu 80-90%. Dla opisanej przemiany zaproponowany został mechanizm zakładający deprotonowanie terminalnego alkinu i następującą reakcją z elektrofilowym azotem N₃ azydku, zakończoną cyklizacją typu *5-endo-dig* i protonowaniem anionu produktu kolejną cząsteczką fenyloacetyleny. Zasadami stosowanymi w tej reakcji są alkoholany lub wodorotlenek tetrabutylamonowy. Reakcja przebiega w temperaturze pokojowej i wymaga jedynie 10 mol% zasady. Pomimo tego, że ta metodologia ograniczona jest do prostych substratów, jest ciekawą alternatywą dla RuAAC.

2.1.6. SPAAC

Nowoczesnym, niekatalitycznym wariantem reakcji azydków z alkinami jest SPAAC (ang. *Strain Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition*) opracowana przez Bertozzi.²⁶ Odpowiednio zaprojektowane pochodne cyklooktynu **22a-d** (Schemat 2.10), ze względu na duże naprężenie wiązania potrójnego, spontanicznie reagują z azydkiem dając w efekcie w pełni podstawiony 1,2,3-triazole **23a-d** (Schemat 2.10). Ze względu na wysoką reaktywność naprężonych cyklooktynów, przeprowadzenie tej reakcji nie wymaga podwyższonej temperatury, wysokich stężeń ani żadnych zewnętrznych dodatków (katalizatorów, zasad, kwasów) a wydajności są zazwyczaj ilościowe.

Niestety, synteza odpowiednich cyklooktynów **22a-d** jest z reguły wieloetapowa i skomplikowana, co utrudnia zastosowanie SPAAC w chemii organicznej.²⁶ Niemniej jednak, dla potrzeb biologii i biochemii, gdzie operuje się niewielkimi ilościami reagentów, SPAAC jest

reakcją niemal doskonałą – ani cyklooktyn ani azydek nie reagują z grupami funkcyjnymi obecnymi w biocząsteczkach i nie zakłócają ich funkcjonowania, co zapewnia doskonałą selektywność SPAAC nawet w warunkach fizjologicznych (reakcja bioortogonalna).⁵³



Schemat 2.10. Przebieg SPAAC oraz przykładowe struktury cyklooktynów używanych do tej reakcji.

Opisano wiele przykładów wykorzystania SPAAC do wybarwienia odpowiednio sfunkcjonalizowanych enzymów, białek, komórek i innych obiektów będących w obszarze zainteresowania biologów. Spektakularnym przykładem zastosowania tej reakcji jest przeprowadzenie jej w żywym organizmie do badania lokalizacji produktów metabolizmu oraz wykrywania zmian nowotworowych.⁵³

Obecnie intensywne prace syntetyczne skupione są przede wszystkim na zaprojektowaniu cyklooktynów, które byłyby łatwe w syntezie, stabilne, a jednocześnie reaktywne w SPAAC.⁵⁴

2.1.7. Podsumowanie

Od czasu opublikowania pierwszych prac dotyczących CuAAC nastąpił niezwykle burzliwy rozwój tego działu chemii. W ciągu niewiele ponad dekady zostały opracowane efektywne katalizatory umożliwiające syntezę zarówno 1,4- jak i 1,5- dwupodstawionych 1,2,3-triazoli. Stosunkowo łatwa synteza zarówno terminalnych alkinów jak i azydków, łagodne warunki oraz wysoka tolerancja na obecność nawet reaktywnych grup funkcyjnych uczyniły z katalicznego wariantu AAC (szczególnie CuAAC) doskonałą reakcją do łączenia nawet bardzo skomplikowanych struktur. Różne warianty AAC stosowane są z powodzeniem w wielu dziedzinach chemii gdzie zachodzi potrzeba efektywnego i trwałego połączenia dwóch jednostek. Tymi fragmentami mogą być nie tylko związki organiczne, ale również tak skomplikowane i delikatne układy jak monowarstwy, nanorurki, maszyny molekularne, białka, enzymy a nawet żywe komórki.

Z niezwykle bogatej literatury na temat AAC wynika, że najwięcej możliwości stwarza obecnie kataliza związkami miedzi i rutenu. Dynamiczny rozwój i ciągle zainteresowanie problemem opracowania nowych, efektywnych katalizatorów rodzi nadzieję, że w niedalekiej przyszłości odkryte zostaną warunki umożliwiające równie efektywne przeprowadzenie AAC z użyciem innych, mniej toksycznych metali.

2.2. Zastosowanie katalitycznych AAC w syntezie związków biologicznie czynnych

2.2.1. Wstęp

Związki biologicznie czynne zawierające w swojej strukturze 1,2,3-triazol znane były na długo przed odkryciem katalitycznych wariantów reakcji terminalnych alkinów z azydkami.⁵⁵ Niektóre z tych związków przeszły etap badań klinicznych i są handlowo dostępne. Synteza takich związków opierała się zazwyczaj na reakcjach termicznych prowadzących z reguły do mieszaniny izomerów. Od momentu odkrycia CuAAC i RuAAC wzrosło zainteresowanie reakcją azydków z alkinami jako doskonałego, praktycznego narzędzia do syntezy układów triazolowych.⁵⁶ Do niewątpliwych zalet tych reakcji należą:

- wysokie wydajności,
- chemoselektywność i możliwość kontroli regioselektywności otrzymywanych 1,2,3- triazoli,
- dostępność katalizatorów,
- łagodne warunki prowadzenia reakcji, niewymagające wysokich temperatur ani bezwodnych i beztlenowych warunków,
- możliwość prowadzenia reakcji w wodzie.

Uniwersalność reakcji CuAAC i RuAAC pozwala na zastosowanie ich na wczesnych etapach badań nad nowymi związkami o potencjalnej aktywności biologicznej. Oba warianty okazały się bardzo użyteczne w poszukiwaniu nowych struktur wiodących oraz modyfikacji już istniejących związków o potwierdzonym działaniu biologicznym.^{57, 58} Ponadto AAC jest doskonałym narzędziem do łączenia różnych (często skomplikowanych) farmakoforów w syntezie i optymalizacjach struktury cząsteczek hybrydowych.

Zastosowanie katalitycznych wariantów AAC, a w szczególności CuAAC, w syntezie związków biologicznie czynnych jest przedmiotem wielu artykułów przeglądowych, z reguły ograniczonych do konkretnych klas związków np. peptydów⁵⁹ lub cukrów.⁶⁰ W trakcie pisania niniejszej pracy ukazał się obszerny artykuł, który opisuje zastosowanie AAC w syntezie związków biologicznie czynnych klasyfikując je pod kątem ich docelowych działań terapeutycznych.⁵⁸ Niniejszy przegląd nie ma na celu powielania informacji zawartych w wyżej wymienionych monografiach, lecz zwięzłe przedstawienie szerokich możliwości, jakie stwarza

AAC w syntezie związków biologicznie czynnych niemal niezależnie od ich struktury, stopnia jej skomplikowania i zaprojektowanej funkcji.

2.2.2. Właściwości 1,2,3-triazolu

1,2,3-Triazol (Rysunek 2.3) jest pięcioczłonowym, heterocyklicznym związkiem aromatycznym. Ze względu na obecność wolnych par elektronowych na atomach azotu N2 i N3 posiada on właściwości akceptora wiązań wodorowych.¹⁴ Z kolei duży moment dipolowy (rzędu 5D) powoduje polaryzację wiązania C-H do tego stopnia, że może on brać udział w tworzeniu wiązań wodorowych w charakterze donora. Odległości pomiędzy podstawnikami w 1,4- i 1,5-podstawionym 1,2,3-triazolu wynoszą odpowiednio 5.0 Å i 2.4 Å.



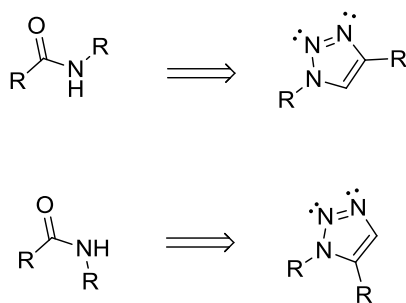
Rysunek 2.3. Geometria 1,2,3-triazolu.

Wymienione cechy strukturalne powodują, że podstawione 1,2,3-triazole mogą zastępować różne grupy funkcyjne, podobne pod względem geometrii i polarności.⁵⁷ Do takich grup zaliczyć można między innymi: grupę amidową, jednostkę furanu oraz wiązanie podwójne węgiel – węgiel. Właściwość ta jest często wykorzystywana w badaniach nad optymalizacją struktur wiodących, gdzie układ 1,2,3-triazolu służy jako łatwy w syntezie zamiennik wyżej wymienionych grup funkcyjnych lub jako alternatywa dla tworzenia grupy amidowej w łączeniu większych fragmentów prowadzących do finalnego związku.

1,2,3-Triazol jest układem bardzo trwałym, odpornym na działanie zarówno kwasów i zasad oraz utleniaczy i reduktorów. Odznacza się też wysoką trwałością termiczną. Z punktu widzenia chemii związków biologicznie czynnych, bardzo ważną właściwością triazolu jest jego wyjątkowa odporność na hydrolizę w warunkach fizjologicznych.⁶¹

2.2.3. Triazol jako zamiennik grupy amidowej

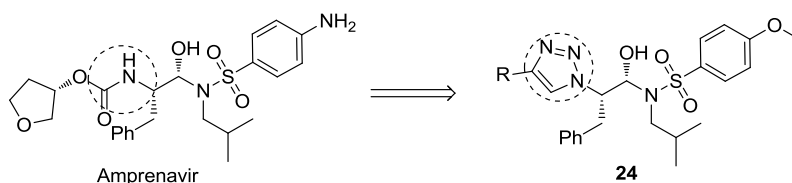
Geometria i moment dipolowy 1,2,3-triazolu powodują, że może być on stosowany jako odpowiednik grupy amidowej. Ułożenie podstawników oraz zwrot wektora momentu dipolowego w 1,4-dwupodstawionym triazolu powodują jego podobieństwo do *trans* amidów, natomiast 1,5-podstawione triazole z powodzeniem mogą zastąpić *cis* amidy (Rysunek 2.4).^{57, 61}



Rysunek 2.4. Porównanie geometrii 1,2,3-triazoli i amidów.

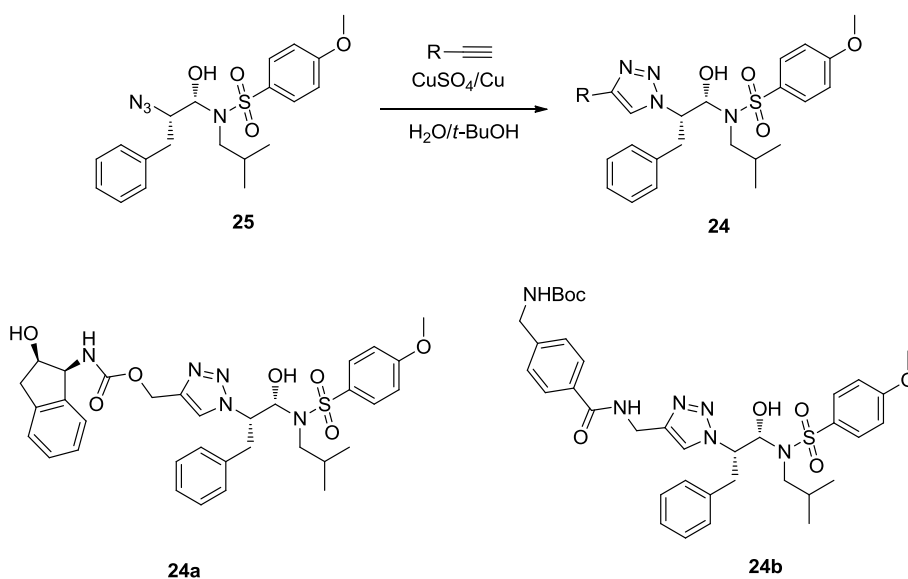
Cechy te, w połączeniu z łatwością syntezy triazoli na drodze katalitycznej AAC wywołały duże zainteresowanie wśród chemików zajmujących się syntezą związków biologicznie czynnych.

W 2003 roku Brik opisał serię związków będących inhibitorami proteazy HIV-1.⁶² Związki te zaprojektowane zostały w oparciu o strukturę znanego, handlowo dostępnego leku Amprenawiru (Rysunek 2.5). Celem autorów była szybka i efektywna synteza analogów typu **24** o różnorodnej budowie jednak z zachowaniem kluczowych elementów struktury wiodącej. Głównym założeniem było zastąpienie jednego z wiązań amidowych 1,2,3-triazolem w celu łatwej i szybkiej syntezy dużej biblioteki związków (Rysunek 2.5).



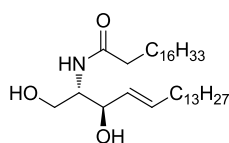
Rysunek 2.5. Struktura aprenawiru i jego analogów.

Substratem do syntezy analogów był związek **25** będący prawą częścią struktury wiodącej (Schemat 2.11). Reakcja z odpowiednimi alkinami przeprowadzona była w obecności CuSO_4 i metalicznej miedzi w mikroreaktorach. Związki **24a** i **24b**, które we wstępnych badaniach okazały się najaktywniejsze, zsyntetyzowane zostały w skali preparatywnej i szczegółowo przebadane, wykazując IC_{50} odpowiednio 6 nM i 13 nM, czyli o dwa rzędy wielkości niższe niż substraty, z których zostały otrzymane i porównywalne z handlowo dostępnymi lekami.^{62, 63}



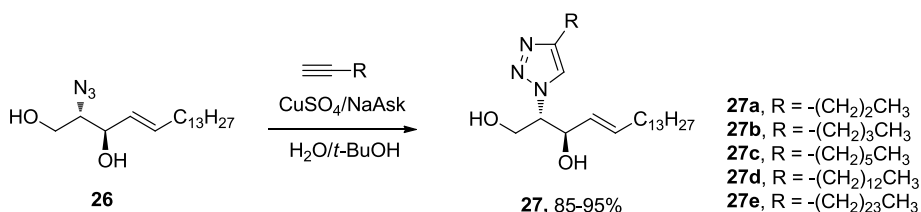
Schemat 2.11. Synteza analogów aprenawiru.

Wiązanie amidowe zostało z powodzeniem zastąpione przez triazol w syntezie analogów ceramidu (Rysunek 2.6), lipidowego związku regulującego procesy komórkowe.⁶⁴ Zdolność do indukowania apoptozy niektórych komórek rakowych wzbudziło zainteresowanie ceramidem jako potencjalnym lekiem przeciwnowotworowym.



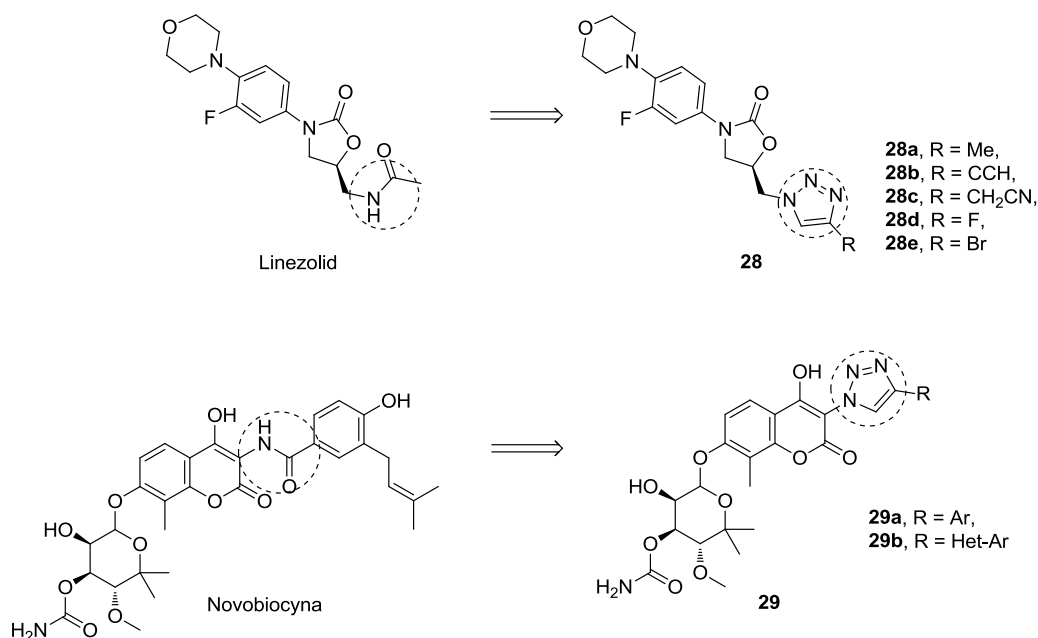
Rysunek 2.6. Struktura ceramidu.

Poważnym ograniczeniem w jego stosowaniu, okazała się niepożądana enzymatyczna hydroliza wiązania amidowego w warunkach fizjologicznych. Lee ze współpracownikami postanowili zastąpić grupę amidową w strukturze ceramidu, dużo trwalszym ugrupowaniem 1,2,3-triazolu. W tym celu zaprojektowali serię triazolowych analogów różniących się długością łańcucha alifatycznego. Związkiem wyjściowym do wszystkich syntez był drugorzędowy azydek **26** (Schemat 2.12), który poddano reakcji CuAAC z terminalnymi alkinami alifatycznymi w obecności CuSO₄/NaAsk. Dawał on pożądane produkty **27a-e** z wysokimi wydajnościami.



Schemat 2.12. Synteza analogów ceramidu.

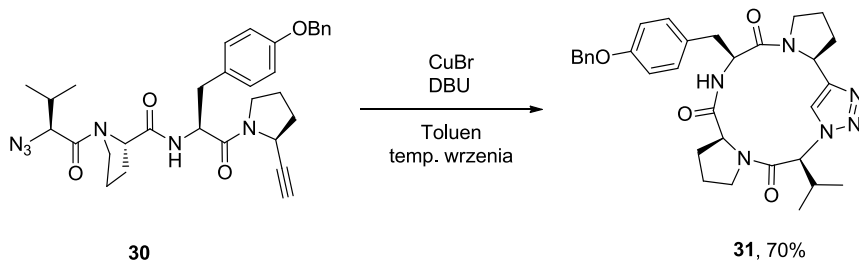
W toku badań biologicznych okazało się, że zsyntetyzowane analogi mają silniejsze działanie przeciwnowotworowe niż wyjściowy ceramid. Kluczowym elementem struktury odpowiedzialnym za wysoką cytotoksyczność był krótszy niż w ceramidzie łańcuch alkilowy zawierający 3 atomy węgla (związek **27a**). Dalsze badania nad tymi związkami wykazały, że analogi z krótszym podstawnikiem lepiej penetrują błony komórkowe.



Rysunek 2.7. Struktura Linezolidu, Novobiocyny i ich analogów.

Podobna strategia zastąpienia grupy amidowej pierścieniem triazolowym zastosowana została do syntezy analogów m.in. Linezolidu^{65, 66} i Novobiocyny⁶⁷ (Rysunek 2.7). W obydwu wypadkach, otrzymane związki typu **28** i **29** były trwalsze i wykazywały podobną lub wyższą aktywność biologiczną niż struktury pierwotne.

W chemii peptydów CuAAC znalazła szerokie zastosowanie przede wszystkim do łączenia większych fragmentów peptydowych, ale również jako narzędzie do ich cyklizacji, sieciowania i funkcjonalizacji łańcuchów bocznych.^{59, 68, 69} Szczególnie użyteczne okazało się wykorzystanie CuAAC do reakcji makrocyklizacji krótkich peptydów, która jest trudna do przeprowadzenia klasycznymi metodami. Maarsveen przeprowadził cyklizację odpowiednio sfunkcjonalizowanego tetrapeptydu **30** w celu syntezy analogu cyklicznego inhibitora tyrozynazy wykorzystywanego min. w terapiach dermatologicznych (Schemat 2.13).⁷⁰ Cyklizacja na drodze CuAAC wymagała zastosowania wysokiej temperatury i dodatku 3 ekwiwalentów DBU. Jednak pomimo stosunkowo drastycznych warunków reakcji, pożądaný produkt **31** udało się otrzymać z wysoką wydajnością 70%.



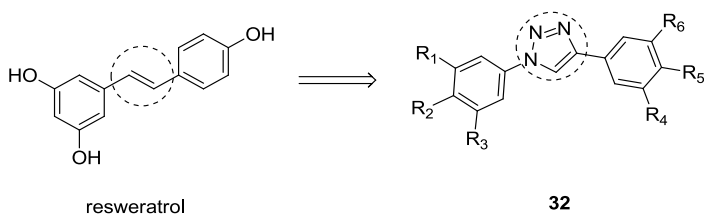
Schemat 2.13. Zastosowanie CuAAC do makrocyklizacji analogów peptydów.

Również większe pierścienie peptydowe można zamykać efektywnie z wykorzystaniem tej metodologii.⁶⁹ Ważnym aspektem makrocyklizacji z użyciem CuAAC jest staranna optymalizacja warunków reakcji, przede wszystkim ilości użytego katalizatora. Z doniesień literaturowych wynika, że zastosowanie małych ilości katalizatora prowadzi do powstawania cyklicznego dimeru jako produktu głównego, natomiast zastosowanie ponad 50 mol% źródła Cu(I) pozwala na efektywne prowadzenie reakcji makrocyklizacji.⁶⁹

Łączenie dłuższych fragmentów peptydowych z użyciem AAC znalazło szerokie zastosowanie ze względu na łagodne warunki, duże wydajności oraz zachowanie konfiguracji centrów stereogenicznych.⁵⁹ Problem zastosowania CuAAC, gdzie wytworzony 1,2,3-triazol jest zamiennikiem wiązania amidowego w chemii peptydów jest tematem bardzo szerokim i jego dokładne omówienie znacznie przekracza zakres niniejszego przeglądu literaturowego.

2.2.4. Triazol jako zamiennik wiązania podwójnego węgiel – węgiel

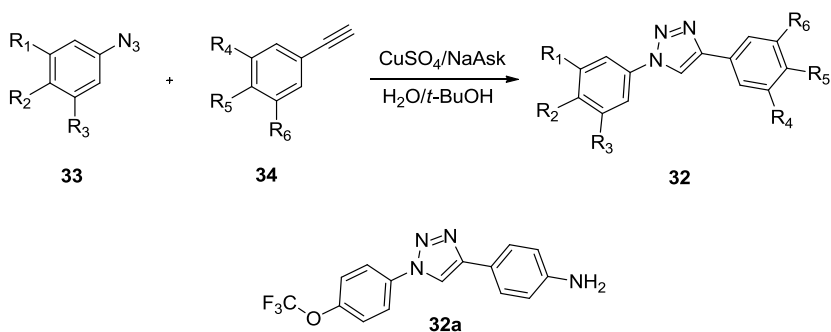
Wzajemne rozmieszczenie podstawników w 1,4-dwupodstawionym 1,2,3 triazolu jest zbliżone do *trans* olefiny. Właściwość ta wykorzystana została w kombinatoryjnej syntezie analogów resweratrolu – naturalnej pochodnej stilbenu występującej m.in. w czerwonym winie (Rysunek 2.8).⁷¹ Resweratrol ma korzystne działanie na układ krążenia i układ nerwowy, działa przeciwzapalnie oraz może być stosowany w profilaktyce przeciwnowotworowej.



Rysunek 2.8. Struktura resweratrolu i jego analogów.

Wykorzystując techniki syntezy kombinatoryjnej, Tron zsyntetyzował bibliotekę analogów resweratrolu o ogólnej strukturze typu **32**, w której wiązanie podwójne węgiel – węgiel

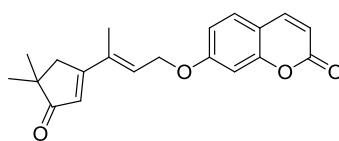
zastąpione zostało ugrupowaniem 1,2,3-triazolowym (Schemat 2.14). Użycie standardowych warunków CuAAC ($\text{CuSO}_4/\text{NaAsK}$) pozwoliło na otrzymanie serii 74 związków z różnymi podstawnikami w pierścieniach fenylowych. Autorzy nie podali wydajności otrzymanych związków, lecz zastrzegli, że wszystkie były wydzielone i oczyszczone wyłącznie poprzez krystalizację do czystości ponad 95%.



Schemat 2.14. Synteza analogów resweratrolu.

Spośród bogatej biblioteki otrzymanych związków, najaktywniejszy związek **32a** wykazał $\text{IC}_{50} > 10$ nM w testach na cytotoksyczność wobec komórek raka piersi, trzy rzędy wielkości niższy niż w przypadku samego resweratrolu. Autorzy nie przeprowadzili dokładnych badań nad zależnością aktywności od struktury.

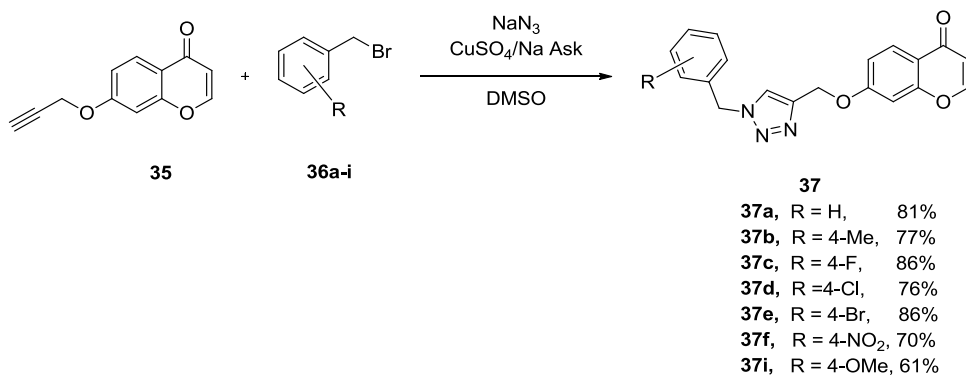
Podobne podejście zastosowano w syntezie analogów geiparvarinu (Rysunek 2.9).⁷² Jest to związek naturalny, występujący w liściach wierzby australijskiej i ma potwierdzone właściwości przeciwnowotworowe. Bazując na swoich wcześniejszych odkryciach, Li i współpracownicy zaprojektowali syntezę analogów geiparvarinu zastępując ugrupowanie kumaryny jednostką chromonu **35**, a eter typu allilowego ugrupowaniem 1-benzylotriazolowym.



Geiparvarin

Rysunek 2.9. Struktura geiparvarinu.

Synteza tych związków zawierała bardzo ciekawe rozwiązanie: azydki benzytowe generowane były *in situ* i bez wydzielania poddawane reakcji z 7-propargiloksy-beznopin-4-onem (**35**) (Schemat 2.15). Jako rozpuszczalnika użyto DMSO, który jest idealnym rozwiązaniem w przypadku reakcji zachodzących według mechanizmu $\text{S}_{\text{N}}2$. Ponadto jego wysoka polarność zapewnia rozpuszczalność katalizatora CuAAC w ilościach wystarczających do efektywnego przeprowadzenia cykloaddykcji. Obie te reakcje zachodziły w jednym naczyniu, bez rozdzielania etapów substytucji i CuAAC w czasie.

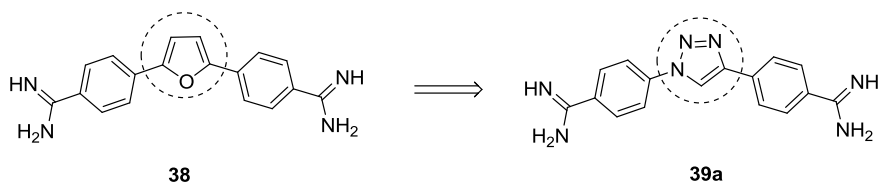


Schemat 2.15. Synteza analogów geiparvarinu.

Wydajności otrzymanych pochodnych typu **37** wahały się od 61 do 85%. Wszystkie otrzymane związki odznaczały się dużo większą trwałością niż geiparvarin i porównywalną cytotoksycznością wobec komórek raka szyi i raka wątroby oraz bardzo niską toksycznością wobec zdrowych komórek.

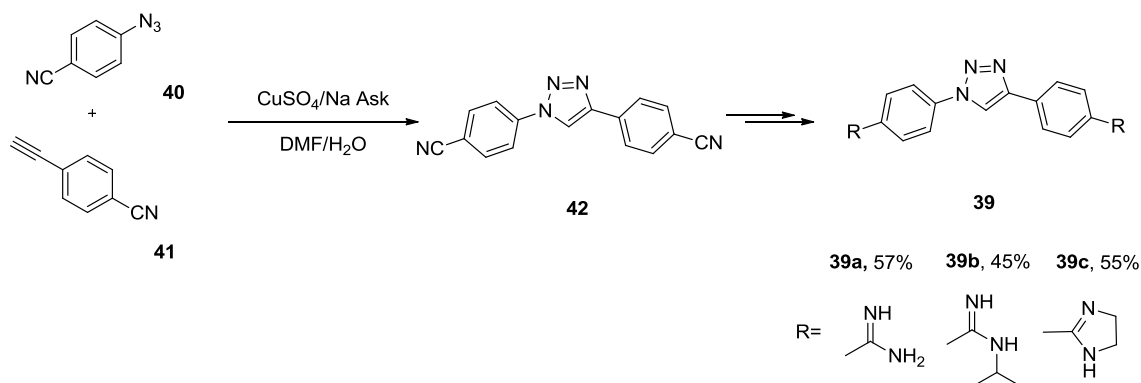
2.2.5. Triazol jako zamiennik furanu

1,2,3-Triazol, ze względu na swoje geometryczne podobieństwo do innych pięciocłonowych pierścieni heteroaromatycznych, z powodzeniem jest stosowany jako ich zamiennik. W oparciu o tę właściwość, Tidwell przeprowadził syntezę analogów furamidyny **38** (Rysunek 2.10), doustnego leku przeciw pierwotniakom, który obecnie znajduje się w trzeciej fazie badań klinicznych.⁷³



Rysunek 2.10. Struktura furamidyny i jej 1,2,3-triazolowego analogu.

W zaprojektowanych związkach, pierścień furanu zastąpiony został znacznie trwalszym i łatwiejszym w syntezie triazolem. Kluczowy etap syntezy biblioteki pochodnych polegał na addycji azydków fenylowych (**40**) do fenylloaetylenów z podstawnikami –CN (**41**) w różnych pozycjach (Schemat 2.16, na schemacie uwzględniono trzy najprostsze analogi furamidyny). Kolejne etapy polegały na przekształceniu grup nitrylowych w amidyny, w reakcji z odpowiednimi aminami w warunkach kwasowych.



Schemat 2.16. Synteza analogów furamidyny.

Wszystkie z 60 otrzymanych związków przebadano *in vitro* przeciwko różnym gatunkom chorobotwórczych pierwotniaków. Najaktywniejsze z nich przebadano również *in vivo*. Wykazano, że wymagana dawka konieczna do całkowitego wyleczenia zainfekowanych myszy wynosiła 1mg/kg.

2.3. Zastosowanie AAC do syntezy związków hybrydowych

2.3.1. Związki hybrydowe

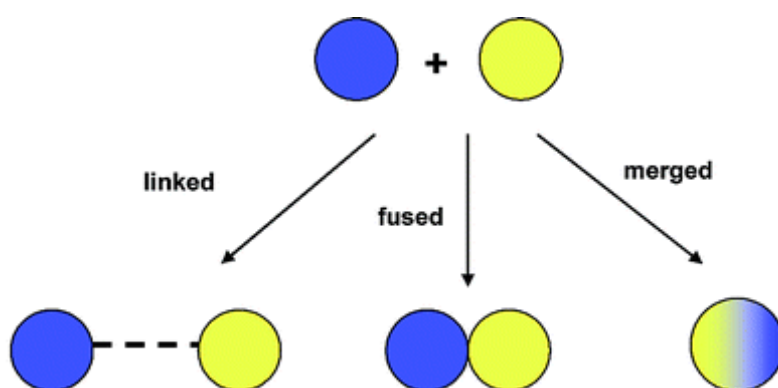
Strategia poszukiwania nowych leków polegająca na jednoczesnej regulacji funkcjonowania więcej niż jednego docelowego obiektu działania substancji czynnych nosi nazwę polifarmakologii. Koncepcja ta przełamuje utarty schemat, w którym poszukiwanie leków ukierunkowane jest na jeden konkretny obiekt (enzym, receptor, białko itp.), którego dysfunkcja powoduje stan chorobowy.^{10, 11}

Istnieją trzy możliwe podejścia do polifarmakologii.¹⁰ Najstarsze polega na podawaniu pacjentom kombinacji różnych leków jednocześnie („koktajl leków”), np. pod postacią kilku tabletek. Skuteczność takiej terapii wymaga od pacjentów ścisłej dyscypliny. Nieodpowiednia proporcja dawek leków może powodować efekty uboczne np. zaburzone wchłanianie, zmiany w ich metabolizmie lub nieprzewidziane oddziaływania substancji czynnych pomiędzy sobą. Nowsze podejście opiera się na przygotowaniu leków zawierających kilka substancji czynnych. Optymalna proporcja składników w tak zaprojektowanych lekach jest szczegółowo przebadana, co minimalizuje ryzyko przedawkowania. Na rynku dostępne są różne leki wieloskładnikowe, np. Caduet (kombinacja amlodypiny i atorwastatyny) i Vytorin (kombinacja ezetimibu i symwastatyny), oba skuteczne w terapii miażdżycy.

Wadą rozwiązań bazujących na mieszaninach substancji czynnych są długotrwałe i kosztowne badania kliniczne, mające na celu ustalenie optymalnych proporcji. Różny metabolizm u pacjentów może skutkować skomplikowaną i trudną do przewidzenia farmakokinetyką i

farmakodynamiką poszczególnych składników. W razie wystąpienia efektów ubocznych, pojawiają się trudności z ustaleniem ich przyczyny.

Najnowszym, obiecującym podejściem do polifarmakologii jest synteza związków zawierających w swojej strukturze dwa farmakofory (lub więcej) o różnych funkcjach biologicznych.^{10, 11} Częsteczki tego typu nazywane są związkami hybrydowymi lub wieloligandowymi, chociaż w literaturze można je znaleźć również pod nazwą chimer, homo/hetero dimerów, bliźniaków (ang. *twin*).¹¹ Zaletą stosowania leków hybrydowych jest: dużo łatwiejsze dawkowanie, prostsza do określenia farmakokinetyka i farmakodynamika, wynikająca z faktu stosowania tylko jednej substancji czynnej, skrócenie czasu i redukcja kosztów fazy badań klinicznych.



Rysunek 2.11. Klasyfikacja związków hybrydowych ze względu na sposób łączenia farmakoforów.

Związki hybrydowe klasyfikuje się ze względu na sposób łączenia farmakoforów (Rysunek 2.11),¹¹ niestety nie istnieje jeszcze ujednoczona polska nomenklatura dla tego typu związków.

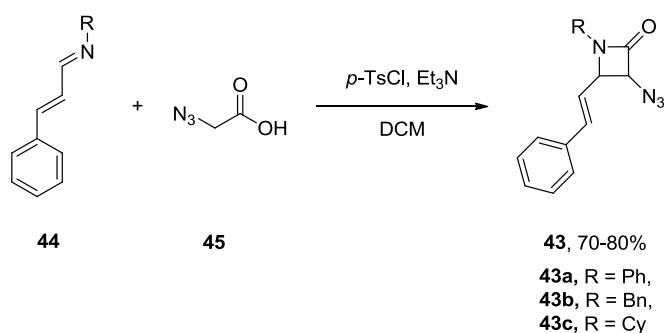
Związki, w których farmakofory oddzielone są od siebie łącznikiem określa się angielskim terminem „*linked*” (połączone). Bezpośrednie połączenie farmakoforów daje związki typu „*merged*” (scalone), natomiast związki, zawierające w swej strukturze kluczowe elementy wielu farmakoforów nazywane są „*fused*” (zrośnięte, zlane).

Poszukiwanie związków hybrydowych opiera się głównie na dostępnej wiedzy o aktywności biologicznej i mechanizmach działania wcześniej odkrytych związków lub grup związków, która pozwala na racjonalną analizę i zaprojektowanie nowych struktur. Katalityczna AAC jest bardzo dobrym narzędziem do syntezy hybryd, w których farmakofory rozdzielone są łącznikiem. Grupę azydkową i terminalny alkin stosunkowo łatwo jest wprowadzić do struktury cząsteczek organicznych – bezpośrednio lub jako terminalną grupę na odpowiednio zaprojektowanym łączniku. Strategia syntezy związków hybrydowych typu „*linked*” oparta na CuAAC znalazła, w ostatnich latach, szerokie zastosowanie w projektowaniu związków o

potencjalnej aktywności biologicznej.⁵⁸ Reakcja cykloaddycji jest z reguły ostatnim lub jednym z ostatnich etapów syntezy.

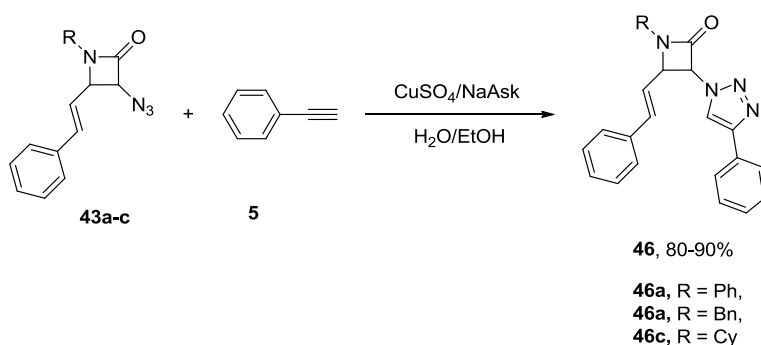
2.3.2. β -Laktamy

β -Laktamy stanowią ważną klasę związków biologicznie czynnych. Od wielu lat znajdują zastosowanie jako związki przeciwbakteryjne (penicyliny, cefalosporyny), a w ostatnich latach odkryte zostało ich działanie antymalaryczne i przeciwnowotworowe m.in. przeciw komórkom raka piersi. Wysoka aktywność biologiczna, dobrze rozpoznana chemia β -laktamów oraz znane mechanizmy ich działania stwarzają możliwość racjonalnego projektowania hybrydowych związków biologicznie czynnych zawierających to ugrupowanie w swojej strukturze.



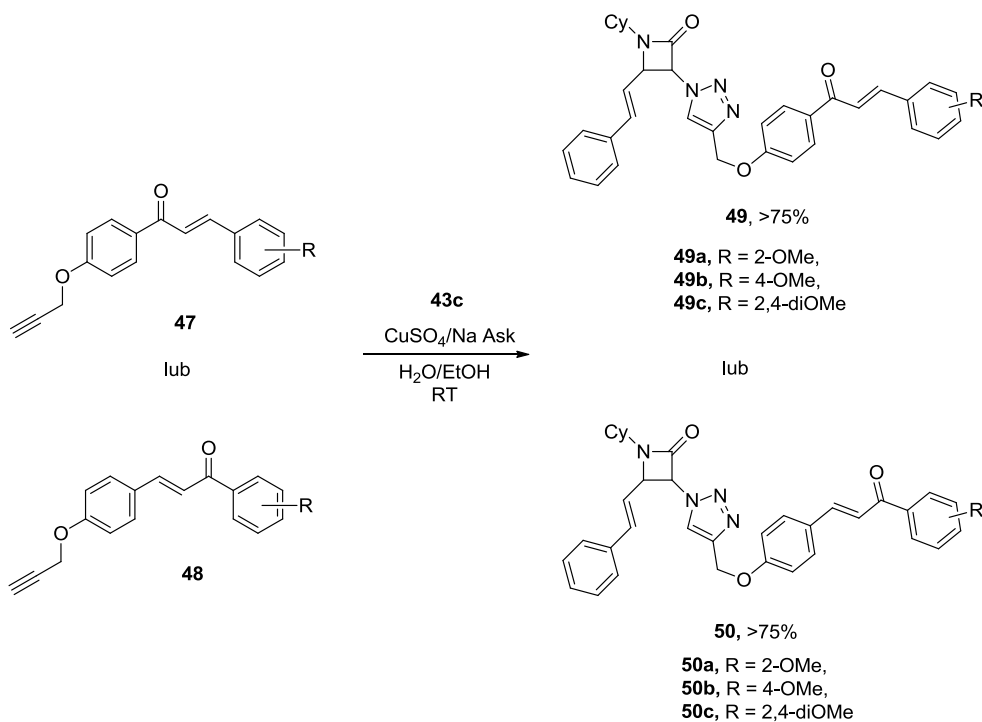
Schemat 2.17. Synteza 3-azydo-2-azetydynonu **43**.

W syntezie hybryd zawierających jednostkę β -laktamową związkiem wyjściowym w reakcji AAC jest 3-azydo-2-azetydynon (**43**, Schemat 2.17). Związki **43** otrzymywane są w reakcji 1-azadienów **44** z kwasem azydooctowym (**45**) i z powodzeniem stosowane do połączeń z różnymi związkami o udokumentowanym działaniu biologicznym.⁷⁴ Wykazano, że obecność grupy fenylowinylowej w pozycji 4 zwiększa powinowactwo β -laktamów do komórek nowotworowych. Pierwsze próby otrzymania β -laktamowych hybryd na drodze CuAAC, polegały na cykloaddycji związków typu **43** z prostymi acetylenami, w tym z fenyloacetylenem (**5**). Syntezy prowadzone były w temperaturze pokojowej, w mieszaninie woda/etanol w obecności Cu(I) generowanej *in situ* poprzez redukcję CuSO₄.⁷⁴ Pomimo tego, że substrat jest azydkiem drugorzędowym, wydajności triazoli **46** były bardzo wysokie (Schemat 2.18). Otrzymana seria związków charakteryzowała się wysoką aktywnością przeciwmalaryczną oraz niską cytotoksycznością, w szczególności dotyczyło to pochodnej *N*-cykloheksylowej. Wysoka aktywność związków typu **43** w reakcji CuAAC oraz obiecujące właściwości biologiczne produktów ich cykloaddycji zachęciły autorów do zaprojektowania hybryd zawierających, oprócz pierścienia β -laktamowego, inne farmakofory.



Schemat 2.18. 3-Azydo-2-azetyldynony **43** w reakcji CuAAC.

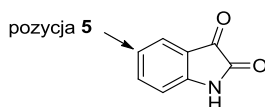
Hybrydy, złożone ze związków typu **43** i podstawionych chalkonów zaprojektowane zostały jako potencjalne związki przeciwnowotworowe.⁷⁵ Chalkony stanowią ciekawą grupę związków posiadających aktywność biologiczną, w tym udokumentowane właściwości przeciwnowotworowe. Mechanizm ich działania jest analogiczny do naturalnie występujących kombretastatyn.⁷⁶ Dodatkową zaletą chalkonów jest łatwość syntezy i modyfikacji ich struktury. Pochodne **47** i **48** zawierające terminalny alkin (Schemat 2.19) zsyntetyzowane zostały w reakcji *O*-alkilowania bromkiem propargilu chalkonów posiadających grupę -OH w pozycji 4 odpowiednio pierścienia A lub B. Seria otrzymanych pochodnych poddana została reakcji z azydkami typu **43** w warunkach standardowych. Pożądane pochodne **49** i **45** otrzymano z wysokimi wydajnościami >75%.



Schemat 2.19. Synteza hybryd β -laktamów i chalkonów.

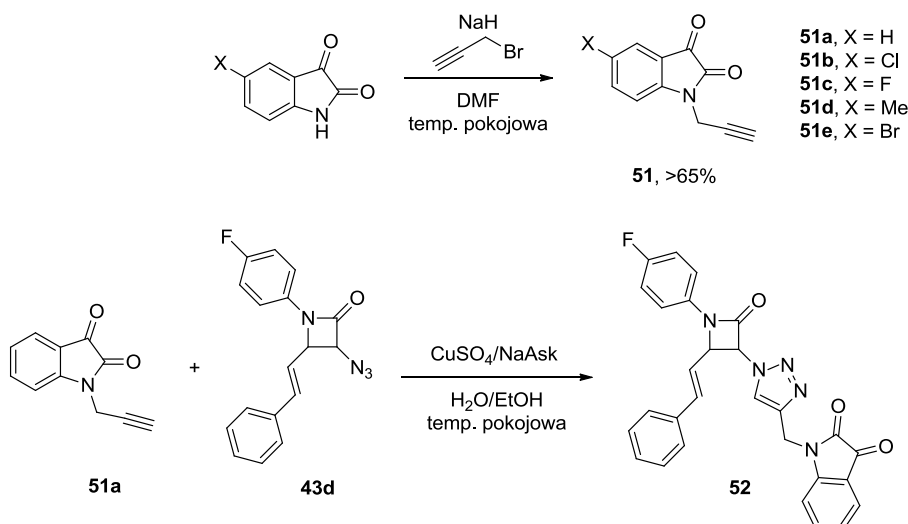
Badania biologiczne, wykazały, że związek **50a** (R = 2-OMe) charakteryzuje się wysoką cytotoksycznością wobec komórek nowotworów płuc ($IC_{50} < 1 \mu M$) i prostaty ($IC_{50} = 67.1 \mu M$). Hybryda ta, jako jedyna z całej serii, wykazała również wysoką aktywność przeciwko białacze ($IC_{50} < 1 \mu M$) i nowotworowi okrężnicy ($IC_{50} = 6.4 \mu M$). Kluczowym czynnikiem wpływającym na wysoką aktywność przeciwnowotworową okazała się obecność grupy metoksylovej pierścieniu fragmentu chalkonowego oraz podstawnika *N*-cykloheksylovego w jednostce β -laktamu.

β -Laktamy typu **43** użyte były do syntezy związków hybrydowych, które posłużyły do zwalczania rzęsistka pochwowego (*Trichomonas Vaginalis*),⁷⁷ wyjątkowo nieprzyjemnego pierwotniaka stanowiącego istotny problem w krajach o klimacie tropikalnym i o niskim poziomie higieny. Koncepcja stworzenia hybrydy przeciwko temu pasożytowi polegała na połączeniu przeciwpasożytniczych właściwości β -laktamów i izatyn, (1H-indolo-2,3-dionów, Rysunek 2.12), które stanowią klasę związków o właściwościach przeciwwirusowych, przeciwgrzybiczych i przeciwbakteryjnych. Wprowadzanie modyfikacji na atomie azotu oraz w pozycji 5 pierścienia aromatycznego izatyny znacząco wpływa na właściwości biologiczne tego typu związków.



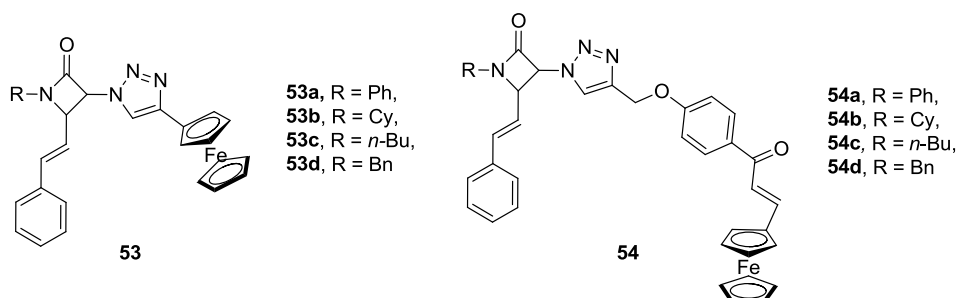
Rysunek 2.12. Struktura izatyny.

Synteza pochodnych izatyny, posiadających terminalny alkin polegała na *N*-alkilowaniu podstawionej w pozycji 5 izatyny bromkiem propargilu. Tak przygotowane pochodne typu **51** poddano reakcji z azydkami typu **43** w obecności $CuSO_4/NaAsK$ (Schemat 2.20, na Schemacie przedstawiono przykładową syntezę jednego połączenia hybrydowego). Wszystkie związki zostały oczyszczone z użyciem jedynie ekstrakcji i krystalizacji, bez użycia technik chromatograficznych. Niestety, autorzy nie podali wydajności otrzymanych związków. Badania *in vitro* otrzymanej biblioteki związków wykazały, że większość z nich efektywnie hamuje rozwój *T. vaginalis*, przy czym najaktywniejszy okazał się związek **52** (Schemat 2.20), dla którego wartość IC_{50} wynosiła $7.06 \mu M$. Autorzy nie zbadali wpływu długości łącznika pomiędzy β -laktamem a izatyną na aktywność biologiczną, co moim zdaniem, mogłoby dać większy wgląd w zależność aktywności od struktury.



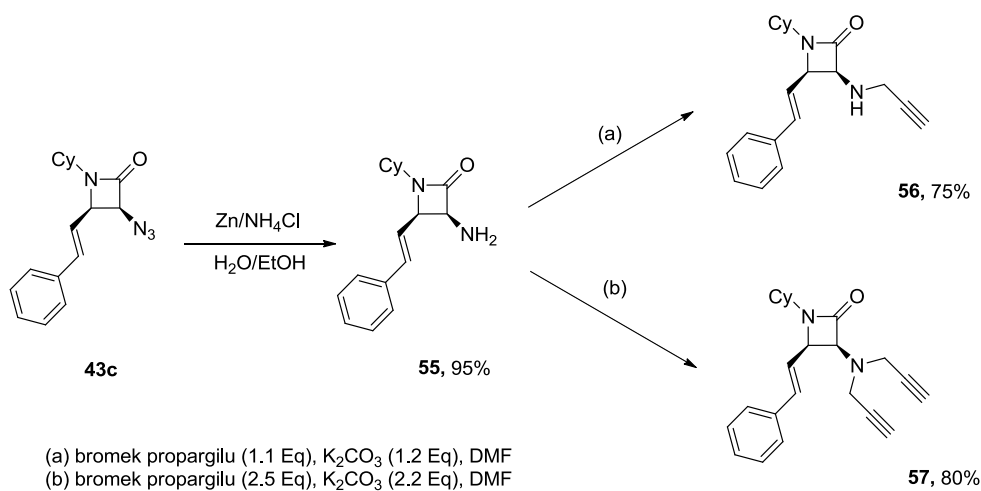
Schemat 2.20. Synteza *N*-propargilowych pochodnych izatyny **51** i hybryd **52**.

Analogiczna strategia syntetyczna zastosowana została do otrzymania hybryd β -laktamów z pochodnymi ferrocenu i ferrocenylochalkonu (Rysunek 2.13).^{78, 79} Autorzy, bazując na swoich wcześniejszych odkryciach, spodziewali się wysokiej aktywności bakteriostatycznej hybryd typu **53** i **54** przeciwko prątkom gruźlicy. Niestety, nawet przy dużych stężeniach, żadna z otrzymanych hybryd nie była aktywna.



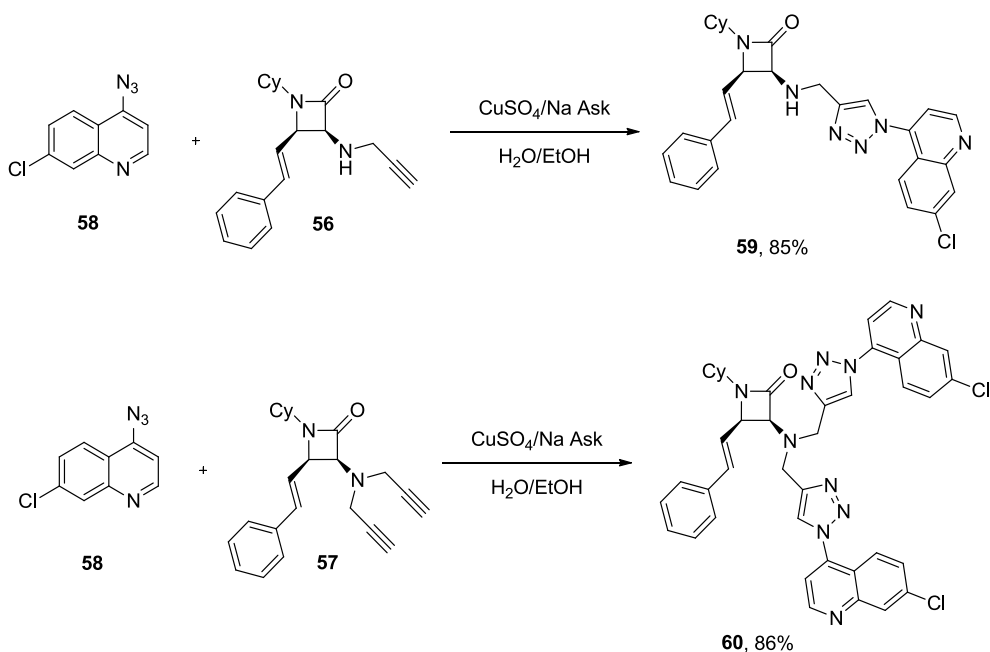
Rysunek 2.13. Hybrydy β -laktamu **43** i pochodnych ferrocenu.

Grupa azydkowa w związkach typu **43** może z powodzeniem zostać zredukowana do grupy aminowej a następnie poddana alkilowaniu (Schemat 2.21).⁸⁰ W zależności od ilości bromku propargilu i zasady użytych do reakcji możliwe jest selektywne wprowadzenie jednej (związek **56**) lub dwóch (związek **57**) grup propargilowych z wysokimi wydajnościami.



Schemat 2.21. Synteza *N*-propargilowych pochodnych β-laktamu **43c**.

Tak otrzymane pochodne użyte zostały w syntezie połączeń z 7-chlorochinoliną, używaną w leczeniu malarii. Zamiarem autorów było opracowanie związków zdolnych do niszczenia zmutowanej odmiany zarodźca sierpowatego (*Plasmodium falciparum*), która wykształciła odporność na preparaty oparte na chlorochinolinie. 4-Azydo-7-chlorochinolina **58** otrzymana została z 4,7-dichlorochinoliny na drodze reakcji S_NAr (Schemat 2.22).



Schemat 2.22. Synteza hybryd złożonych z 4-Azydo-7-chlorochinoliny **34** i β-laktamów.

Synteza pożądaných hybryd na drodze CuAAC była wydajna, zarówno w przypadku użycia alkinu **56** jak i **57**, przy czym synteza związku **60** wymagała użycia aż 25 mol% katalizatora. Wartym podkreślenia jest fakt, że azydki związane bezpośrednio z pierścieniem aromatycznym należą do dość kłopotliwych substratów w reakcjach CuAAC. Często wymagają one starannego

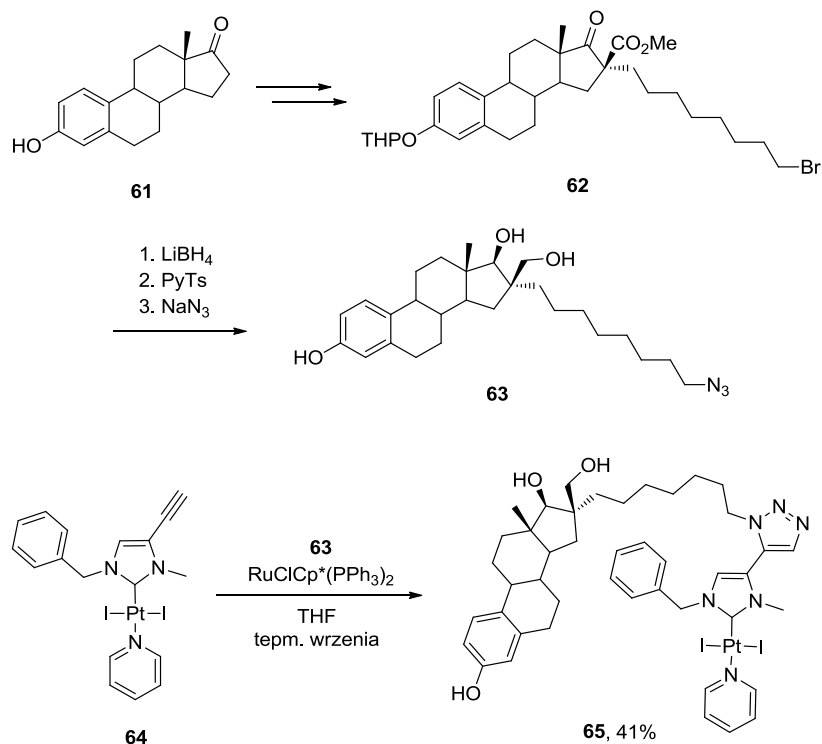
doboru warunków reakcji, jednak w tym wypadku doskonale sprawdził się standardowy układ $\text{CuSO}_4/\text{NaAsK}$.

Otrzymane związki, zgodnie z założeniem, wykazywały podwyższoną aktywność przeciw komórkom zarodźca sierpowatego, odpornym na leczenie chlorochinoliną. Bistriazol **60** wykazywał około dwukrotnie wyższą aktywność niż odpowiedni monotriazol **59**. Fakt ten tłumaczono udziałem ugrupowań triazolowych w wiązaniach wodorowych podczas dokowania związków w miejscu aktywnym enzymu będącego obiektem docelowym. Symulacje z wykorzystaniem metod modelowania molekularnego potwierdziły tę hipotezę wykazując, że kompleks enzym-bis triazol **60** mają znacznie niższą energię, a zatem są trwalsze niż analogiczny kompleks enzymu z mono triazolem **59**.

2.3.3. Steroidy

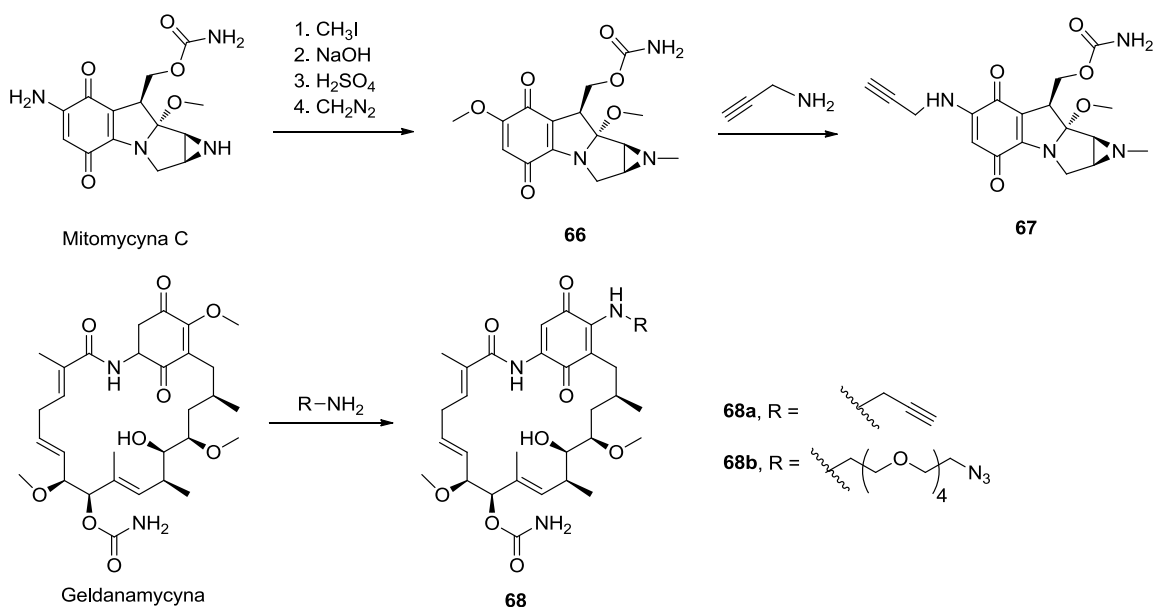
Steroidy mają szerokie zastosowanie w medycynie jako środki przeciwzapalne, przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne i przeciwnowotworowe.⁸¹ Pochodne steroidów, ze względu na swoje właściwości antagonistyczne w stosunku do receptora estrogenów znajdującego się w niektórych nowotworach, stanowią obiecujący element strukturalny leków hybrydowych projektowanych pod kątem zwalczania raka piersi. W związkach tych, fragment steroidowy pełni funkcję nie tylko farmakoforu wiążącego się z odpowiednim receptorem, ale również czynnika wpływającego na selektywność opracowanych terapeutyków.

Guichard zaprojektował *N*-heterocykliczny kompleks platyny **64** zawierający w swojej strukturze terminalny alkin (Schemat 2.23).⁸² Otrzymany kompleks funkcjonalizowano na drodze AAC. W ten sposób przyłączono pochodną estronu **63** modyfikowaną łańcuchem alkilowym w pozycji 16 (Schemat 2.23). Zastosowanie CuAAC do syntezy finalnych związków prowadziło wyłącznie do rozpadu kompleksu. W tej sytuacji, autorzy zdecydowali się na wykorzystanie RuAAC , uzyskując hybrydę **65** połączoną przez 1,5-dwupodstawiony 1,2,3-triazol z wydajnością 41% (Schemat 2.23). Otrzymany związek **65** odznaczał się znacząco niższym współczynnikiem IC_{50} niż *cis*-platyna w badaniach *in vitro*, przeprowadzonych na komórkach raka piersi, okrężnicy, jajnika i szpiku kostnego.



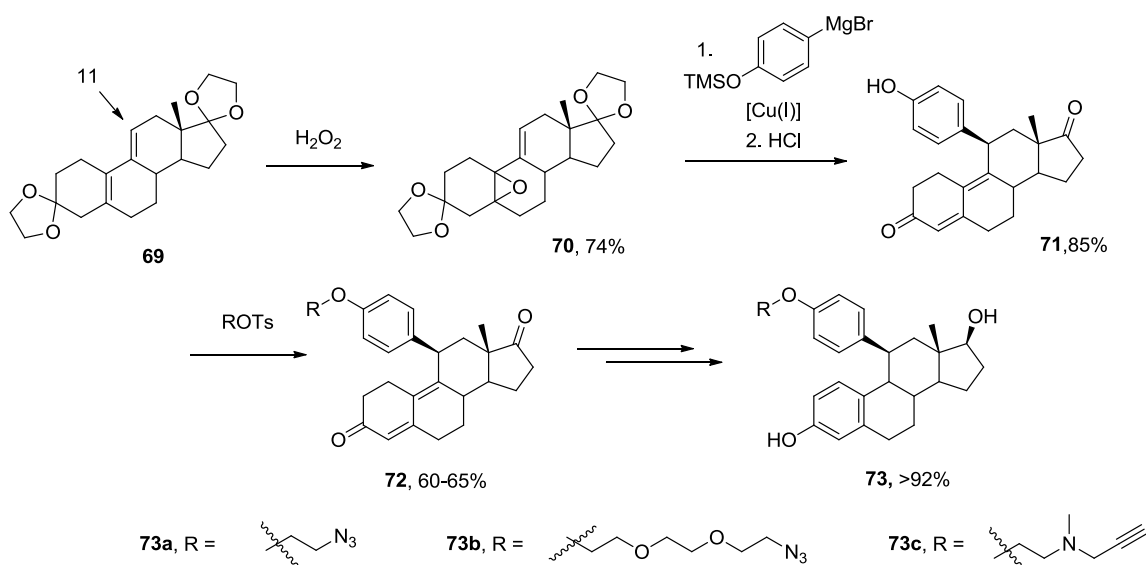
Schemat 2.23. Synteza pochodnej estronu **63** i hybrydy **65**.

Podobna koncepcja wykorzystana została przez Hansona w syntezie połączeń pochodnej estrogenu z Mitomycyną C⁸³ i Geldanamycyną⁸⁴ (Schemat 2.24), związków o potwierdzonej aktywności w terapii zaawansowanego raka piersi. Związki **67**, **68a-b** zostały zmodyfikowane przez wprowadzenie odpowiedniej grupy aminowej do pierścienia chinonu.

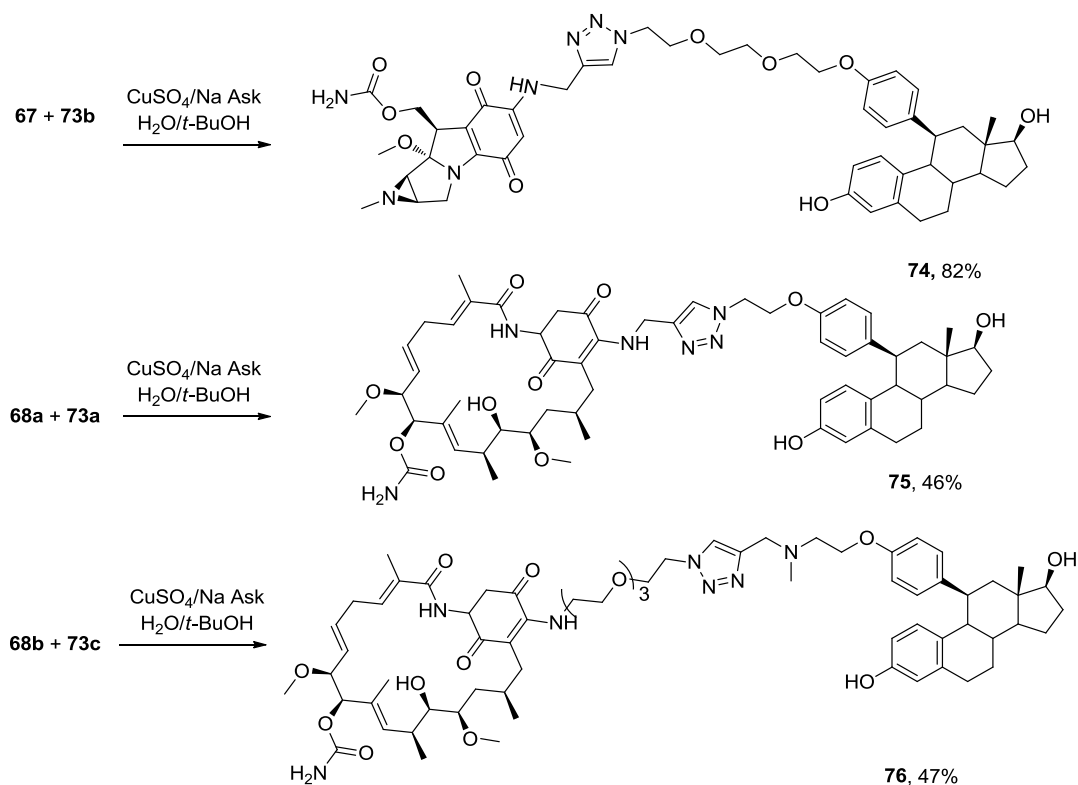


Schemat 2.24. Synteza pochodnych mitomycyny i geldanamycyny.

Z wcześniejszych badań wspomaganych technikami obliczeniowymi wynika, że modyfikacja steroidu w pozycji 11 ma najmniejszy wpływ na jego wiązanie z receptorami estrogenu,⁸⁵ w związku z tym odpowiedni łącznik wprowadzono w tę pozycję. Grupę hydroksyfenylową wprowadzono do związku **70** w reakcji z odpowiednim bromkiem arylomagnezowym a następnie poddano alkilowaniu odpowiednimi związkami z terminalnymi grupami funkcyjnymi: $-N_3$ i alkinem (**73a-c**, Schemat 2.25).



Schemat 2.25. Synteza pochodnych estradiolu modyfikowanych w pozycji 11.

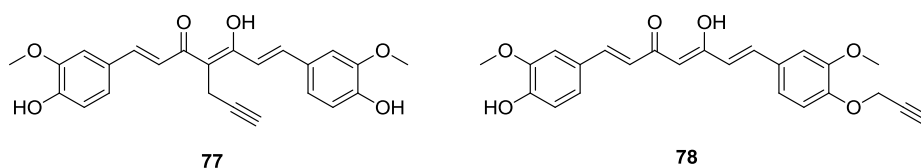


Schemat 2.26. Synteza hybryd estradiolu i mitomycyny C oraz geldanamycyny.

Reakcje syntezy odpowiednich hybryd przeprowadzono w standardowych warunkach CuAAC. Stosując $\text{CuSO}_4/\text{NaAsc}$ w mieszaninie woda/*t*-BuOH otrzymano hybrydy **74-76** z dobrą wydajnością w przypadku pochodnej mitomycyny⁸³ **74** i umiarkowanymi w przypadku pochodnych geldanamycyny^{83, 84} **75** i **76** (Schemat 2.26).

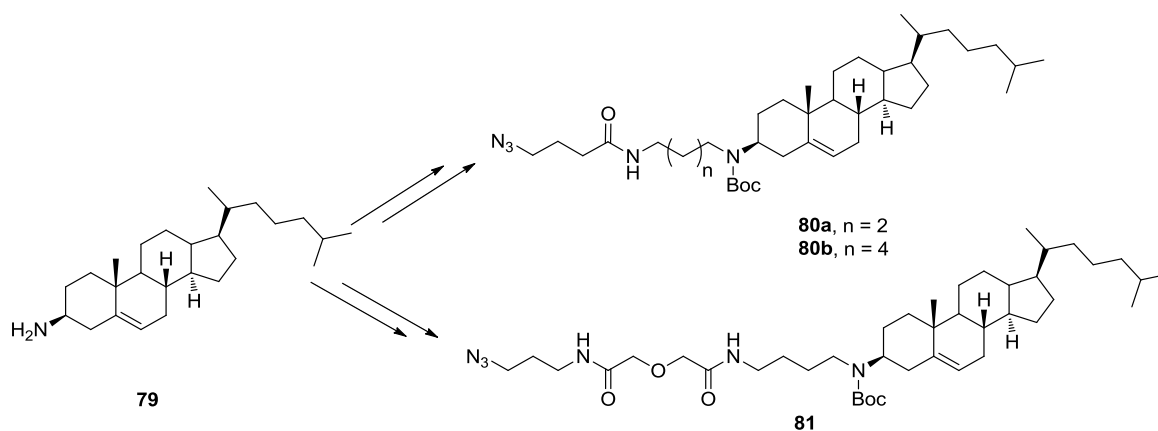
Otrzymane hybrydy **74-76** wykazywały bardzo dobre właściwości cytotoksyczne wobec wybranych linii komórek raka piersi (IC_{50} rzędu 100 nM), jednak autorzy nie przedstawili dowodu na synergistyczne działanie farmakoforów znajdujących się w tych związkach.^{83, 84}

Innym zastosowaniem steroidów w projektowaniu leków hybrydowych jest wykorzystanie ich dużego powinowactwa do niektórych receptorów znajdujących się w błonach komórek nerwowych. Zhang otrzymał serię związków hybrydowych składających się z kurkuminy jako substancji czynnej oraz cholersteryloaminy jako czynnika dokującego terapeutyk w komórkach nerwowych.⁸⁶ Kluczowym, dla wysokiej aktywności biologicznej, czynnikiem była długość łącznika pomiędzy farmakoforami oraz miejsce przyłączenia go we fragmencie kurkuminy. Pochodne kurkuminy **77** i **78** otrzymano w wyniku alkilowania centralnego łańcucha węglowego lub jednej z grup hydroksylowych w pierścieniach aromatycznych (Rysunek 2.14).



Rysunek 2.14. Pochodne kurkuminy z podstawnikiem propargilowym.

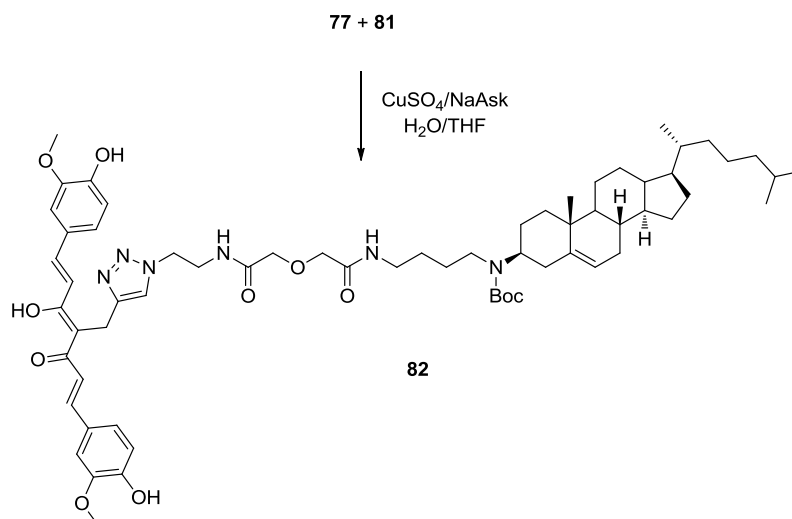
Pochodne steroidowe otrzymane zostały w standardowych przekształceniach poprzez funkcjonalizację grupy aminowej cholesteryloaminy **79** różnej długości łącznikami zakończonymi grupą azydkową (Schemat 2.27).



Schemat 2.27. Synteza pochodnych cholesteryloaminy **79**.

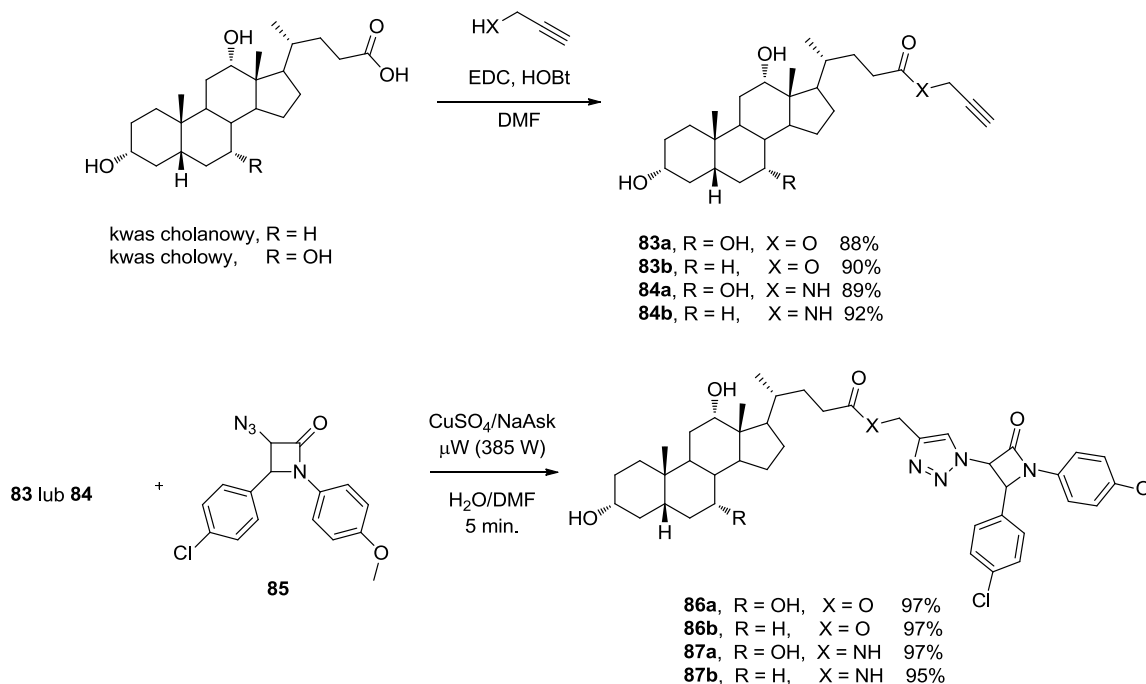
Łączenie otrzymanych bloków budulcowych **77**, **78** z **80a-b** i **81** na drodze CuAAC przeprowadzono wobec CuSO₄/NaAsk w mieszaninie woda/THF (Schemat 2.28). Niestety, wydajności reakcji nie zostały podane.

Otrzymane związki testowano pod kątem przeciwdziałania chorobie Alzheimera. Związek **82** (Schemat 2.28) posiadający łącznik składający się z 17 atomów odznaczał się najwyższą selektywnością i aktywnością ochronną (IC₅₀ = 0.08 μM) i został wybrany jako struktura wiodąca do dalszych badań optymalizacyjnych.



Schemat 2.28. Synteza hybrydy cholesteryloaminy i kurkuminy.

Hazra przeprowadziła syntezę połączeń pochodnych kwasów żółciowych **86** i **87** (Schemat 2.29) z β-laktamami w celu stworzenia przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych związków o zwiększonej selektywności i przenikalności przez błony komórkowe drobnoustrojów.⁸⁷ Bloki budulcowe, pochodne kwasów cholanowego i cholowego **83** i **84**, otrzymano na drodze wysoko wydajnej estryfikacji lub amidowania grupy karboksylowej (Schemat 2.29). Jako pochodna β-laktamu użyty został związek **85**, otrzymany w sposób analogiczny jak **43** (Schemat 2.17). Etap syntezy właściwych hybryd **86** i **87** przeprowadzony został w reaktorze mikrofalowym. Takie rozwiązanie pozwoliło na otrzymanie pożądaných związków **86** i **87** z bardzo wysokimi wydajnościami, a czas prowadzenia reakcji został skrócony do kilku minut. Otrzymane związki typu **86** i **87** poddano szeroko zakrojonym badaniom biologicznym. Związki **87a-b** będące amidowymi pochodnymi użytych kwasów żółciowych wykazywały znacznie wyższe właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze niż analogiczne estry.

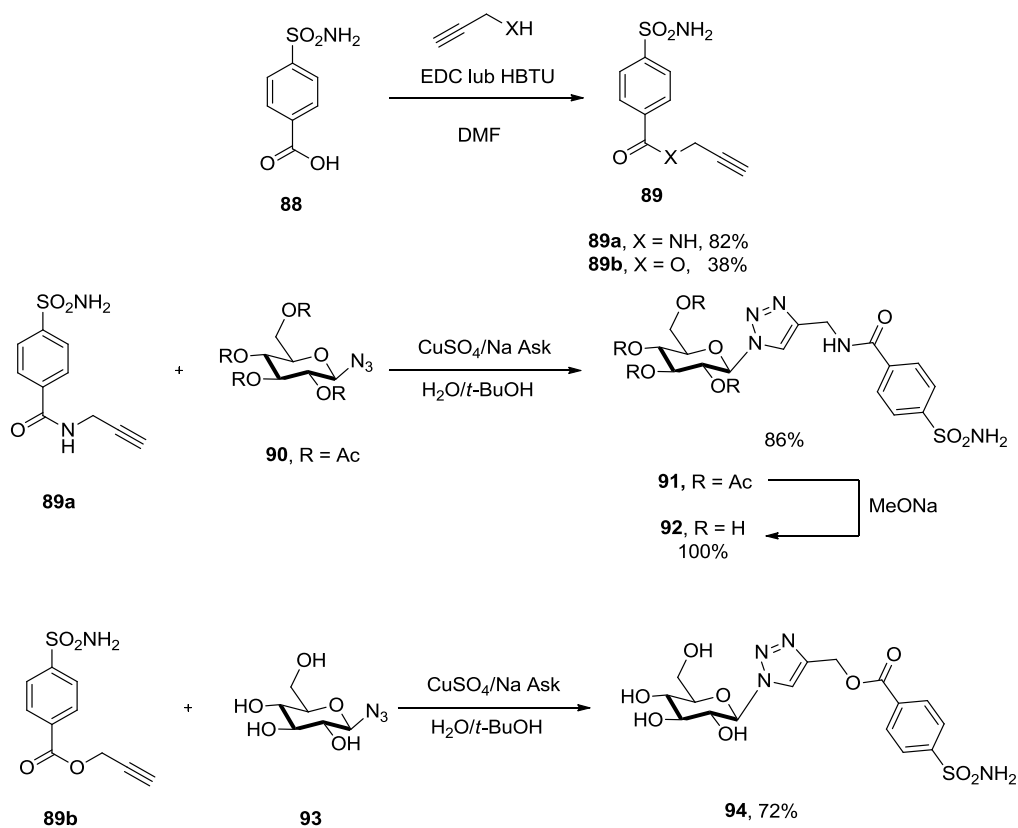


Schemat 2.29. Synteza hybryd kwasów żółciowych i β -laktamu **85**.

2.3.4. Sulfonamidy

Sulfonamidy są grupą leków szeroko stosowaną w medycynie. Ich pochodne można znaleźć w wielu lekach przeciwbakteryjnych, moczopędnych, przeciwcukrzycowych i przeciwbólowych. W ostatnich latach były one badane pod względem ich zdolności do inhibicji anhidrazy węglanowej (CA, ang. *carbonic anhydrase*).⁸⁸ Niektóre z izoform CA występują w komórkach rakowych a ich nadekspresja przyczynia się do szybkiego rozwoju nowotworu. Podstawowym problemem w projektowaniu związków przeciwrakowych opartych na sulfonamidach jest kwestia ich selektywności względem konkretnych izoform CA i przenikania przez błony komórkowe.

Jedną z koncepcji rozwiązania tego problemu zaproponowana została przez Poulsen i polegała na połączeniu sulfonamidów z pochodnymi cukrów.⁸⁹ Szerokie badania nad tym zagadnieniem skupione były głównie na dokładnej optymalizacji struktury zaprojektowanych połączeń. Jedno z podejść polegało na łączeniu azydocukrów typu **90** z sulfonamidami zawierającymi ester lub amid propargilowy o ogólnej strukturze **89** (Schemat 2.30, na Schemacie przedstawiono syntezę hybryd na przykładzie glukozy).

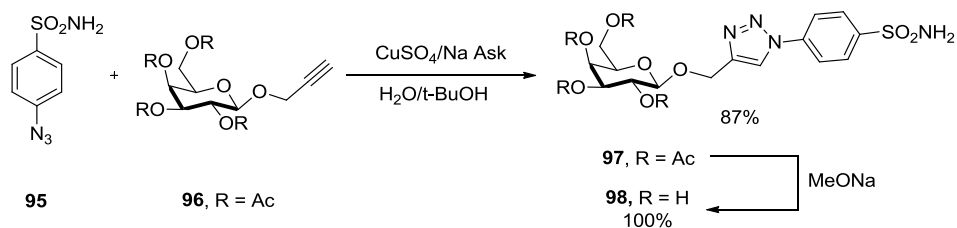


Schemat 2.30. Synteza hybrydowych połączeń pochodnych sulfonamidów z azydocukrami na przykładzie glukozy.

Łączenie amidowej pochodnej **89a** z zabezpieczonymi cukrami przeprowadzono na drodze CuAAC (Schemat 2.30). Grupy zabezpieczające na kolejnym etapie były hydrolizowane w warunkach zasadowych. Estrową pochodną sulfonamidu **89b** łączono z azydocukrami z wolnymi grupami hydroksylowymi **93**, ponieważ następczy etap odbezpieczania prowadził również do hydrolizy hybrydy.

Otrzymaną serię związków przebadano pod kątem zdolności inhibicji różnych izoform CA. Porównanie wyników wykazało, że otrzymane połączenia miały silne właściwości inhibitora ekspresji enzymu (K_i na poziomie ok 400 nM) oraz znacznie wyższą selektywność względem formy CA IX znajdującej się w komórkach nowotworowych niż CA występujących w komórkach zdrowych (rzędu 0.05). Właściwości te, silnie zależały od pochodnej cukrowej użytej do syntezy. Na przykład, pochodne glukozy i galaktozy, będące epimerami, odznaczały się czterokrotną różnicą w aktywności i sześciokrotną różnicą w selektywności, na korzyść galaktozy. Dalsza optymalizacja tych obiecujących wyników polegała na drobnych modyfikacjach struktury. Pierwsza z nich polegała na „odwróceniu” struktury łącznika.⁹⁰ Za substrat posłużył sulfonamid **95** posiadający grupę azydkową w pozycji 4 (Schemat 2.31). Pochodnymi cukrowymi użytymi do tych badań były glikozydy propargilowe z grupami hydroksylowymi zabezpieczonymi grupą acylową **96**. Podobnie jak we wcześniejszych przypadkach etapy łączenia i następczej hydrolizy

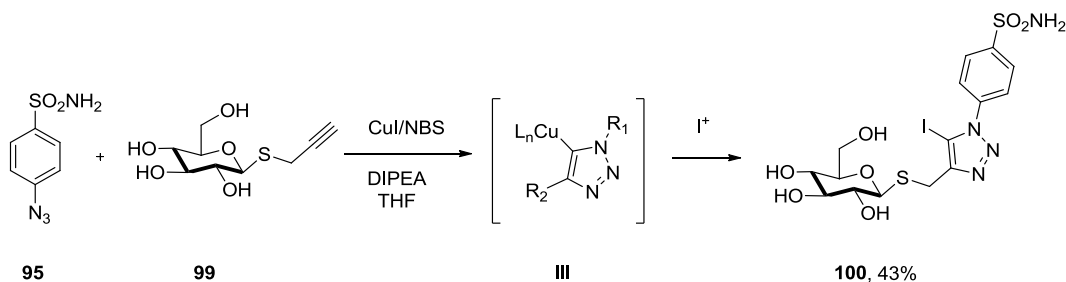
przebiegały z wysokimi wydajnościami mimo, że azydki aromatyczne bywają kłopotliwymi substratami w reakcjach CuAAC.



Schemat 2.31. Synteza hybrydowych połączeń pochodnych sulfonamidów z glikozydami propargilowymi na przykładzie galaktozy.

Wszystkie otrzymane pochodne cechowały się dużo niższym minimalnym stężeniem koniecznym do inhibicji CA IX w porównaniu do związków otrzymanych z azydo cukrów i estru/amidu **89**. Zatem dla tej klasy związków rodzaj łącznika i pozycja triazolu ma kluczowe znaczenie. Związek **98** otrzymany z glikozydu galaktozy posiadał $K_i = 9.7$ nM, pięćdziesięciokrotnie niższe niż pochodna galaktozy typu **92**.

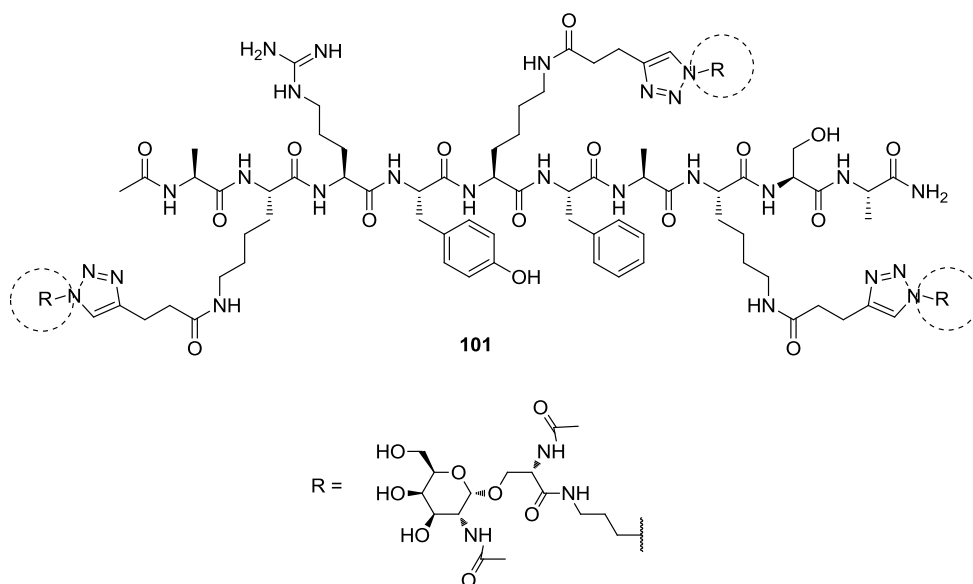
Dasze optymalizacje struktury łącznika wykazały, że zastąpienie *O*-glikozydów *S*-glikozydami oraz wprowadzenie jodu w pozycję 5 1,2,3-triazolu znacznie poprawia parametry tej klasy związków hybrydowych. Sulfonamidowa pochodna glukozy **100** (Schemat 2.32), wykazuje $K_i = 6.2$ nM i jest odporna na działanie glikozydaz.⁹¹ Wprowadzenie jodu w pozycję 5 przeprowadzone zostało na etapie CuAAC poprzez użycie stechiometrycznej ilości CuI w obecności NBS.⁹² Taki układ działa jednocześnie jako katalizator CuAAC i źródło kationów I^+ , które reagują z silnie nukleofilowym związkiem pośrednim **III** reakcji cykloaddycji (patrz: Schematy 2.5 i 2.6). Stosunkowo niska wydajność syntezy hybrydy **100** spowodowana była protonowaniem pozycji 5 związku pośredniego **III**, prowadzącym do 5-H 1,2,3-triazolu.⁹²



Schemat 2.32 Synteza hybrydy sulfonamidu **95** z *S*-glikozydem propargilowym glukozy.

2.3.5. Hybrydy peptydowe

W chemii peptydów CuAAC znalazła szerokie zastosowanie nie tylko do syntezy analogów polipeptydów,⁶⁹ lecz również do efektywnego funkcjonalizowania łańcuchów bocznych w celu otrzymania połączeń hybrydowych.⁶⁸



Rysunek 2.15. Hybryda peptydu i aminocukrów.

Modyfikacje łańcuchów bocznych peptydów z zastosowaniem CuAAC wymagają wprowadzenia do ich struktury grup azydowych lub alkinowych. Pochodne takie otrzymuje się zazwyczaj poprzez wbudowanie odpowiednich syntetycznych aminokwasów w trakcie syntezy peptydu na fazie stałej. Następnie, tak przygotowany peptyd bierze udział w reakcji CuAAC. Przykładem takiego sposobu modyfikowania peptydów jest opisana przez Danishefskiego synteza potencjalnej szczepionki przeciwnowotworowej **101** (Rysunek 2.15), w której do łańcucha peptydowego przyłączone zostały trzy jednostki aminocukrowe.⁹³ Synteza prowadzono w środowisku wodnym z użyciem nanocząstek Cu jako katalizatora. Związek **101** został otrzymany z wydajnością 65%.

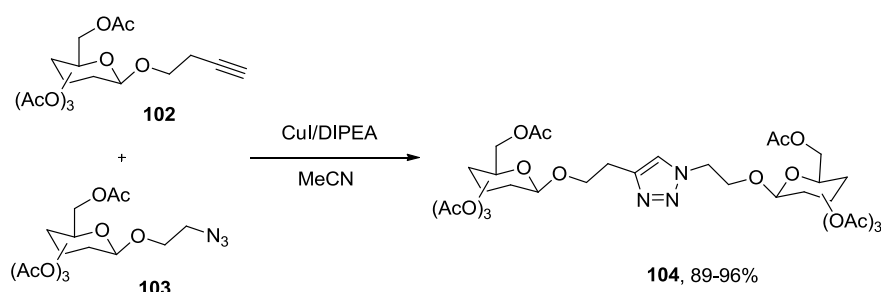
Walsh wykorzystał to podejście do syntezy analogów cyklicznego dekapeptydu-tyrocydyny o właściwościach przeciwbakteryjnych.⁹⁴ Fenyloalanina, w trakcie syntezy makrocyklu została zastąpiona propargiloglicyną. Następnie, w celu podniesienia selektywności i aktywności zmodyfikowanego peptydu przyłączano odpowiednie mono-, di- i triazydosacharydy. Spośród 240 pochodnych otrzymanych w CuAAC katalizowanej $\text{CuSO}_4/\text{NaAsk}/\text{TBTA}$, większość była dużo bardziej selektywna wobec komórek bakteryjnych niż tyrocydyna. Ponadto dwie z nich wykazywały sześciokrotnie niższe minimalne stężenie powodujące zahamowanie rozwoju komórek bakteryjnych niż tyrocydyna.

2.3.6. Cukry

Pochodne cukrów stanowią bardzo ważną grupę związków z punktu widzenia chemii leków. Sacharydy i polisacharydy są elementem strukturalnym wielu związków biologicznie czynnych, często odpowiedzialnym za selektywne rozpoznanie przez receptory znajdujące się w

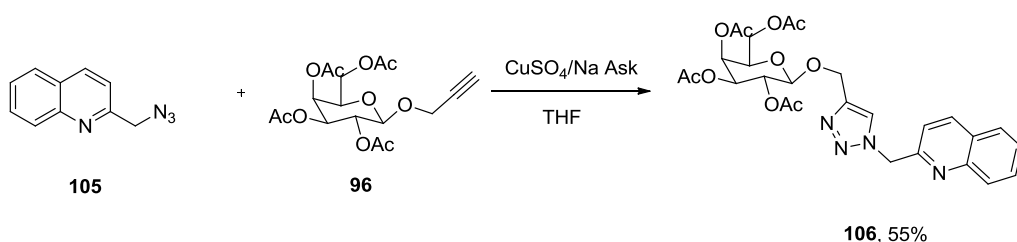
komórkach lub na ich powierzchni. Chemia cukrów, ze względu na bogactwo struktur, złożoną budowę i obecność wielu centrów stereogenicznych jest uważana za trudną i wymagającą. CuAAC okazała się użyteczna również dla tej klasy związków, pozwalając na selektywną syntezę połączeń węglowodanów z innymi związkami biologicznie czynnymi.⁶⁰

Hotha opracował praktyczne warunki łączenia mono- i oligosacharydów na drodze CuAAC.⁹⁵ Odpowiednie glikozydy 3-butynowe **102** i 2-azydoetylowe **103** łączone były ze sobą w reakcji cykloadycji (Schemat 2.33). W zoptymalizowanych warunkach najlepszym katalizatorem okazał się układ CuI/*N,N*-diizopropyleoaminy, a rozpuszczalnikiem acetonitryl. Wydajności otrzymanych połączeń typu **104** były bardzo wysokie. Autorzy nie podali jednak żadnych danych dotyczących właściwości biologicznych otrzymanych związków, wskazując jedynie na potencjał syntetyczny opracowanej metodologii.



Schemat 2.33. Wykorzystanie CuAAC do syntezy połączeń monosacharydów.

Połączenia pochodnych chinoliny z pochodnymi cukrów były obiektem badań Dasa.⁹⁶ Głównym celem przyjętym podczas projektowania tych struktur było poprawienie selektywności i farmakokinetyki chinolinowych związków przeciwgruźliczych.

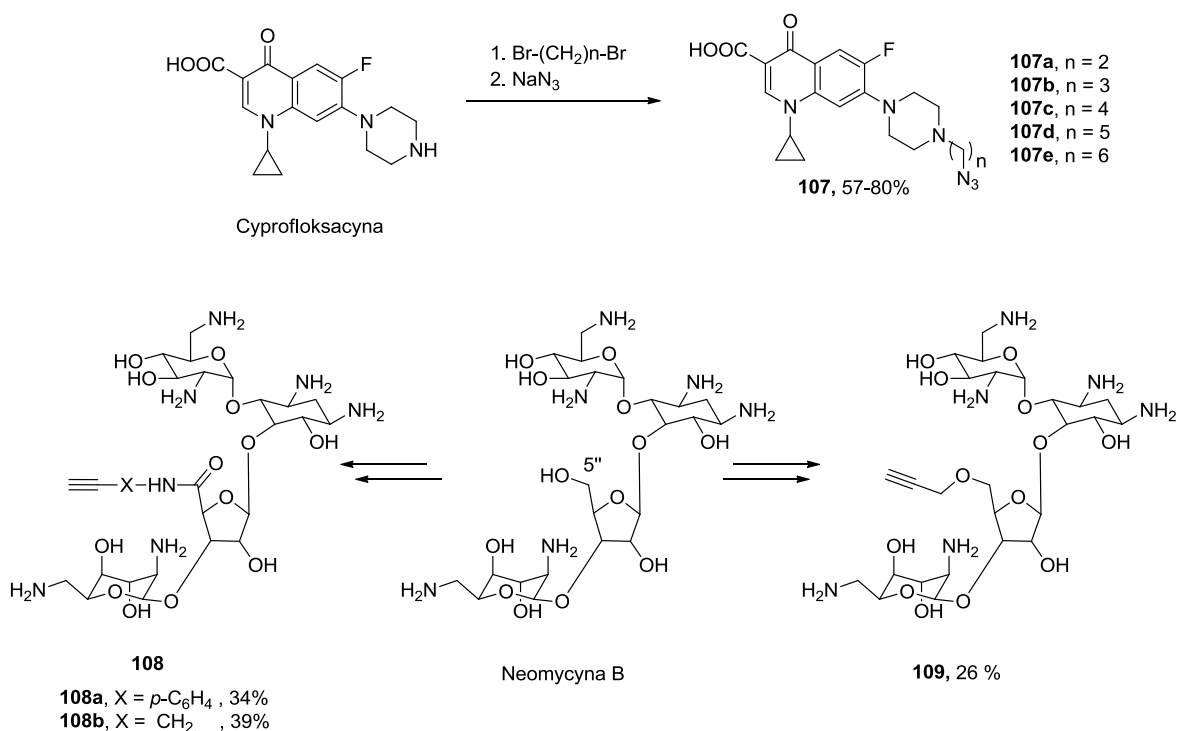


Schemat 2.34. Synteza połączeń 2-(azydometylo)-chinoliny z heksozami na przykładzie galaktozy.

Pochodną chinoliny użytą w tych badaniach była 2-(azydometylo)-chinolina **105** (Schemat 2.34), a jako pochodne cukrowe użyte zostały *O*-acylowane glikozydy propargilowe **96**. W standardowych warunkach CuAAC synteza połączeń przebiegła z wydajnościami umiarkowanymi do wysokich, a badania biologiczne wykazały duży potencjał otrzymanych związków jako środków przeciwko szczepowi *M. tuberculosis* H37Rv, odpornemu na inne pochodne chinoliny.

Pochodna galaktozy **106**, wykazywała najwyższą aktywność bakteriobójczą i została wybrana jako struktura wiodąca do dalszych badań.⁹⁶

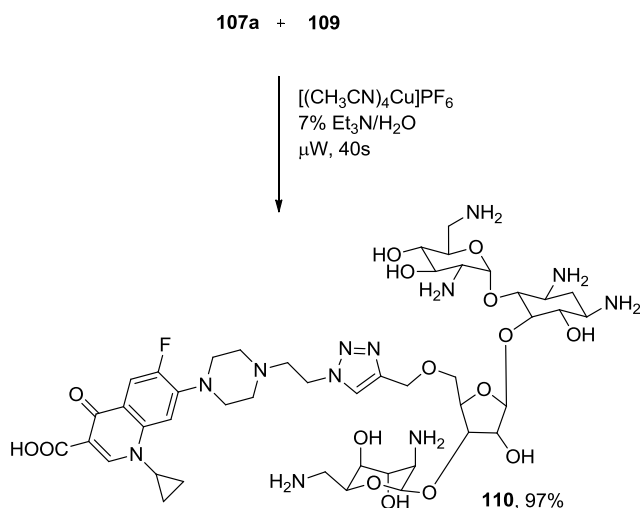
Baasov zaprojektował hybrydowe antybiotyki złożone z jednostki cyprofloksacyny i neomycyny B (Schemat 2.35).⁹⁷ Cyprofloksacyna jest silnym, dobrze wchłanianym antybiotykiem stosowanym w poważnych zakażeniach bakteryjnych, w tym węglikiem.⁹⁸ Natomiast neomycyna B jest antybiotykiem aminoglikozydowym o dość silnym działaniu przeciw np. gronkowcom, niestety stosunkowo toksycznym i słabo wchłanianym z układu pokarmowego.⁹⁸



Schemat 2.35. Synteza pochodnych Cyprofloksacyny i Neomycyny B.

Celem autorów była synteza związku, który, ze względu na obecność dwóch farmakoforów o odmiennych mechanizmach działania, będzie wykazywał właściwości bakteriobójcze i bakteriostatyczne wobec gatunków bakterii, które uodporniły się na któryś z tych leków. Odpowiednie pochodne cyprofloksacyny **107** otrzymane zostały przez *N*-alkilowanie azotu fragmentu piperazyny α,ω -dibromoalkanami i następczą substytucję azydkiem sodu (Schemat 2.35). Synteza alkinowych pochodnych neomycyny B była dużo bardziej złożona i wymagała zręcznej manipulacji grupami ochronnymi. Na przykład pochodna **109**, z grupą 5''-OH przekształconą w eter propargilowy, otrzymana została w siedmioetapowej syntezie z łączną wydajnością 26%. Otrzymanie związków **108a-b** wymagało przeprowadzenia sześćoetapowych syntez z całkowitą wydajnością 34% i 39% dla odpowiednio **108a** i **108b**.

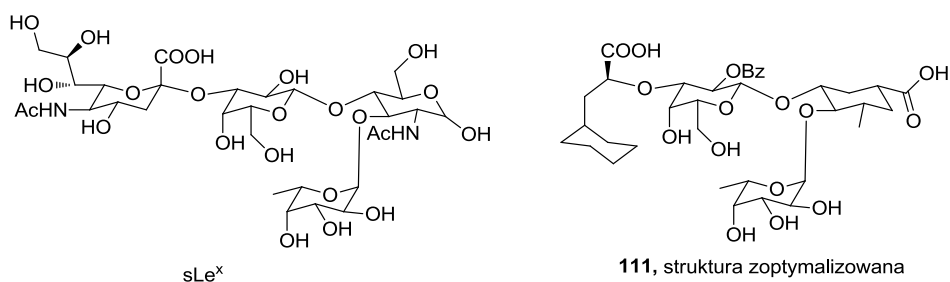
Reakcja łączenia otrzymanych bloków budulcowych prowadzona była w kuchence mikrofalowej (standardowym sprzęcie AGD) w wodnym roztworze Et_3N wobec $[(\text{CH}_3\text{CN})_4\text{Cu}]\text{PF}_6$, bardzo aktywnego kompleksu Cu(I), jako katalizatora (Schemat 2.36). Czasy reakcji, potrzebne na pełne przereagowanie substratów, wynosiły mniej niż 1 min., a wydajności były doskonałe, nie niższe niż 85%.



Schemat 2.361. Synteza hybrydy cyprofloksacyny i neomycyny B.

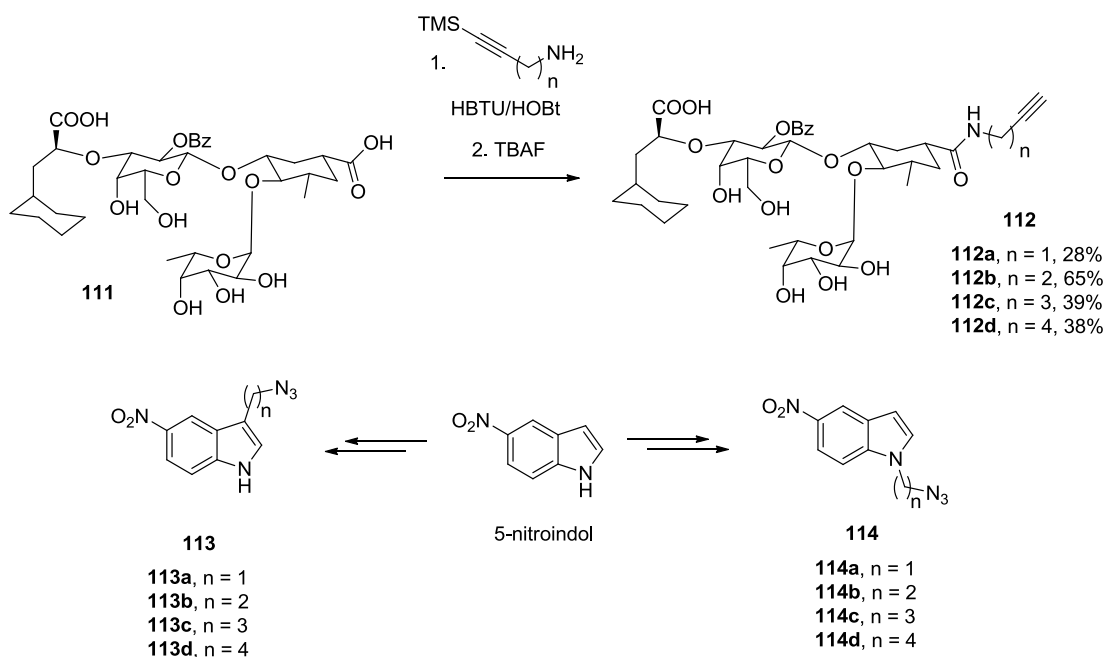
Otrzymana biblioteka połączeń poddana została badaniom aktywności przeciwbakteryjnej na różnych szczepach bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, wykazując znacznie wyższą aktywność niż neomycyna B a porównywalną do cyprofloksacyny. Zaobserwowano dużą zależność aktywności od długości i rodzaju łącznika pomiędzy farmakoforami. Ponadto w toku badań, ustalono, że badane bakterie dużo wolniej uodparniają się na działanie otrzymanych związków hybrydowych typu **110** niż na antybiotyki, z których zostały otrzymane. Najaktywniejszy związek **110** (Schemat 2.36), przebadany został również na wyizolowanych z bakterii *E. coli* enzymach będących obiektami docelowymi neomycyny B i cyprofloksacyny. Wyniki tych testów jednoznacznie wykazały, że hybryda **110** oddziałuje z każdym z tych enzymów.

Racjonalne podejście do syntezy związków hybrydowych zawierających jednostkę węglowodanową w swojej strukturze przedstawił Ernst podczas poszukiwań antagostów E-selektyny.⁹⁹ Selektyny są enzymami, których dysfunkcja powoduje stany zapalne i prowadzi m.in. do astmy i zapalenia stawów.¹⁰⁰



Rysunek 2.16. Struktura Sialyl-Lewis^x i struktura jego pochodnej o podwyższonym powinowactwie do E-selektyny.

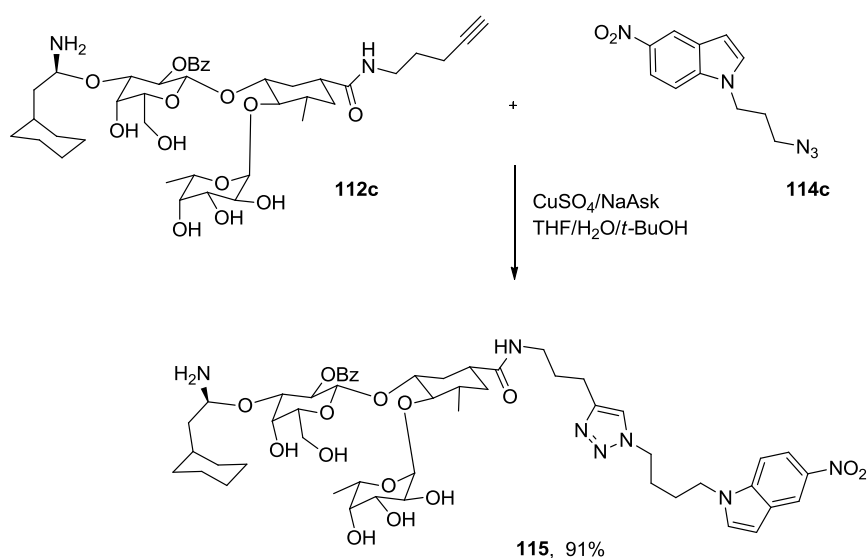
Sialyl-Lewis^x (sLe^x, Rysunek 2.16) jest tetrasacharydem, znanym antagonistą E-selektyny, jednak aktywnym jest jedynie w wysokich stężeniach. Wynika to z faktu, że kompleks sLe^x-E-selektyna ma czas półtrwania rzędu sekund. Celem, jaki postawili sobie autorzy, było znalezienie związku o dużym powinowactwie do E-selektyny, którego połączenie z sLe^x wydłużyłoby czas półtrwania kompleksu aktywnego lek-enzym. Stosując zaawansowane techniki spektroskopowe w badaniach oddziaływań enzymu z biblioteką małych związków heterocyklicznych, do syntezy połączeń z sLe^x wybrano 5-nitroindol. Zoptymalizowana została również struktura pochodnej sLe^x (**111**, rysunek 2.16).



Schemat 2.37. Synteza pochodnych sLe^x i 5-nitroindolu.

Syntezę pochodnych sLe^x zawierających terminalny alkin **112** przeprowadzono poprzez selektywne amidowanie jednej z grup karboksylowych homologami propargiloaminy (Schemat 2.37). Pochodne 5-nitroindolu funkcjonalizowane na atomie azotu i w pozycji 3, otrzymano na drodze standardowych przekształceń.

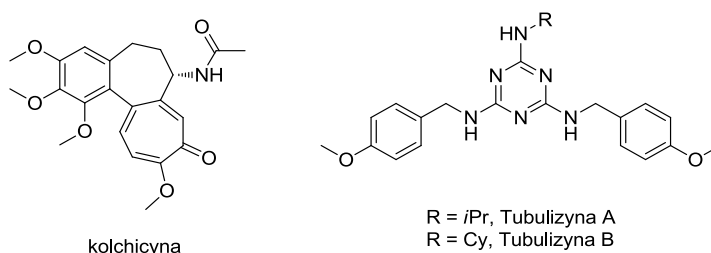
Syntezę połączeń hybrydowych przeprowadzono stosując wszystkie możliwe kombinacje otrzymanych substratów (Schemat 2.38, na schemacie podana jedna przykładowa synteza) z wydajnościami 21-98%. Spośród otrzymanej serii połączeń hybrydowych, wszystkie wykazywały powinowactwo do L-selektyny o rząd wielkości większe niż związek **111** (K_i rzędu 50 nM w porównaniu do **111** $K_i = 1.45 \mu\text{M}$), a czas życia kompleksu enzym-hybrida **115** wynosił pomiędzy 4 a 5 min.



Schemat 2. 38. Synteza hybrydy pochodnej **115** sLe^x i 5-nitroindolu.

2.3.7. Hybrydy różne

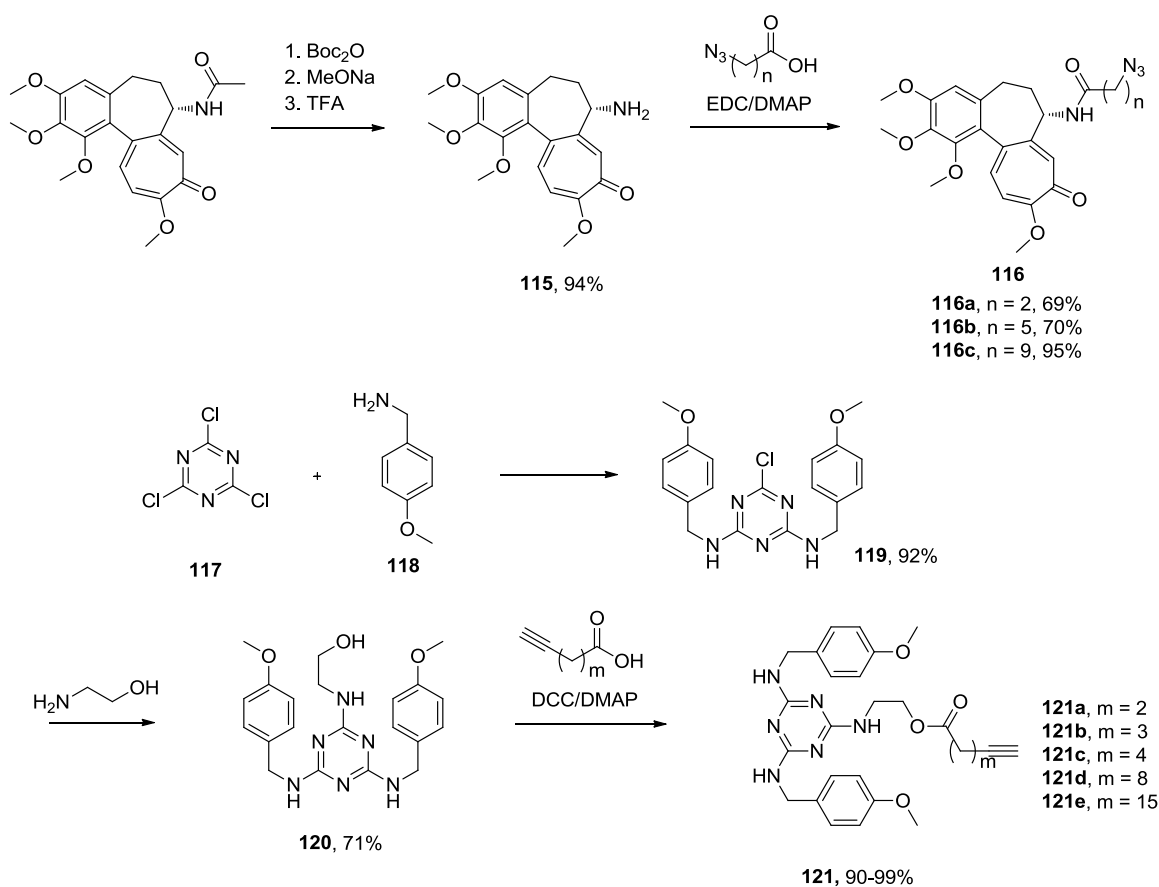
Fedorov zaprojektował hybrydy składające się z alkaloidu kolchicyny i tubulizyny w celu stworzenia związku efektywnie oddziałującego z tubuliną znajdującą się w komórkach rakowych, w wyniku czego następuje zahamowanie mitozy (Rysunek 2.17).¹⁰¹



Rysunek 2.17. Struktury kolchicyny i tubulizyny.

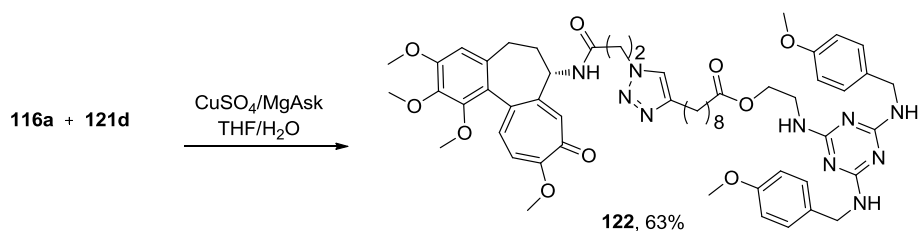
Bazując na doniesieniach, że zmiana podstawników na atomie azotu w kolchicynie i modyfikacja podstawników *N*-alkilowych w tubulizynie nie wpływa znacząco na ich aktywność przeciwnowotworową, zaprojektowano pochodne **116a-c** i **121a-e**, które można połączyć na drodze CuAAC (Schemat 2.39).

Modyfikacja kolchicyny polegała na czteroetapowej syntezie: deacylowaniu grupy amidowej i następczym sprzężeniu z kwasem ω-azydo karboksylowym. Pochodne tubulizyny otrzymano w dwu lub trzyetapowej syntezie wychodząc z chlorku cyjanuru (Schemat 2.39).



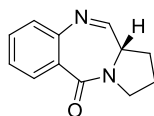
Schemat 2.39. Synteza pochodnych kolchicyny i tubulizyny.

Łączenie otrzymanych bloków budulcowych **116** i **121** na drodze CuAAC przeprowadzono w standardowych warunkach. W reakcjach tych czynnikiem redukującym CuSO_4 był askorbinian magnezu (Schemat 2.40, na schemacie przedstawiona synteza przykładowego związku). Wydajności otrzymanych hybryd typu **122** były umiarkowane do wysokich. Związki te wykazywały silniejsze działanie przeciwnowotworowe niż tubulizyna oraz kolchicina. Optymalna długość łącznika wynosiła 20 atomów ($n = 2$, $m = 8$, Schemat 2.40) i hybryda **122** została wybrana jako struktura wiodąca do dalszych optymalizacji.



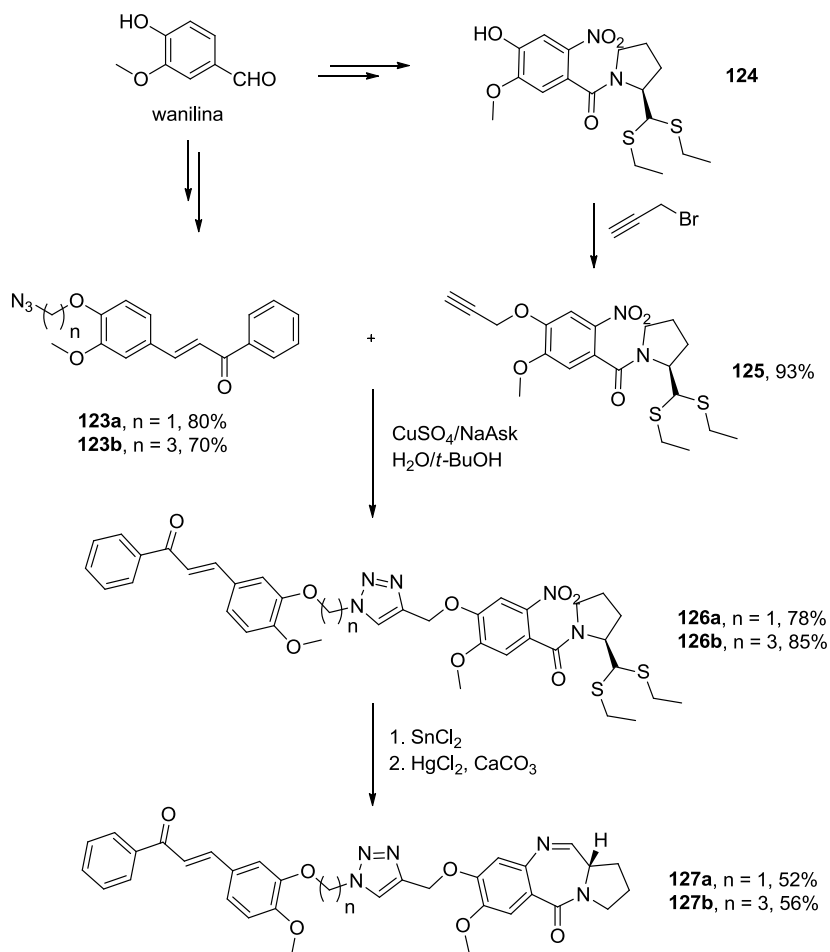
Schemat 2.40. Synteza hybryd pochodnych kolchicyny i tubulizyny.

Kamal opisał syntezę i właściwości przeciwnowotworowe hybryd otrzymanych poprzez połączenie chalkonów z pochodnymi pirolo[2,1-c][1,4]benzodiazepiny (PBD) (Rysunek 2.18),¹⁰² związków o udokumentowanej zdolności do wywoływania apoptozy komórek rakowych.



Rysunek 2.18. Struktura pirolo[2,1-c][1,4]benzodiazepiny (PBD).

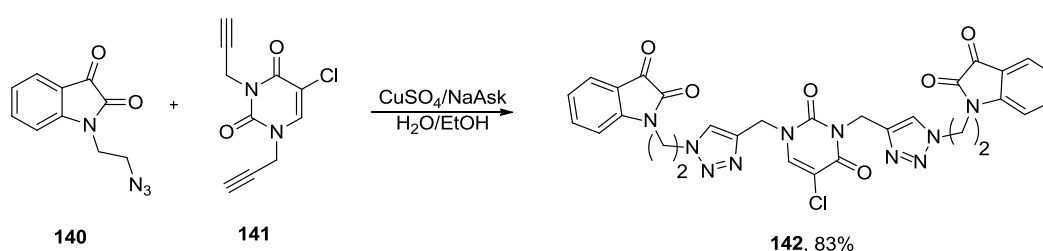
Synteza zaprojektowanych hybryd **127** była zbieżna i wieloetapowa (Schemat 2.41). *O*-alkilowane chalkony **123** z terminalną grupą azydkową otrzymane zostały z waniliny w dwuetapowej syntezie. Substratem do syntezy związku **124**, prekursora PBD, była również wanilina. Prekursor **124** otrzymany został w siedmioetapowej syntezie i poddany *O*-alkilowaniu bromkiem propargilu dając związek **125**. W następnym etapie CuAAC prowadzonym w standardowych warunkach otrzymano hybrydy **126**, które po redukcji grupy nitrowej i następczej cyklizacji prowadziły do pożądaných pochodnych PBD **127**.



Schemat 2.41. Synteza hybryd pochodnych chalkonu i PBD.

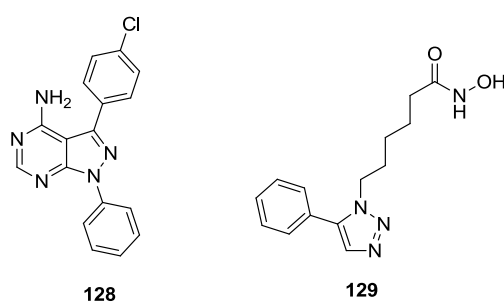
Badania biologiczne na komórkach raka piersi, płuc, jamy ustnej, okrężnicy, prostaty i jajników z wykazały silne działanie przeciwnowotworowe otrzymanych hybryd, szczególnie w przypadku raka piersi. Dokładne badania na białkach, będących obiektami działania chalkonów i pochodnych PBD potwierdziły podwójny mechanizm działania hybryd typu **127**, właściwy dla obydwu farmakoforów znajdujących się w ich strukturze

Połączenia izatyn z pochodnymi uracylu modyfikowanymi w pozycji C-5 były przedmiotem badań Kumara.¹⁰³ Hybrydy otrzymano na drodze CuAAC stosując różne kombinacje *N*-alkilowych pochodnych izatyny oraz pochodnych *N,N*-dipropargilo-5-halogenouracylu. Z bogatej biblioteki otrzymanych hybryd wyłoniony został związek **142** (Schemat 2.42), którego IC₅₀ przeciwko komórkom raka prostaty wynosiło 18 μM.



Schemat 2.42. Synteza hybrydy izatyny i 5-halogenouracylu.

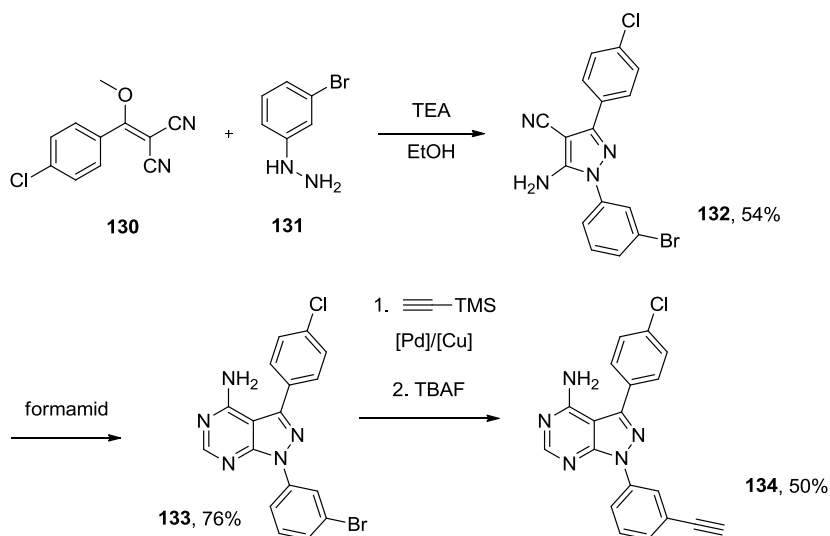
Związek **128** (Rysunek 2.19) jest selektywnym inhibitorem nonreceptora kinazy tyrozynowej (c-Scr) i hamuje wzrost komórek rakowych, z kolei **129** (Rysunek 2.19) jest selektywnym inhibitorem deacetylazy histonowej (HDAC), substancją wywołującą apoptozę komórek rakowych i obecnie znajduje się w fazie badań klinicznych jako potencjalny lek na raka piersi.



Rysunek 2.19. Struktura związków **128** i **129**.

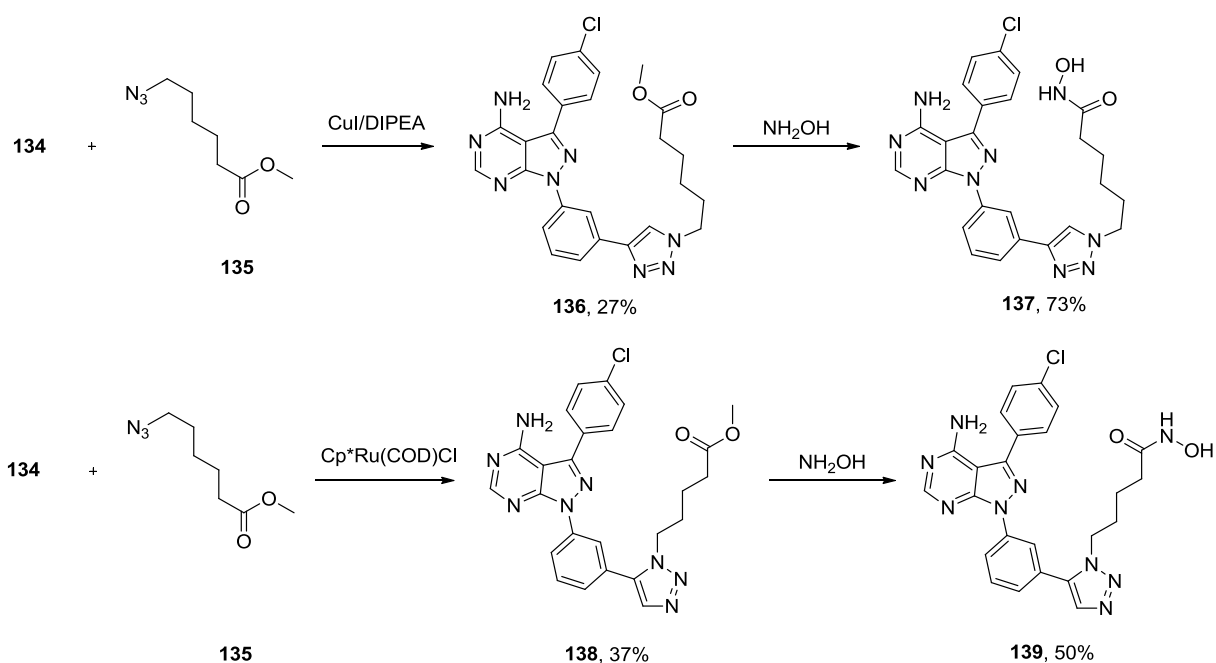
Ko i Soellner zaobserwowali, że mieszanina związków **128** i **129** nie tylko hamowała namnażanie się komórek rakowych ale również wywoływała ich obumieranie.¹⁰⁴ Bazując na tym fakcie zaprojektowali i otrzymali hybrydę **139** (lub jak sami to nazwali chimerę, Schemat 2.44). Związek **134** otrzymany został w czteroetapowej syntezie (Schemat 2.43), obejmującej kondensację 3-

bromofenylohydrazyny **131** z pochodną malononitrylu **130**, reakcję z formamidem i następującą reakcją Sonogashiry. Pożądany związek **134** otrzymano z całkowitą wydajnością 20%.



Schemat 2.43. Synteza związku **134**.

Blok budulcowy **134** został następnie poddany reakcji z azydkiem **135** w obecności soli Cu(I) lub kompleksów Ru(II) (Schemat 2.44), w celu otrzymania regioizomerycznych związków **136** i **138** i porównania ich aktywności biologicznej. Wydajności obydwu reakcji cykloaddycji były wyjątkowo niskie, ale autorzy zaznaczyli, że warunki reakcji nie były optymalizowane.



Schemat 2.44 Synteza hybrid związków **137** i **139**.

Następna reakcja cykloadduktów z hydroksyloaminą dała odpowiednie związki hybrydowe **137** i **139** (Schemat 2.44). Regioizomeryczne hybrydy **137** i **139** poddane zostały badaniom na komórkach raka piersi, w wyniku, których ustalono, że związek **139** ma działanie

przeciwnotworowe przy stężeniach o rząd wielkości niższych niż równomolowa mieszanina wyjściowych bloków budulcowych **128** i **129**. Związek **139** był niemal trójrotnie aktywniejszy niż jego regioizomer **137**.

2.3.8. Podsumowanie

Ilość publikacji na temat wykorzystania katalitycznej AAC w syntezie związków biologicznie czynnych znacznie przekracza ramy zwięzłego przeglądu literaturowego pracy doktorskiej, a nawet licznych, obszernych monografii i artykułów przeglądowych, które z reguły ograniczają się do wybranej klasy związków lub docelowych obiektów ich działania. Przedstawiony przegląd literatury jest jedynie fragmentem możliwości, jakie stwarza katalityczna AAC w nowoczesnej chemii i fragmentem z jej zastosowania w syntezie związków biologicznie czynnych. Z przytoczonych przykładów, a także z licznych prac, które nie zostały w tym przeglądzie uwzględnione, można wyciągnąć wniosek, że wystarczy do mieszaniny azydku i alkinu dodać źródło Cu(I) i, po niespełna dobie, wykrystalizować produkt. Nie jest to do końca zgodne z rzeczywistością, o czym piszący te słowa miał szansę się przekonać. Dla złożonych substratów często konieczny jest staranny dobór warunków reakcji, w tym katalizatora i nie da się uniknąć chromatograficznego oczyszczania produktu. Niezwykle obszerna literatura opisująca zastosowanie CuAAC zakończone sukcesem, pozwala jednak sądzić, że jest to dobry wybór metody łączenia różnych cząsteczek, który powinien przebiegać bez większych problemów.

Intencją autora niniejszego przeglądu nie było wyczerpanie tematu zastosowania CuAAC w syntezie związków biologicznie czynnych, lecz w miarę możliwości, przedstawienie niezwyklej uniwersalności AAC w tej dziedzinie chemii organicznej, w której liczy się możliwie szybki dostęp do dużej liczby, często bardzo skomplikowanych struktur. Przytoczone przykłady są, mam nadzieję, przekonującą ilustracją ogromnego potencjału tej reakcji i argumentem przemawiającym za jej wyborem, jako narzędzia do własnych badań.

3. Badania własne

„Gdyby bowiem dodano doń czegoś obcego, natychmiast by się zepsuło.”

„Rosarium philosophorum: Artis auriferae. tom 2”

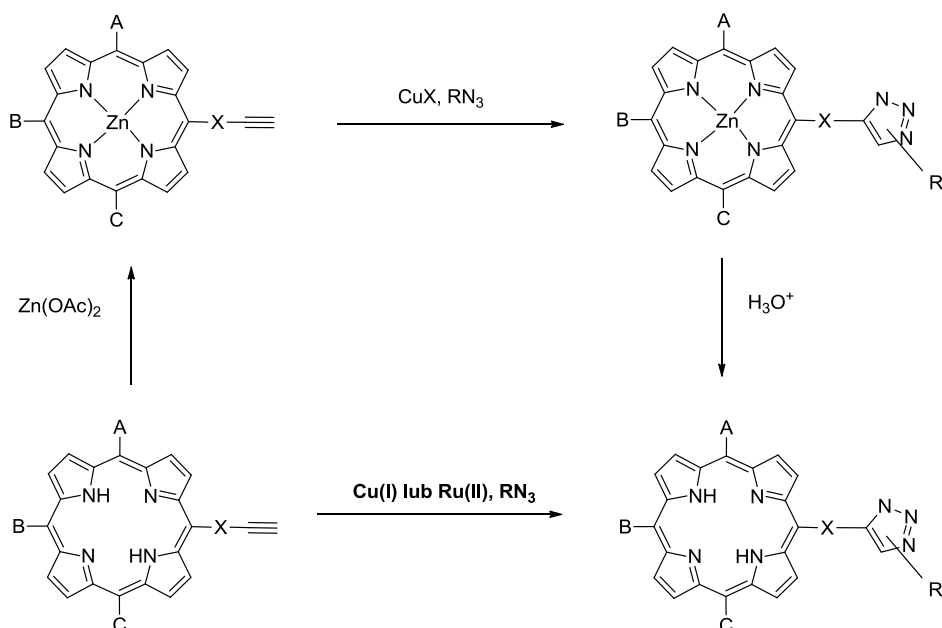
3.1. Optymalizacja warunków prowadzenia reakcji AAC porfiryn w formie wolnej zasady

3.1.1. Wstęp

Zaprojektowane przeze mnie połączenia hybrydowe składające się z jednostki PpIX i pochodnej kobinamidu są potencjalnymi aktywatorami sGC. Celem mojej pracy była synteza możliwie bogatej biblioteki takich połączeń, a CuAAC wydawała się doskonałą reakcją do jej przygotowania. Z doniesień literaturowych wynika, że aktywacja sGC przez kompleksy PpIX z metalami przejściowymi jest nieefektywna,⁶ dlatego też w docelowych hybrydach porfiryna musi występować w postaci tzw. wolnej zasady (ang. *free base porphyrin*). Wymóg ten był pierwszą trudnością, jaką napotkałem w trakcie planowania syntezy docelowych związków hybrydowych.

Porfiryny, jak większość związków tetrapirolowych, są doskonałymi ligandami metali przejściowych, w tym miedzi. Kompleksy Cu-porfiryna odznaczają się łatwością tworzenia i trwałością. Reakcja kompleksowania jest praktycznie nieodwracalna, a usunięcie kationu Cu(II) z kompleksu możliwe jest wyłącznie w silnie kwaśnych warunkach.

Jak wynika z najnowszej literatury dotyczącej modyfikacji porfiryn, w trakcie prowadzenia CuAAC insercja miedzi do luki makrocyklicznej jest procesem nieuniknionym. Łatwość utleniania Cu(I) w środowisku reakcji powoduje, że trudno jest zapobiec powstawaniu Cu(II). Kompleksowanie kationu miedzi (II) w luce makrocyklicznej przerywa cykl katalityczny, ponieważ trwałość kompleksu Cu(II)-porfiryna uniemożliwia odtworzenie się katalizatora.¹⁰⁵ Powoduje to znaczne obniżenie wydajności i/lub zanieczyszczenie produktu niepożądanym kompleksem. Rozdzielenie takiej mieszaniny jest zadaniem karkołomnym lub nawet niewykonalnym za pomocą konwencjonalnych technik. Problem ten można rozwiązać poprzez zastosowanie kompleksów porfiryn z cynkiem jako substratów do CuAAC. Takie podejście wiąże się z wprowadzeniem dwóch dodatkowych etapów: „zabezpieczania” makrocyklicznej luki porfiryny kationem cynku a następnie jej „odbezpieczania” w warunkach kwaśnych po etapie cykloaddycji (Schemat 3.1), co z reguły wiąże się z koniecznością dodatkowego oczyszczania związków pośrednich technikami chromatograficznymi. Ponadto taka strategia wyklucza stosowanie substratów posiadających grupy funkcyjne wrażliwe na działanie kwasów.



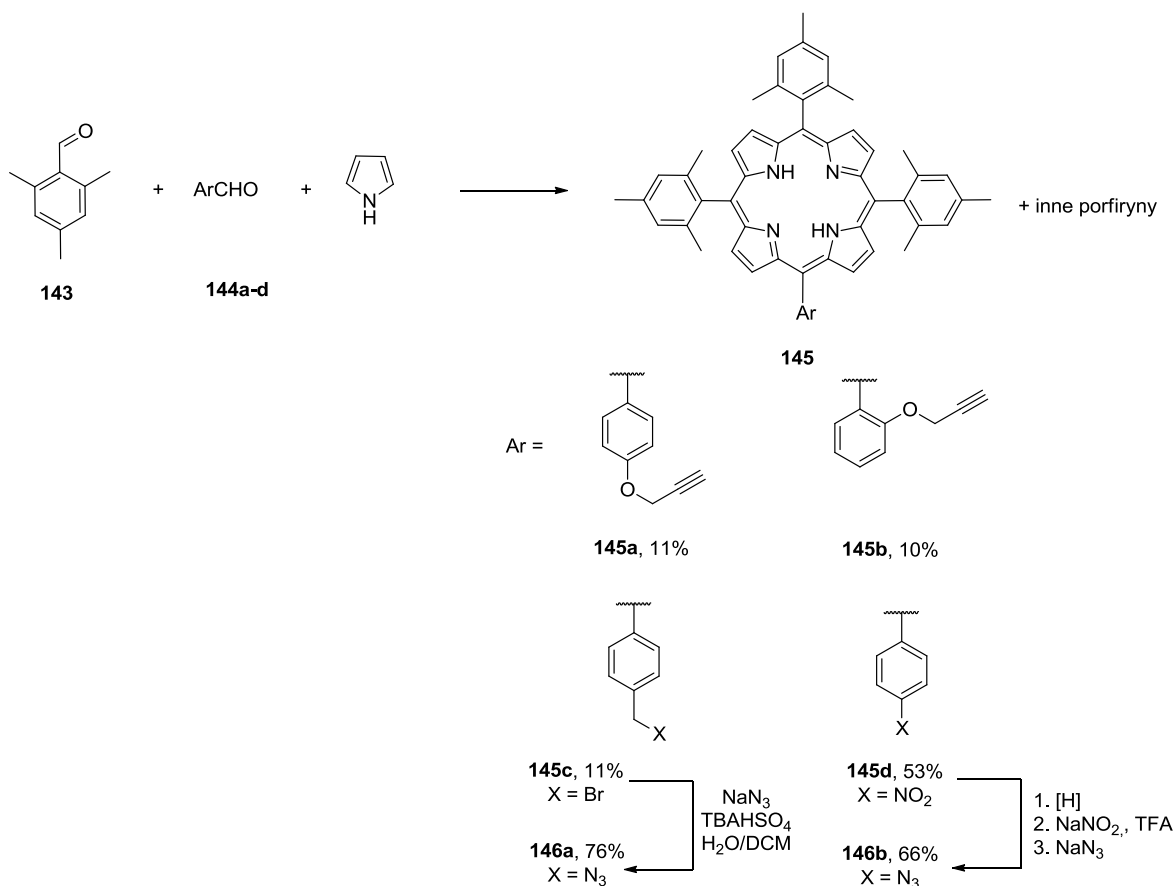
Schemat 3.1. Porfiryny w reakcji AAC.

Burzliwy rozwój metodologii katalitycznych AAC, w tym opracowanie trwałych i aktywnych kompleksów Cu(I) oraz zastosowanie związków innych metali przejściowych zrodziło nadzieję, że możliwe będzie bezpośrednie zastosowanie tej reakcji dla porfiryn, bez konieczności „zabezpieczenia” luki makrocyklicznej (Schemat 3.1). Mając w perspektywie wieloetapowe syntezy skomplikowanych pochodnych protoporfiryny IX uznałem, że warto byłoby je skrócić o dwa etapy, w tym jeden z użyciem silnego kwasu. Opracowanie warunków reakcji AAC, w których nie zachodziłoby kompleksowanie miedzi przez porfirynę wydało mi się atrakcyjnym celem nie tylko z punktu widzenia moich badań, lecz również w kontekście modyfikacji porfiryn.

3.1.2. Synteza porfiryn

Badania nad tym zagadnieniem rozpocząłem od syntezy porfiryn posiadających terminalne grupy alkinowe lub azydkowe. Otrzymane związki podzieliłem na dwie grupy: syntetyczne porfiryny z podstawnikami aryłowymi w pozycjach *mezo* oraz pochodne naturalnej PpIX.

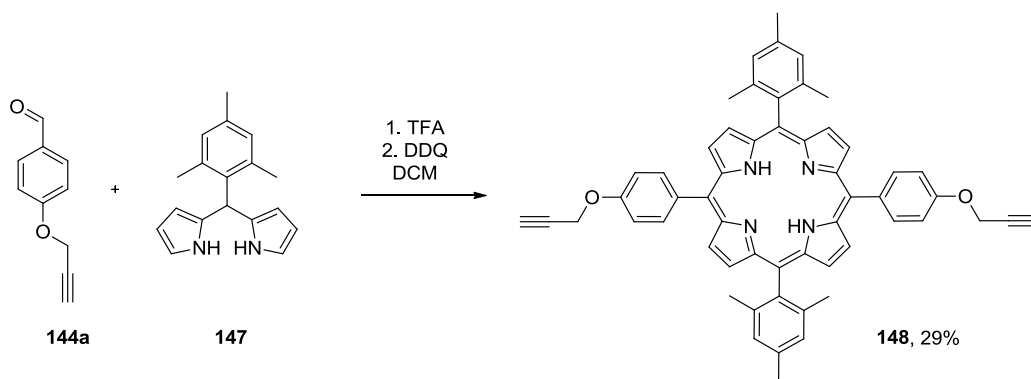
Syntezę porfiryn typu A₃B z podstawnikami aryłowymi w pozycji *mezo* przeprowadziłem według metod opisanych w literaturze.^{106, 107} Otrzymałem je w mieszanej kondensacji pirolu z odpowiednimi aldehydami aromatycznymi w warunkach opisanych przez Lindseya (Schemat 3.2).¹⁰⁶



Schemat 3.2. Synteza porfiryn typu A₃B.

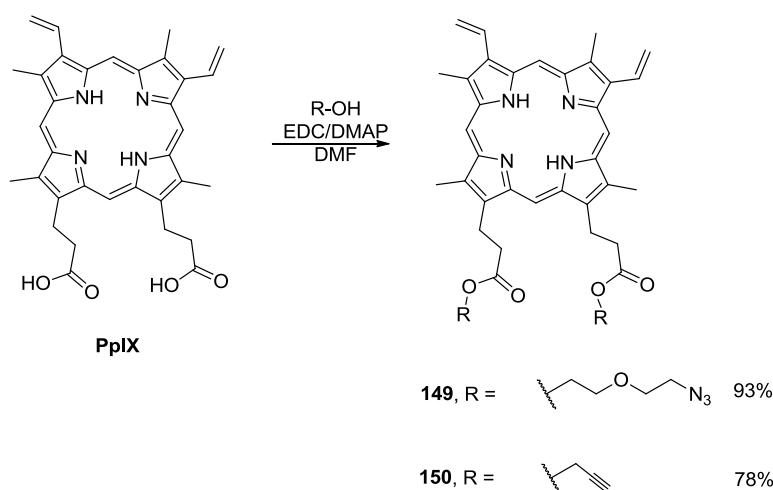
Terminalną grupę alkinową wprowadziłem w postaci eteru propargilowego odpowiednio w pozycje 4- **145a** i 2- **145b** grupy fenylowej. 5-*p*-(Azydometylo)fenylo-10,15,20-trimezytyloporfiryna **146a** (Schemat 3.2) otrzymana została z 5-*p*-(bromometylo)fenylo-10,15,20-trimezytyloporfiryny (**145c**) w reakcji substytucji nukleofilowej anionem azydkowym w warunkach katalizy przeniesienia międzyfazowego.¹⁰⁸ 5-*p*-Azydofenylo-10,15,20-trimezytyloporfiryna **146b** otrzymana została z 5-*p*-nitrofenylo-10,15,20-trimezytyloporfiryny (**145d**), w cyklu przemian: redukcja grupy nitrowej, diazowanie i następcza reakcja z azydkiem sodu.¹⁰⁹

Podczas badań nad zakresem stosowalności opracowywanej metody planowałem sprawdzić, czy okaże się ona efektywna dla porfiryn posiadających więcej niż jedną grupę reaktywną w AAC. W tym celu, w kondensacji 4-propargiloksybenzaldehydu **144a** z 5-mezytylodipirometanem (**147**),¹¹⁰ otrzymałem porfirynę typu *trans*-A₂B₂ **148** posiadającą dwie grupy 4-propargiloksyfenylowe (Schemat 3.3).



Schemat 3.3. Synteza porfiryny typu A_2B_2

Odpowiednie pochodne PpIX **149** i **150** otrzymałem w reakcji estryfikacji PpIX alkoholem propargilowym i 2-(2-azydoetoksy)etanolem (Schemat 3.4). Analogów glikolu etylenowego i estrów propargilowych planowałem użyć jako substratów w syntezie połączeń hybrydowych, o których mowa będzie w kolejnym rozdziale, uznałem więc, że wskazane jest zastosowanie ich w optymalizacji. Reakcje prowadzone były z użyciem EDC/DMAP i dawały pożądane dwuestrowe pochodne **149** i **150** z wysokimi wydajnościami.

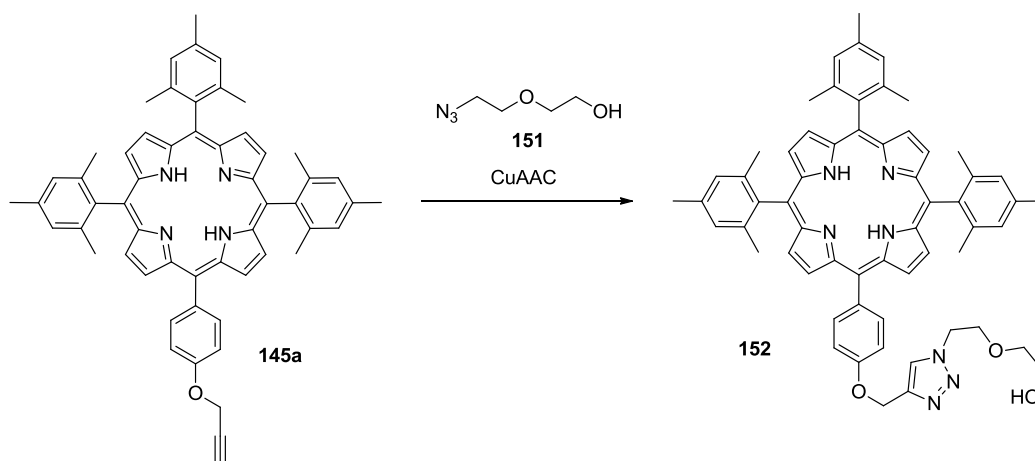


Schemat 3.4. Synteza diestrowych pochodnych PpIX.

3.1.3. Optymalizacja warunków CuAAC

Do prac nad optymalizacją warunków CuAAC dla związków porfirynewych wybrałem reakcję alkinu **145a** z 2-(2-azydoetoksy)etanolem **151** (Tabela 3.1). Wybór podyktowany był tym, że spodziewana różnica w polarności pomiędzy substratem **145a** a produktem **152** jest wystarczająco duża, żeby monitorowanie reakcji techniką TLC oraz oczyszczanie produktu techniką chromatografii kolumnowej nie nastęrczało większych trudności.

Tabela 3.1. Optymalizacja warunków CuAAC porfiryny **145a** z azydkiem **151**.^a



L.p.	Katalizator	[Cu] [mol%]	Rozpuszczalnik	T [°C]	t [h]	Wydajność [%] ^b	Insercja Cu ^f
1	CuSO ₄ /NaAsk ^c	30	DMF	RT	17	34	nd
2	CuSO ₄ /NaAsk ^c	30	DMF	50	17	30	nd
3	CuSO ₄ /NaAsk ^c	60	DMF	RT	17	35	nd
4	CuSO ₄ /NaAsk/TBTA ^{c,d}	30	DMF	RT	17	60	nd
5	CuI/TBTA ^d	30	DMF	RT	17	85	nd
6	CuOAc	20	DCM	RT	0.5	79 ^e	+
7	[Cu(Phen)(PPh ₃) ₂]NO ₃	10	DMF	RT	6	ślady	nd
8	[Cu(Phen)(PPh ₃) ₂]NO ₃	10	DMF	50	2	92	nd

[a] Warunki reakcji: reakcje prowadzone były w atmosferze argonu w probówkach z kranem Rotaflo. Porfiryne **145a** (30 mg, 0.04 mmol, 1.0 Eq) i azydek **151** (7 mg, 0.06 mmol, 1.5 Eq) dodawane były do roztworu katalizatora w odpowiednim rozpuszczalniku i mieszaninę reakcyjną intensywnie mieszano. Reakcje monitorowane były techniką TLC; [b] wydajność wydzielonego produktu; [c] użyto 3 Eq NaAsk; [d] użyto 0.6 Eq TBTA, kompleks Cu(I)/TBTA formowano przez 20 min. przed dodaniem substratów. [e] wydajność **152** i **Cu152**; [f] nd = analiza MS nie wykazała obecności **Cu152** w wydzielonym produkcie.

W pierwszym eksperymencie postanowiłem zastosować standardowy układ katalityczny CuAAC (Tabela 3.1, wiersz 1).¹⁸ Użyłem dziesięciokrotnie większej ilości reduktora, mając nadzieję, że tak duża ilość NaAsk pozwoli na wykluczenie obecności Cu(II) ze środowiska reakcji. Po 17 godzinach zaobserwowałem pełną konwersję substratu **145a**. Niestety, reakcja nie była selektywna i powstało w niej dużo niezidentyfikowanych produktów ubocznych. Pożądana pochodna **152** tworzyła się z wydajnością 34%. Interpretacja widm magnetycznego rezonansu

jądrowego potwierdziła spodziewaną strukturę **152**. Sygnał przy $\delta = 7.92$ ppm w widmie ^1H NMR pochodzi od rezonansu protonu przy C5 w wytworzonym 1,2,3-triazolu i jest on skorelowany z sygnałem przy $\delta = 123.5$ ppm w widmie HSQC odpowiadającym węglowi C5. W widmie MS wydzielonego związku **152** obecne były dwa sygnały przy $m/z = 926.5$ i 948.5 odpowiadające jonom pseudomolekularnym odpowiednio $[\text{M}+\text{H}]^+$ i $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Brak sygnału przy $m/z = 986.5$, spodziewanego dla jonu pseudomolekularnego $[\text{M}+\text{H}]^+$ kompleksu **Cu152**, świadczył o tym, że zastosowanie dużego nadmiaru NaAsk pozwoliło na skuteczne zminimalizowanie (lub nawet wykluczenie) obecności kationów Cu^{2+} w mieszaninie reakcyjnej. Uznałem to za doskonały punkt wyjścia do dalszych badań optymalizacyjnych. Zarówno podniesienie temperatury do $50\text{ }^\circ\text{C}$, jak i zwiększenie ilości katalizatora do 60 mol% spowodowały znaczny spadek selektywności reakcji i powstanie dużej ilości produktów ubocznych (wiersze 2 i 3). Postanowiłem więc rozpocząć poszukiwania innego, efektywniejszego układu katalitycznego. Dodatek TBTA (**10a**, Rysunek 2.1), liganda efektywnie stabilizującego Cu(I) w CuAAC^{36} spowodował znaczną poprawę wydajności reakcji (wiersz 4), lecz znowu powstawały niezidentyfikowane produkty uboczne, znacznie utrudniające oczyszczenie produktu. Zmiana źródła Cu(I) z generowanego *in situ* na CuI spowodowała wzrost wydajności do 85% (wiersz 5). Produkt **152** nie był zanieczyszczony kompleksem **Cu152** (analiza MS), wciąż jednak stosunkowo duża ilość produktów ubocznych o polarności zbliżonej do porfiryny **152** utrudniała jej oczyszczenie. Ponadto TBTA musiało być dodane w dwukrotnym nadmiarze względem źródła miedzi, aby reakcja zaszła z wysoką wydajnością. Kolejnym przetestowanym katalizatorem był CuOAc, opisany w literaturze jako niezwykle efektywny katalizator CuAAC,³⁵ którego aktywność praktycznie nie zależy od użytego rozpuszczalnika. Reakcja przy użyciu tego katalizatora w DCM dała pełną konwersję substratu **145a** w ciągu zaledwie 30 minut, a produkt **152** został wydzielony z wydajnością 79% (wiersz 6). Niestety, widmo MS wydzielonego produktu wykazało, że pomimo zastosowania ściśle bezwodnych i beztlenowych warunków, jest on zanieczyszczony znaczną ilością kompleksu miedzi **Cu152** (sygnały przy $m/z = 986.5$ i 1009.5 dla odpowiednio $[\text{M}]^+$ i $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

W 2012 roku Chen opisał CuAAC katalizowaną kationowym kompleksem $[\text{Cu}(\text{Phen})(\text{PPh}_3)_2]\text{NO}_3$ **16** (Rysunek 2.2).⁴³ Kompleks ten, już w ilości 0.01 mol%, bardzo efektywnie katalizuje reakcję fenyloacetyleny z azydkiem benzylu. W moim przypadku, użycie kompleksu **16** w reakcji **145a** z **151** w temperaturze pokojowej doprowadziło do powstania jedynie śladowych ilości produktu (wiersz 7). Podniesienie temperatury do $50\text{ }^\circ\text{C}$ korzystnie wpłynęło na przebieg reakcji. Pełną konwersję substratu **145a** zaobserwowałem po 2 godzinach, a produkt **152** został wydzielony z wydajnością 92% (wiersz 8), bez śladów zanieczyszczenia kompleksem z miedzią (analiza MS).

Zachęcony tym wynikiem, postanowiłem sprawdzić wpływ rozpuszczalnika na przebieg badanej reakcji. Ku mojemu zadowoleniu, reakcja była szybka, selektywna i wydajna prawie

niezależnie od użytego rozpuszczalnika, pod warunkiem prowadzenia jej w temperaturze 50 °C (Tabela 3.2). Ponadto, zastosowanie toluenu pozwoliło na obniżenie temperatury reakcji do temperatury pokojowej (wiersz 7). Dodatkowo, w reakcji tej ilość użytego katalizatora mogła zostać zredukowana do 3 mol%, a substraty użyte w ilości równomolowej (wiersz 8). W żadnej z przeprowadzonych reakcji nie zaobserwowałem obecności kompleksu miedzi **Cu152** w wydzielonym produkcie.

Tabela 3.2. Wpływ rozpuszczalników na katalizowaną kompleksem **16** CuAAC porfiryny **145a** z azydkiem **151**.

L.p.	16 [mol%]	Rozpuszczalnik	T [°C]	t [h]	Wydajność [%] ^b
1	10	DCM	RT	4	ślady
2	10	DCM	50	4	86
3	10	DCE	RT	4	ślady
4	10	DCE	50	2	80
5	10	MeCN	RT	4	ślady
6	10	MeCN	50	72	43
7	10	toluen	RT	2	96
8 ^c	3	toluen	RT	2	82

[a] Warunki reakcji: reakcje prowadzone były w atmosferze argonu w probówkach z kranem Rotaflo. Porfiryna **145a** (30 mg, 0.04 mmol, 1.0 Eq) i azydek **151** (7 mg, 0.06 mmol, 1.5 Eq) dodawane były do roztworu katalizatora w odpowiednim rozpuszczalniku a mieszaninę reakcyjną intensywnie mieszano. Reakcje monitorowane były techniką TLC; [b] wydajność wydzielonego produktu; [c] użyto 1.0 Eq azydku **151**.

3.1.4. Zakres i ograniczenia opracowanej metody.

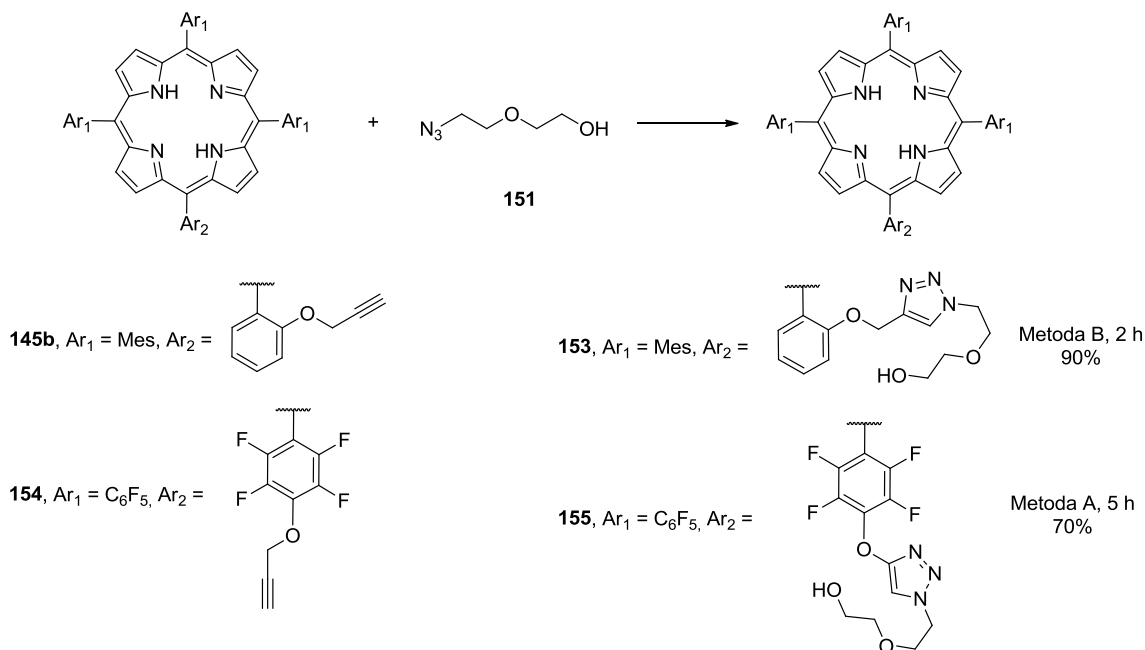
Z powodów związanych z rozpuszczalnością porfiryn w rozpuszczalnikach organicznych, przyjąłem dwa zestawy warunków reakcji do dalszych badań:

A: toluen (0.125 M), 10 mol% katalizatora **16**, temperatura pokojowa,

B: DCE (0.125 M), 10 mol% katalizatora **16**, 50 °C.

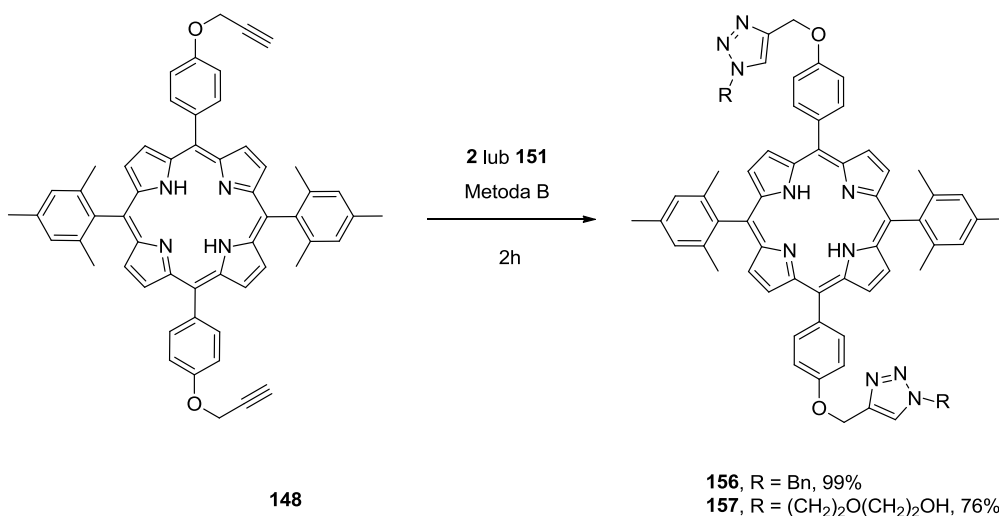
Czas prowadzenia reakcji był zróżnicowany, na wpływ prawdopodobnie miała struktura substratów.

W celu zbadania użyteczności opracowanej metody, używając wyżej opisanych warunków, przeprowadziłem serię reakcji CuAAC z porfirynami posiadającymi terminalny alkin lub grupę -N₃ w różnych pozycjach.



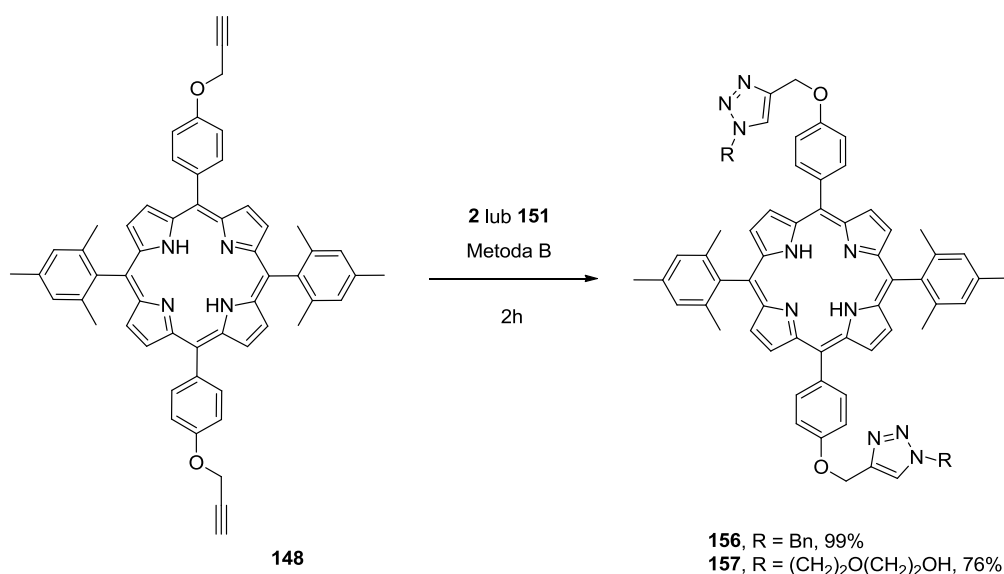
Schemat 3.5. Reakcje azydku **151** z porfirynami zawierającymi w swojej strukturze urugupowanie eteru propargilowy.

Badania rozpocząłem od przeprowadzenia reakcji z porfirynami zawierającymi w swojej strukturze terminalny alkin. Porphyrina **145b**, regioizomer **145a**, w reakcji z azydkiem **151** prowadzonej według metody B, dała produkt cykloaddycji **153** z wydajnością 90% (Schemat 3.5). Z tego wynika, że przebieg reakcji nie zależy od pozycji podstawnika w pierścieniu arylovym w *mezo*-porfirynie. Reakcja perfluoroaryloporfiryny **154**¹¹¹ z azydkiem **151** dała produkt cykloaddycji **155** z wysoką wydajnością 70%, jednakże czas potrzebny do pełnej konwersji musiał zostać wydłużony do 5 h (Schemat 3.5).



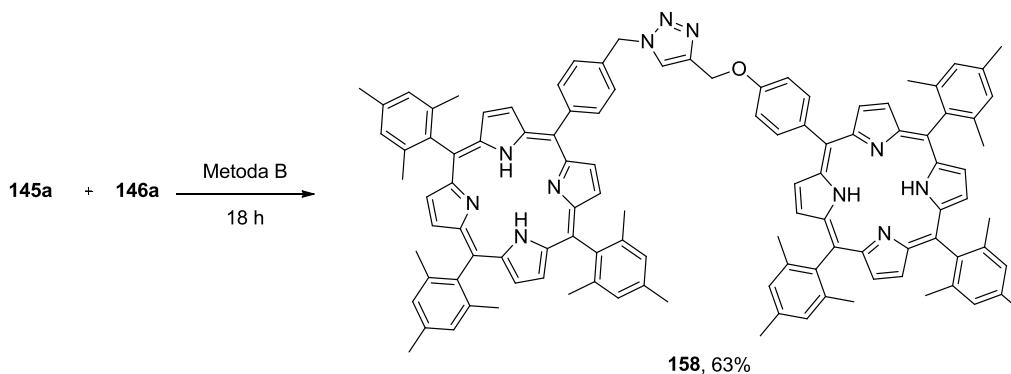
Schemat 3.6. Porphyrina **148** w reakcji CuAAC.

Porfiryra typu A_2B_2 **148**, posiadająca dwie grupy propargiloksyfenylowe, reagowała równie dobrze jak monopodstawione porfiryny, dając w reakcjach z azydkiem benzylu **2** i azydkiem **151** produkty bis cykloaddycji z doskonałymi wydajnościami (Schemat 3.6).



Schemat 3.6. Porfiryra **148** w reakcji CuAAC.

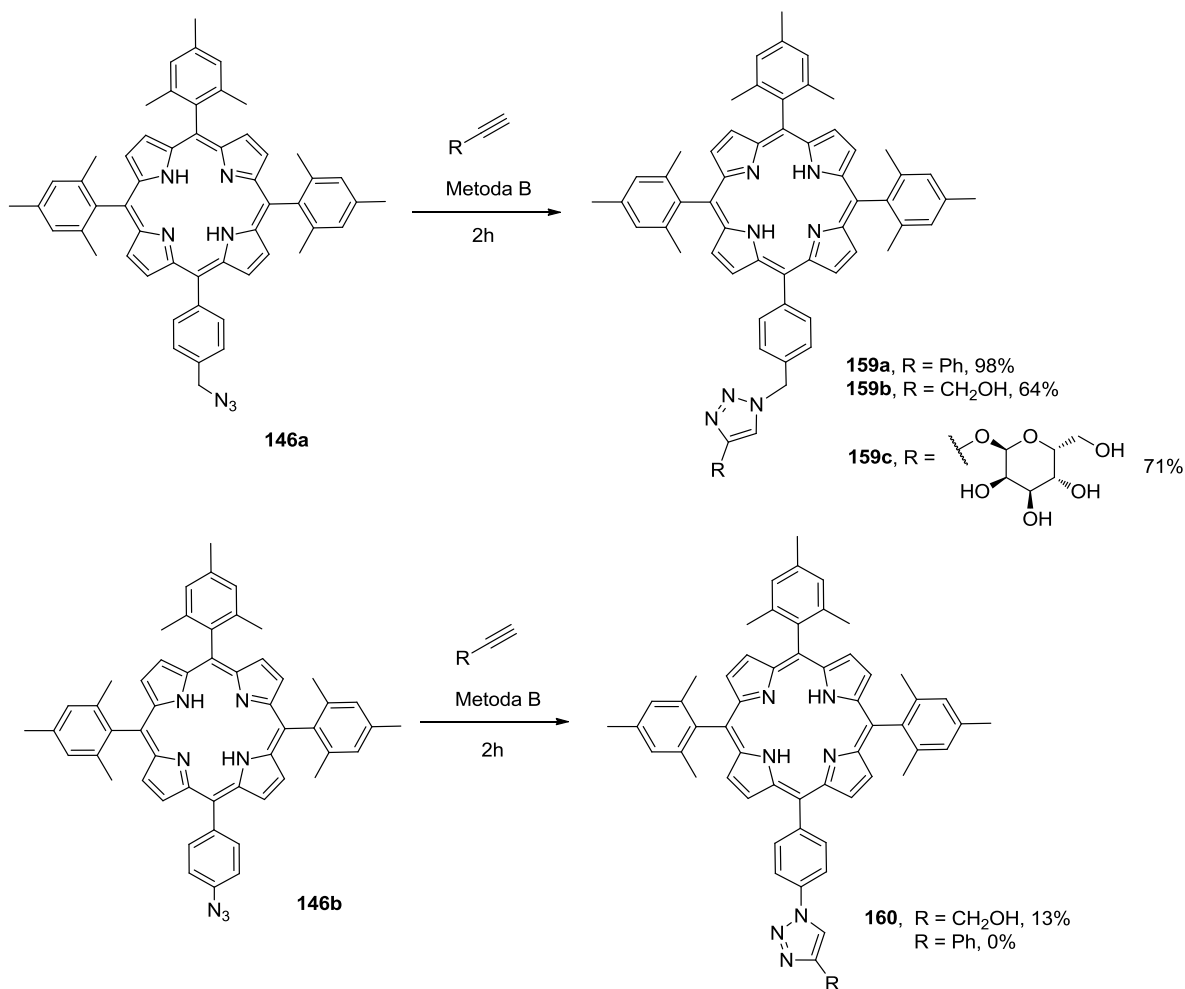
Podjąłem również próbę połączenia porfiryn **145a** i **146a**. Odpowiedni dimer **160** udało się uzyskać z wydajnością 63%. Reakcję należało prowadzić przez 18 godzin, żeby uzyskać pełną konwersję substratu (Schemat 3.7).



Schemat 3.7. Synteza dimeru porfiryn **158**.

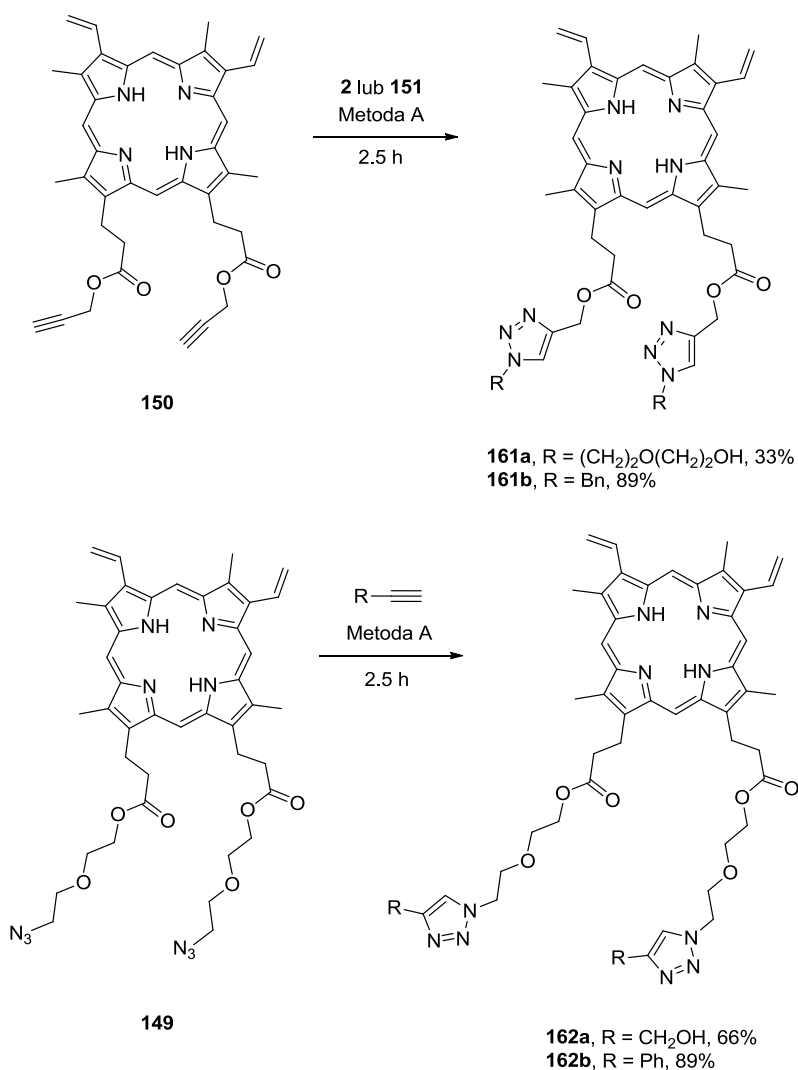
W toku badań sprawdziłem użyteczność opracowanych warunków dla reakcji porfiryn zawierających grupę azydkową z alkinami. Porfiryra **146a**, posiadająca azydek typu benzylowego, w reakcji z feniloacetylenem, alkoholem propargilowym oraz glikozydem propargilowym glukozy dała cykloaddukty z wydajnościami odpowiednio: 98%, 64% i 71% (Schemat 3.8).

Niestety, porfiryra **146b**, z azykiem typu fenylowego, okazała się mało reaktywna. W reakcji z alkoholem propargilowym udało mi się wydzielić produkt cykloaddycji **160** z bardzo niską wydajnością (13%), natomiast reakcja z feniloacetylenem doprowadziła wyłącznie do rozkładu substratu.



Schemat 3.8. Reakcje CuAAC porfiryn posiadających w swojej strukturze grupę $-N_3$ z różnymi alkinami.

Pochodne PpIX okazały się niemal równie reaktywne w zaproponowanych przez mnie warunkach CuAAC (Schemat 3.9). Diester propargilowy **150**, w reakcji z azydkiem **151** i z azydkiem benzylu **2** dał produkty bis cykloaddycji **161a** i **162b** z wydajnościami odpowiednio 33% i 89%. Z kolei reakcje diestru **149** z alkoholem propargilowym i fenyloacetylenem dały produkty **162a** i **162b** z wydajnościami odpowiednio 66% i 89% (Schemat 3.9). Analiza MS wykazała, że również w przypadku prowadzenia CuAAC na pochodnych PpIX w zaproponowanych warunkach, nie zachodzi kompleksowanie Cu(II).



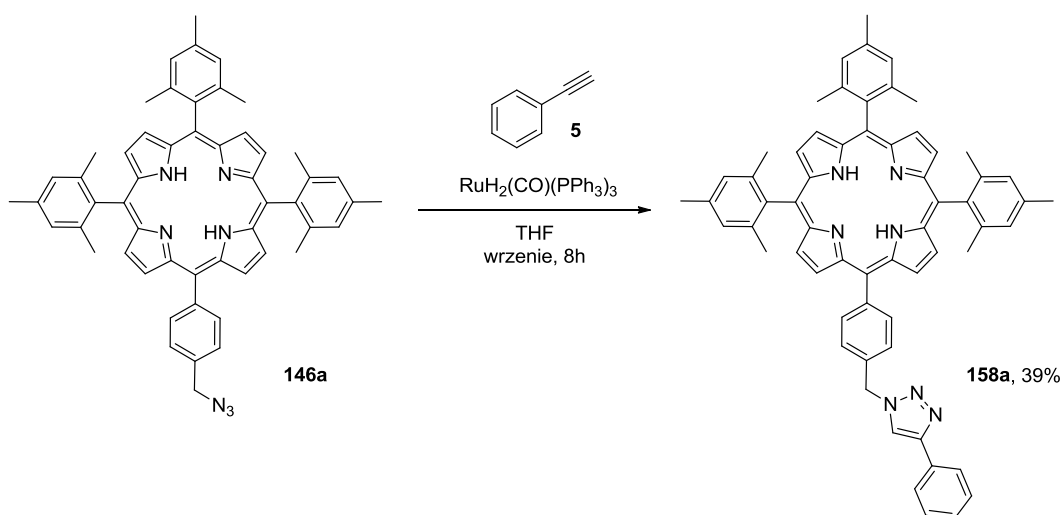
Schemat 3.9. Diestry PpIX w reakcji CuAAC.

3.1.5. Optymalizacja warunków RuAAC

Od czasu odkrycia RuAAC,²⁰ reakcja ta zyskała na popularności jako metoda alternatywna i komplementarna do CuAAC. Ku mojemu zaskoczeniu, nie była ona do tej pory wykorzystywana do modyfikacji porfiryn. Zastosowanie RuAAC w reakcjach porfiryn wydało mi się atrakcyjne, ponieważ porfiryny tworzą kompleksy z rutenem jedynie w stosunkowo drastycznych warunkach, stąd też prawdopodobieństwo koordynacji rutenu w luce makrocyklicznej porfiryny w łagodnych warunkach RuAAC wydawało się znikome. W RuAAC można sterować regioselektywnością reakcji w zależności od struktury użytego katalizatora, a co za tym idzie, mieć potencjalny wpływ na właściwości wytwarzanych związków. Ponadto, najnowsza literatura opisuje katalizator i warunki prowadzenia RuAAC prowadzące do 1,4-

dwupodstawionego 1,2,3-triazolu (produktu analogicznego do tego, który można otrzymać w CuAAC).⁴⁹

W przypadku substratu porfirynowego, najwyższa wydajność, jaką udało mi się uzyskać w reakcji azydku **146a** z fenyloacetylenem wynosiła 39% (Schemat 3.10). Reakcja prowadzona była we wrzącym THF przez 8 godzin, a jej wydajność była znacznie niższa niż ta uzyskana w reakcji katalizowanej $[\text{Cu}(\text{Phen})(\text{PPh}_3)_2]\text{NO}_3$ (Schemat 3.7).

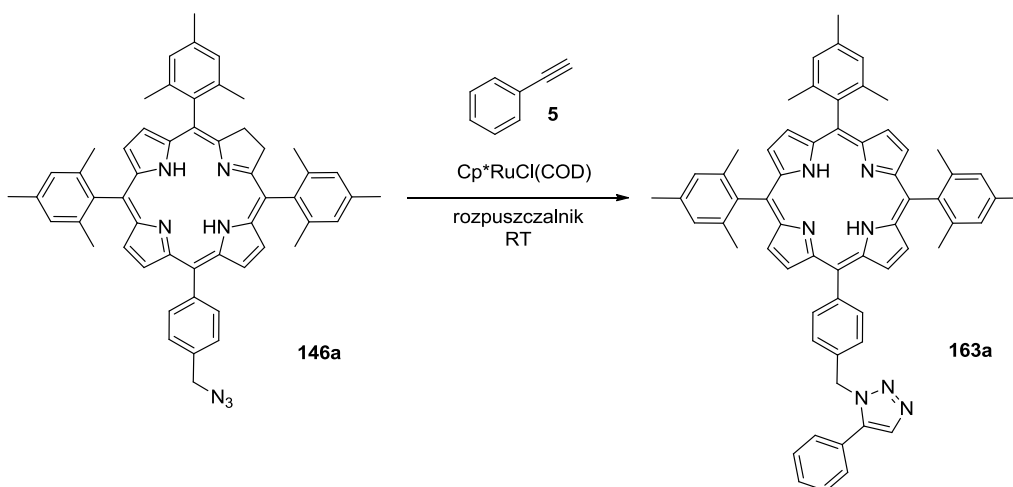


Schemat 3.10. Reakcja RuAAC porfiryny **145d** z fenyloacetylenem.

W toku dalszych badań postanowiłem wykorzystać kompleksy rutenu z ligandem pentametylocyklopentadienylowym (Cp^*). Związki tego typu są aktywnymi katalizatorami RuAAC już temperaturze pokojowej i zapewniają wysokie wydajności oraz całkowitą regioselektywność powstawania 1,5-dwupodstawionego 1,2,3-triazolu.⁴⁸ Do badań nad optymalizacją warunków RuAAC katalizowaną $\text{Cp}^*\text{RuCl}(\text{COD})$ wybrałem reakcję porfiryny **146a** z fenyloacetylenem **5** (Tabela 3.3). W krótkim czasie udało mi się ustalić, że optymalnym rozpuszczalnikiem dla tej reakcji jest THF (wiersz 1), w którym pełna konwersja następowała po 2 godzinach a produkt **163a** mogłem wydzielić z wydajnością 91%. Porównywalne wydajności udało mi się uzyskać w DCM i toluenie, nieco słabszą w DCE (wiersze 2, 3 i 4). Natomiast w reakcjach prowadzonych w polarnych rozpuszczalnikach produkt powstawał znacznie wolniej i z wyraźnie niższą wydajnością (wiersze 5 i 6).

Związki **158a** i **163a**, otrzymane z tych samych substratów wobec różnych katalizatorów, są regioizomerami różniącymi się położeniem podstawników w pierścieniu 1,2,3-triazolu. Porównanie widm ^1H NMR obu związków pokazuje wyraźną różnicę w przesunięciach chemicznych sygnału rezonansu protonu CH w pierścieniach 1,2,3-triazolu.

Tabela 3.3. Wpływ rozpuszczalników na RuAAC porfiryny **146a** z fenyloacetylenem **5** katalizowaną Cp*RuCl(COD).^a



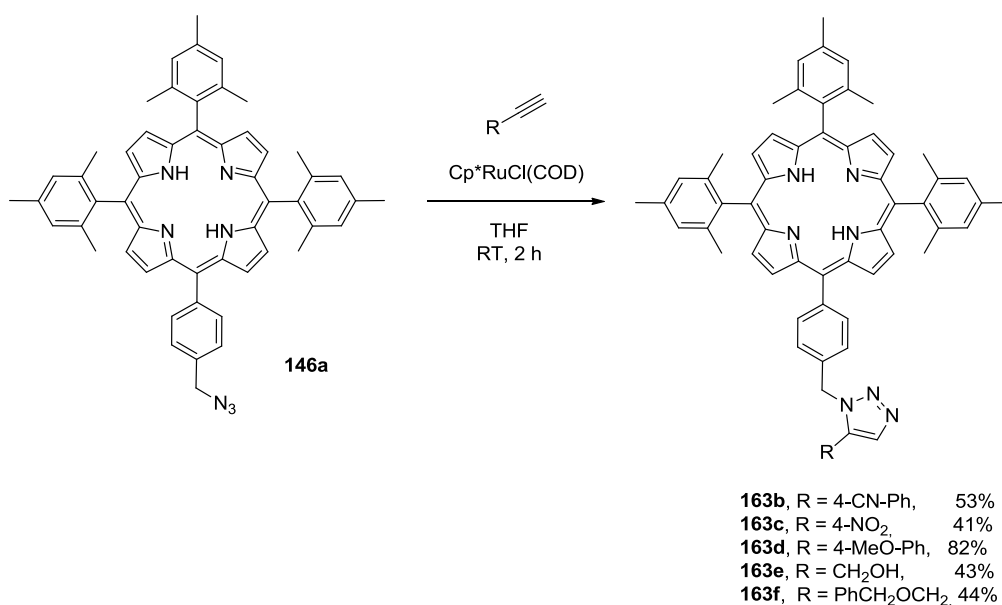
L.p.	Rozpuszczalnik	t [h]	Wydajność [%] ^b
1	THF	2	91
2	DCM	2	86
3	toluen	2	84
4	DCE	2	61
5	DMF	2	18 ^c
6	DMSO	2	ślady ^c

[a] Warunki prowadzenia reakcji: reakcje prowadzone były w atmosferze argonu, fenyloacetylen **5** (4 μ l, 0.036 mmol, 3.0 Eq) i Cp*RuCl(COD) (0.5 mg, 0.001 mmol, 0.1 Eq) rozpuszczono w odpowiednim rozpuszczalniku (0.1 ml) a następnie dodawano porfirynę **146a** (10 mg, 0.012 mmol, 1 Eq). Postęp reakcji monitorowano techniką TLC; [b] wydajność wydzielonego produktu; [c] zwrot substratu **146a**.

W pochodnej **158a** z 1,4-dwupodstawionym 1,2,3-triazolem przesunięcie chemiczne pochodzące od protonu w pozycji C5 pierścienia triazolu wynosi 7.98 ppm, z kolei w pochodnej **163a**, będącej izomerem 1,5-, analogiczny sygnał pochodzący od protonu C4 triazolu znajduje się przy 7.81 ppm. Równie dużą różnicę zaobserwować można śledząc odpowiednie sygnały w widmach ¹³C NMR związków **158a** i **163a**. Sygnał węgla C5 związku **158a** ma przesunięcie 119.7 ppm natomiast węgiel C4 związku **163a** ma przesunięcie 133.4 ppm. Dane te są w pełni zgodne z metodą rozróżniania izomerów 1,2,3-triazoli technikami NMR zaproponowaną przez Crearyego¹¹² i potwierdzają strukturę otrzymanych pochodnych oraz doskonałą regioselektywność zastosowanych reakcji CuAAC i RuAAC.

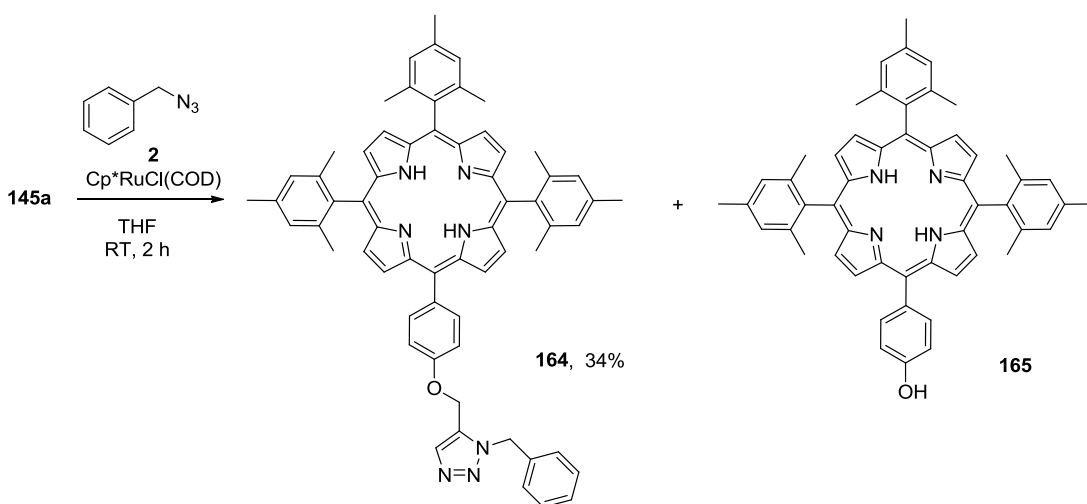
3.1.6. Zakres i ograniczenia opracowanej metody

Mając opracowane optymalne warunki prowadzenia RuAAC oraz potwierdziwszy jej regioselektywność przystąpiłem do badań nad zakresem stosowalności tej reakcji. Wydajność reakcji porfiryny **146a** z pochodnymi fenylacetyleny podstawionymi w pozycji *para* jest uwarunkowana elektronowym charakterem podstawników (Schemat 3.11). Związki z grupami elektronoakceptorowymi (-CN i -NO₂) są wyraźnie mniej aktywne w RuAAC i w reakcji z porfiryną **146a** dały cykloaddukty **163b** i **163c** z wydajnościami odpowiednio 53% i 41%, z kolei silnie elektronodonorowy podstawnik -MeO pozwolił na otrzymanie produktu **163d** z wydajnością 82%. Alifatyczne alkinu odznaczały się umiarkowaną aktywnością: cykloaddukty **163e** i **163f**, otrzymałem w reakcji azydku **146a** z alkoholem propargilowym i eterem benzylopropargilowym z wydajnościami odpowiednio 43% i 44% (Schemat 3.11)



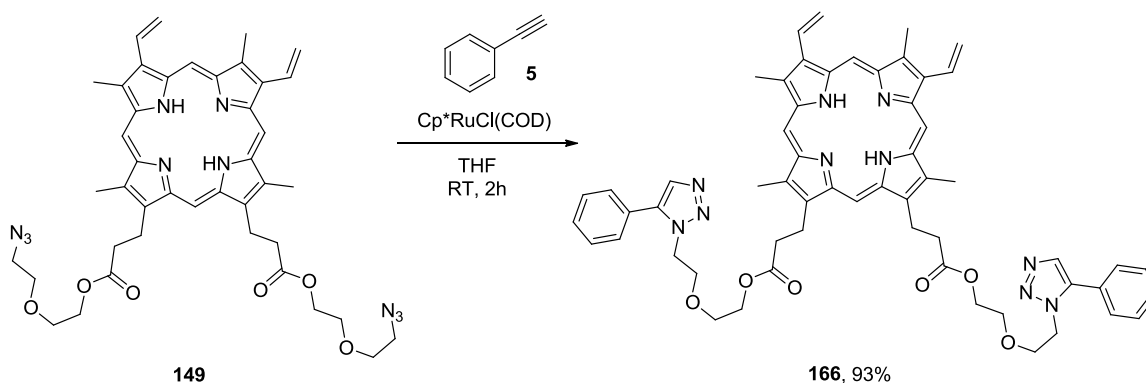
Schemat 3.11. Porfiryne **146a** w reakcji RuAAC z różnymi alkinami.

Ku mojemu zaskoczeniu porfiryne **145a**, posiadająca podstawnik 4-propargiloksyfenylowy, w reakcji z azykiem benzyli **2** dała dużo niższą od spodziewanej wydajność cykloadduktu **164** (Schemat 3.12) oraz dużą ilość produktu ubocznego o dużej polarności. Widmo masowe tego polarnego związku wykazało, że jest on produktem powstałym w wyniku zerwania wiązania węgiel-tlen w grupie eterowej (**165**, Schemat 3.12). Dodatkowym potwierdzeniem nietrwałości eteru propargilowego w warunkach RuAAC, była reakcja porfiryny **145a** z kompleksem Cp^{*}RuCl(COD) prowadzona bez obecności azydku. W tak przeprowadzonej reakcji porfiryne **145a** rozkładała się do **165** oraz innych niezidentyfikowanych związków.



Schemat 3.12. Porfiryra **145a** w reakcji RuAAC.

Reakcja diestrowej pochodnej PpIX **149** z fenyloacetylenem **5** (Schemat 3.13) przebiegła z wysoką wydajnością, dając produkt bis cykloaddycji **166** z wydajnością 93%, co pozwala przypuszczać, że opracowane warunki RuAAC mogą znaleźć zastosowanie do modyfikacji pochodnych PpIX.



Schemat 3.13. Diestrowa pochodna PpIX w reakcji RuAAC.

3.1.7. Podsumowanie

W toku badań nad zastosowaniem katalitycznych wariantów AAC do modyfikacji porfiryry, wykazałem, że zastosowanie odpowiednich parametrów CuAAC pozwala na uniknięcie problemu kompleksowania miedzi przez porfiryrynę. Kluczem do sukcesu okazało się użycie kationowego kompleksu **16** jako katalizatora. Opracowane warunki reakcji CuAAC wobec tego katalizatora są ogólne, a produkty cykloaddycji można otrzymać z wysokimi wydajnościami.

Dodatkowo wykazałem, że możliwe jest efektywne przeprowadzenie reakcji RuAAC katalizowanej kompleksem $\text{Cp}^*\text{RuCl}(\text{COD})$. Pomimo tego, że metoda ta posiada pewne ograniczenia wynikające ze struktury substratów, jest ona dobrym uzupełnieniem nowoczesnych metod funkcjonalizacji porfiryry.

*„Chimajra niepokonana,
która swój ród wywodziła od bogów, a nie od ludzi.
Z przodu lwem była, od tyłu wężem, a kozą pośrodku,
strasznie zionącą potężnym, płomiennym ogniem zagłady”*
Homer, „Iliada”, pieśń 6, wersety 180-182

3.2. Synteza i właściwości biologiczne połączeń protoporfiryny IX i pochodnych kobinamidu

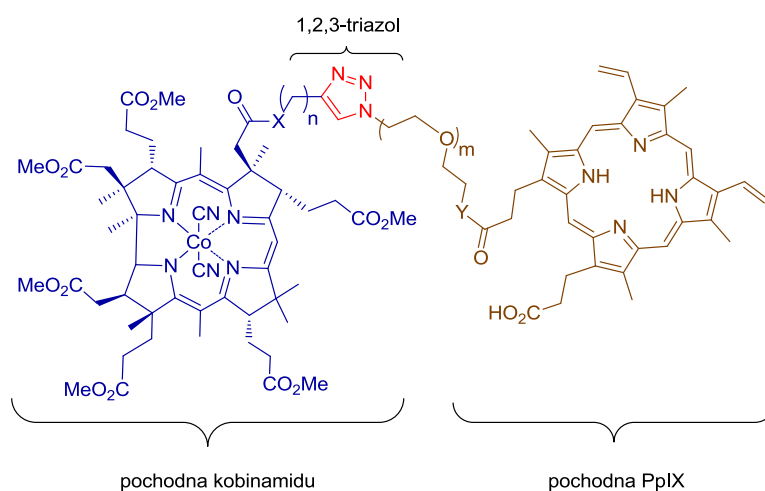
3.2.1. Wstęp

Podstawy koncepcji stworzenia hybrydowych aktywatorów sGC są stosunkowo klarowne: PpIX i kobinamid oddziałują z sGC poprzez wiązanie się w różnych jej domenach i według różnych mechanizmów. Wydawało się więc, że wystarczy połączyć aktywatory łącznikiem o długości, która zapewni swobodny dostęp obu farmakoforów do ich miejsc wiążących. Niestety rzeczywistość okazała się, jak zwykle, bardziej złożona.

Projektując związki hybrydowe złożone z pochodnej kobinamidu i PpIX musiałem uwzględnić kilka istotnych czynników. Po pierwsze struktura krystalograficzna sGC wciąż jest nieznana. Brak szczegółowych informacji na temat struktury oraz odległości i wzajemnej orientacji miejsc wiążących, znacznie utrudniało zaprojektowanie optymalnego kształtu (przede wszystkim długości łącznika) cząsteczki hybrydowej. Kolejna niewiadoma, to dokładny mechanizm oddziaływania pochodnych kobinamidu z domeną katalityczną sGC.⁷ Ustalenie zależności aktywności biologicznej od struktury jest w początkowej fazie badań.⁷⁻⁹ Ponadto zarówno kobinamid jak i PpIX mają stosunkowo skomplikowane struktury. Dlatego też, ważnym aspektem był dobór odpowiedniego sposobu funkcjonalizacji, zapewniającego dostęp do możliwie dużej ilości pochodnych.^{113, 114}

Celem mojego projektu było otrzymanie serii połączeń hybrydowych, których przebadanie pod kątem stymulacji sGC pozwoliłoby na określenie zależności między ich strukturą i aktywnością. Jako narzędzie do łączenia otrzymanych bloków budulcowych wybrałem CuAAC, która, dobrze sprawdza się w sytuacjach, kiedy konieczne jest otrzymanie większych bibliotek związków. Wybór ten był zupełnie arbitralny, aczkolwiek uzasadniony. Strategia, oparta na CuAAC wymaga wprowadzenia do bloków budulcowych azydku oraz terminalnego alkinu, które postanowiłem umieścić w pochodnych odpowiednio PpIX i kobinamidu.

Następną kwestią było zaprojektowanie odpowiedniego łącznika. Decydując się na zastosowanie CuAAC w kluczowym etapie syntezy, wprowadzałem pomiędzy kobinamid a PpIX 1,2,3-triazol, sztywny, pięcioczłonowy pierścień heterocykliczny o ściśle określonej geometrii, zbliżonej do geometrii grupy amidowej. Zależało mi jednak na tym, aby obydwa farmakofory w związkach hybrydowych miały możliwie dużo stopni swobody, by mogły przyjąć optymalną konformację i „wpasować” się w odpowiednie miejsca wiążące sGC. Ostatecznie jako substraty do syntezy łączników wybrałem odpowiednio sfunkcjonalizowane glikole oligoetylenowe oraz alkany. Ogólną strukturę zaprojektowanych hybrydowych połączeń pochodnych kobinamidu i PpIX przedstawia Rysunek 3.1

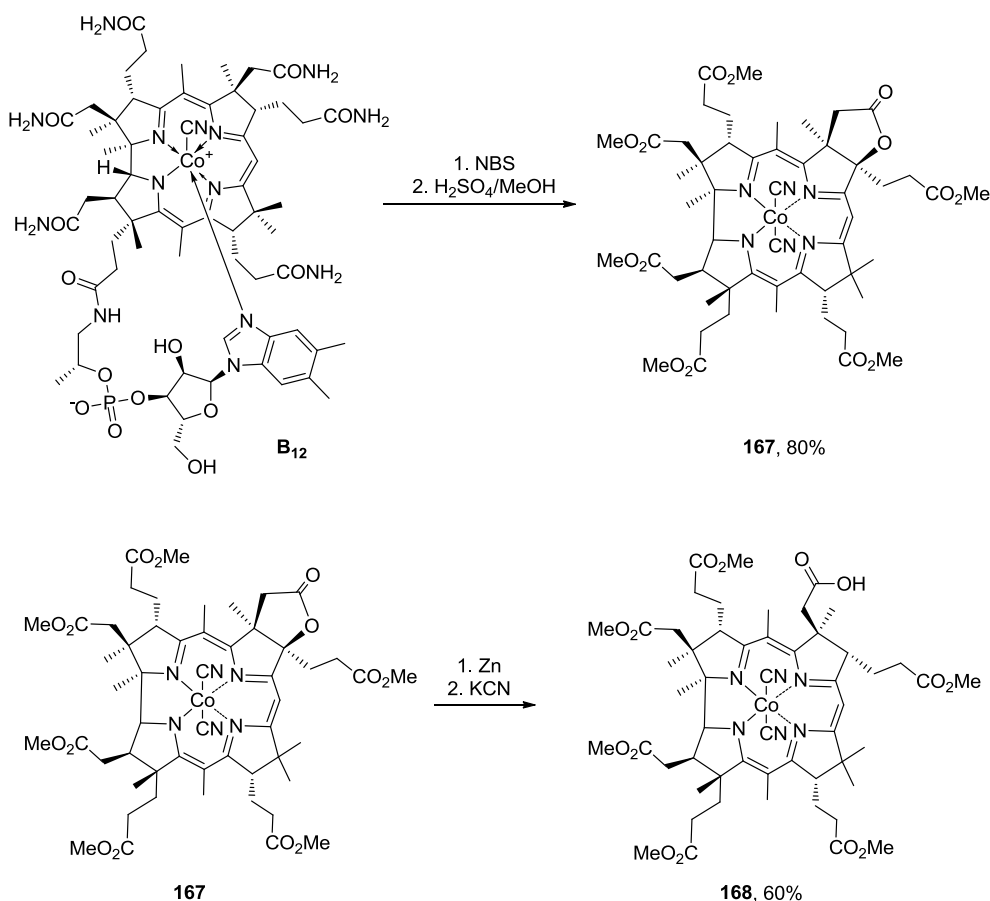


Rysunek 3.1. Ogólna struktura zaprojektowanych połączeń hybrydowych.

3.2.2. Synteza pochodnych kobinamidu

Substratem do syntezy zaprojektowanych pochodnych kobinamidu mogących brać udział w reakcji AAC jest witamina B₁₂ (Schemat 3.14). Jest to cząsteczka złożona, posiadająca wiele różnych grup funkcyjnych. Na pierwszy rzut oka może ona przerazić osobę, której przychodzi mieć z nią do czynienia. Zaskakujący jest jednak fakt, że B₁₂, pomimo skomplikowanej budowy, może być bardzo selektywnie modyfikowana.¹¹³ Przykładem takiej transformacji jest bromolaktonizacja pierścienia B z następczą metanolizą grup amidowych (Schemat 3.14). Tak otrzymany lakton **167** jest doskonałym substratem do otrzymywania heksaestrowych pochodnych kobinamidu sfunkcjonalizowanych w pozycji *c*-. Martin i Gryko wykazali, że estrowe pochodne kobinamidu sfunkcjonalizowane w tej pozycji silnie aktywują sGC.⁷⁻⁹ Biorąc pod uwagę te doniesienia oraz fakt, że modyfikacje pozycji *c*- kobinamidu są selektywne i stosunkowo proste do przeprowadzenia, zaprojektowałem serię pochodnych **169a-e** (Tabela 3.4) posiadających terminalny alkin lub grupę azydkową.

Syntezę laktonu **167**, z następczą metanolizą grup amidowych przeprowadziłem według wysoce wydajnych procedur literaturowych.¹¹⁵ Hydrofobowy lakton **167** (Schemat 3.14) poddałem następnie redukcji cynkiem w kwasie octowym i tak otrzymany *c*-kwas **168** użyłem do modyfikacji na kolejnych etapach.

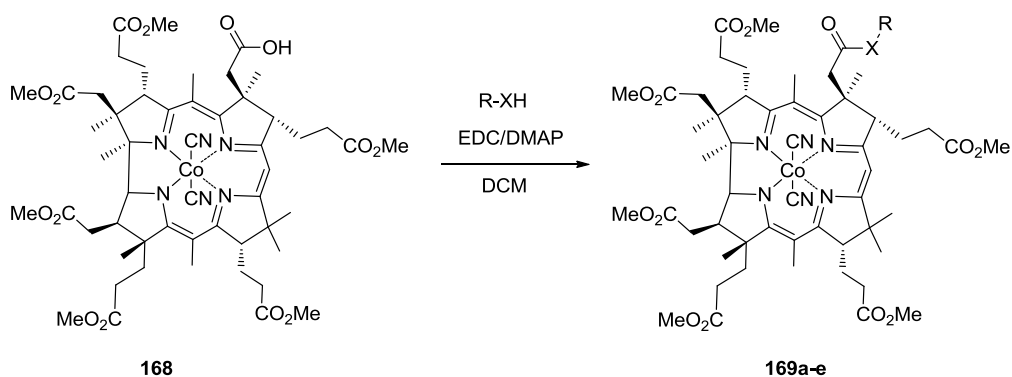


Schemat 3.14. Synteza *c*-kwasu **168**.

Przekształcałem go w estry **169a-b** i amidy **169c-d** odpowiednio alkoholi i amin z terminalnymi grupami alkinowymi, różniącymi się długością łańcucha węglowego (Tabela 3.4, wiersze 1-4). Procedury literaturowe, zalecające wymianę jednego z ligandów cyjankowych kwasu **168** na wodę i użycie DEPC jako odczynnika sprzęgającego,¹¹⁶ zmodyfikowałem i użyłem kwasu **168** w formie kompleksu dicyjano w obecności EDC/DMAP. Modyfikacja warunków reakcji pozwoliła na uniknięcie kłopotliwego etapu wymiany ligandów oraz uzyskanie pochodnych **169a-d** z wysokimi wydajnościami (Tabela 3.4).

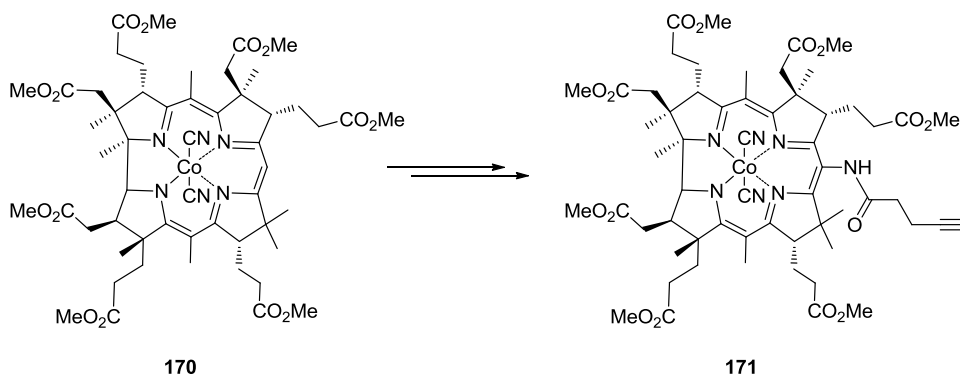
W celu dalszych badań nad optymalizacją długości i budowy łącznika w docelowych związkach hybrydowych, przeprowadziłem syntezę pochodnej **169e**, poprzez estryfikację kwasu **168** azydoalkoholem otrzymanym z gikolu trietylenowego (wiersz 5).

Tabela 3.4. Synteza pochodnych kobinamidu.



L.p.	R-XH	Nr związku	Wydajność [%]
1		169a	91
2		169b	89
3		169c	85
4		169d	75
5		169e	89

Dodatkowo, wpływ miejsca funkcjonalizacji pochodnych kobinamidu w docelowych hybrydach na aktywację sGC planowałem zbadać otrzymując związki, w których fragment kobinamidu połączony byłby z pochodną PpIX poprzez pozycję *mezo*, stosunkowo łatwo dostępną do selektywnych modyfikacji.^{117, 118} Odpowiedni blok budulcowy **171** otrzymałem z heptaestru metyloвого kwasu kobirynowego **170** zgodnie z procedurą opracowaną w naszym zespole (Schemat 3.15).



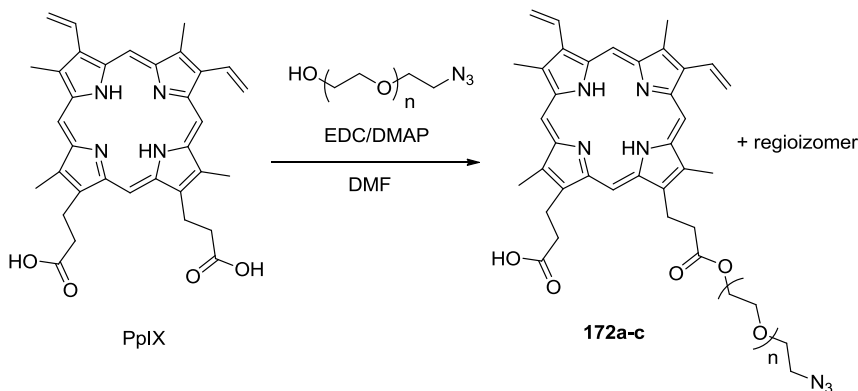
Schemat 3.15. Synteza pochodnej kobinamidu sfunkcjonalizowanej w pozycji *mezo*.

3.2.3. Synteza pochodnych PpIX

Na etapie projektowania hybrydowych połączeń PpIX z pochodnymi kobinamidu musiałem zdecydować, które z grup funkcyjnych w związkach wyjściowych poddam modyfikacji, a co za tym idzie, jaka będzie strategia syntezy biblioteki pochodnych. Z badań nad wpływem modyfikacji PpIX na aktywację sGC wynika, że porfiryne musi występować w formie wolnej zasady a grupy winylowe i propanokaboksylowe są koniecznymi elementami strukturalnymi zapewniającymi wysoką aktywność biologiczną.⁶ Ostatecznie zdecydowałem się na modyfikację grup propanokarboksylowych, co było podyktowane głównie względami praktycznymi. Modyfikacja grup winylowych obniża trwałość otrzymywanych pochodnych, co utrudnia wykonywanie wszelkich operacji (zwłaszcza oczyszczania) i wyklucza dłuższe przechowywanie otrzymanych związków.¹¹⁴ Dodatkowym czynnikiem przemawiającym na niekorzyść modyfikacji grup winylowych była nieunikniona konieczność zabezpieczania grup –CO₂H, co znacznie skomplikowałoby i wydłużyło syntezy docelowych bloków budulcowych.

Produkty modyfikacji grup karboksylowych PpIX, są nie tylko trwalsze i prostsze do otrzymania, ale zapewniają również dobrą rozpuszczalność związków w rozpuszczalnikach organicznych, co znacznie ułatwia ich oczyszczanie technikami chromatograficznymi.

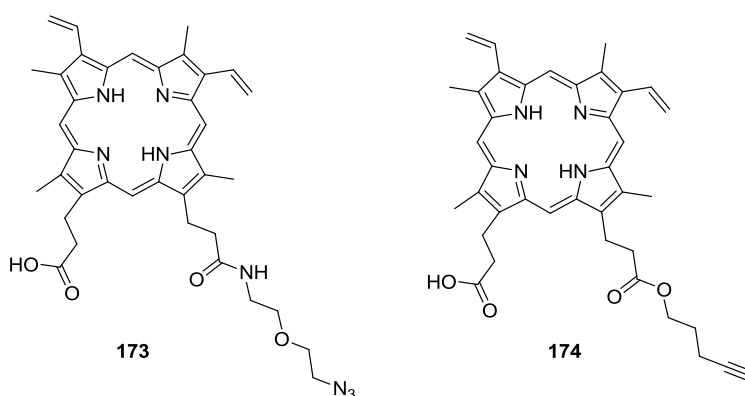
Tabela 3.5. Synteza monoestrowych pochodnych PpIX.



L.p.	n	Nr związku	Wydajność [%]
1	1	172a	61
2	2	172b	58
3	3	172c	54

Stosując metodę estryfikacji, użytą wcześniej do otrzymania diestrów PpIX (Schemat 3.4), przeprowadziłem syntezę serii monoestrów (Tabela 3.5). Selektywną estryfikację jednej z

grup propanokarboksylowych udało się przeprowadzić stosując niskie stężenie PpIX (0.01M), powolne wkraplanie roztworu alkoholu (1.05 Eq) do mieszaniny reakcyjnej oraz odpowiednio dobraną ilość odczynników sprzęgających. Do reakcji użyłem pochodnych glikolu odpowiednio di, tri i tetraetylenowego z terminalną grupą azydkową (Tabela 3.5).¹¹⁹ Wydajności reakcji były umiarkowane a, otrzymane monoestry **17** trwale i dobrze rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych (DCM, chloroform, THF, AcOEt). Ze względu na to, że struktura PpIX nie jest symetryczna, otrzymane pochodne były mieszaninami regioizomerów, których nie byłem w stanie w żaden sposób rozdzielić.

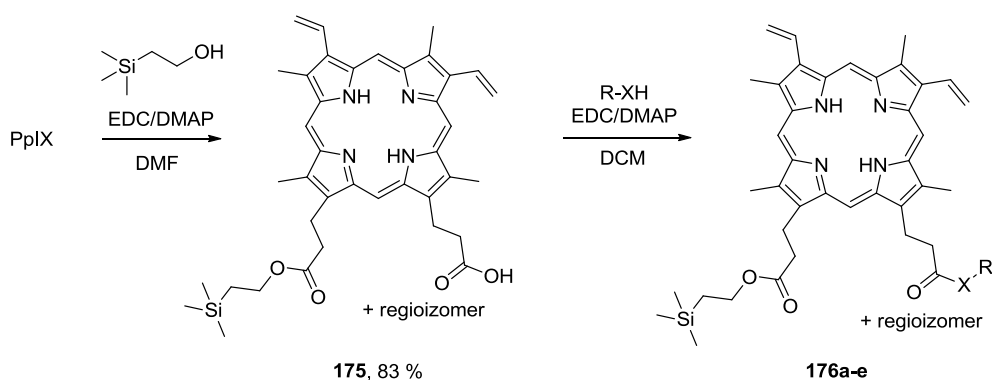


Rysunek 3.2. Pochodne PpIX o ograniczonej rozpuszczalności.

Próba otrzymania analogu związku **172a** z grupą amidową zamiast estrowej (**173**, Rysunek 3.2) oraz monoestru pent-4-yn-1-olu **174** (Rysunek 3.2) zakończyły się połowicznym sukcesem. Wprawdzie udało mi się otrzymać pożądane związki, lecz z powodu z ograniczonej rozpuszczalności w DCM i chloroformie ich wydzielanie było trudne, czasochłonne i mało wydajne.

Z powodu trudności technicznych związanych z oczyszczaniem, na które natknąłem się na etapie otrzymywania biblioteki związków hybrydowych, postanowiłem otrzymać związki **176a-c** (Tabela 3.6, wiersze 1-3), analogi **172a-c**. Modyfikacja struktury polegała na estryfikacji wolnej grupy kwasowej 2-trimetylosililoetanołem. Estry tego typu są stosowane jako grupa zabezpieczająca, którą łatwo można usunąć w reakcji ze związkami będącymi źródłem anionu fluorkowego lub mieszaniną TFA/DCM.¹²⁰ Pochodną **175** (Tabela 3.6) otrzymałem z doskonałą wydajnością według procedury analogicznej do otrzymywania monoestrów **172a-c**. Monoester **175** jest dorze rozpuszczalny w rozpuszczalnikach organicznych, a przekształcenie drugiej grupy karboksylowej w odpowiednie estry **176a-c** przebiegło z niemal ilościowymi wydajnościami (wiersze 1-3).

Tabela 3.6. Dwuetapowa synteza diestrowych lub amidoestrowych pochodnych PpIX.



L.p.	R-XH	Nr związku	Wydajność [%]
1		176a	96
2		176b	85
3		176c	90
4		176d	95
5		176e	98

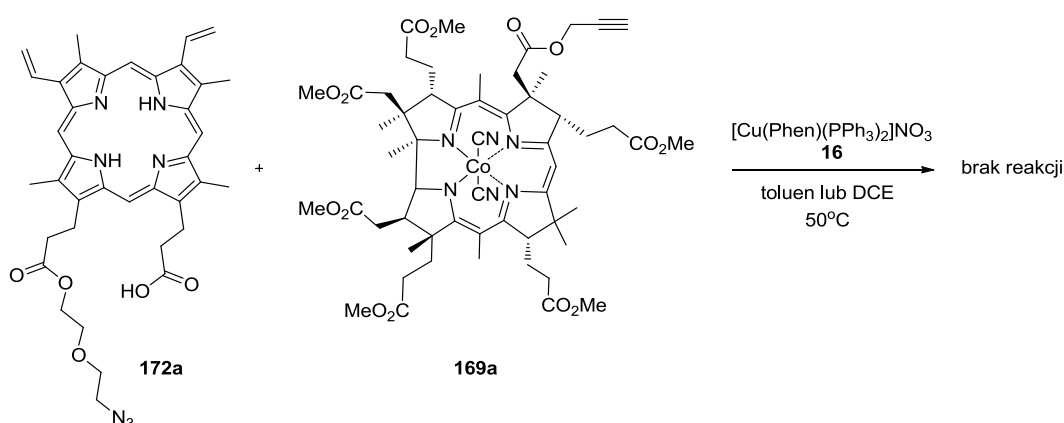
Otrzymanie połączeń związków **173** i **174** (Rysunek 3.2) z pochodnymi kobinamidu było istotne z punktu widzenia późniejszych badań nad optymalizacją struktury łącznika. Zastąpienie wolnej grupy karboksylowej estrem 2-trimetylosililowym rozwiązało problem z rozpuszczalnością. Odpowiednie pochodne **176d-e** otrzymałem z wysokimi wydajnościami (wiersze 4 i 5).

Wprowadzenie estru 2-trimetylosililo-etanolu znacząco obniża polarność pochodnych PpIX, co na kolejnych etapach ułatwiało oddzielanie związków hybrydowych od pozostałości substratów. Związki **176a-e** są łatwe do otrzymania i oczyszczenia, a wydajności ich syntez bardzo wysokie.

3.2.4. Optymalizacja warunków otrzymywania połączeń hybrydowych

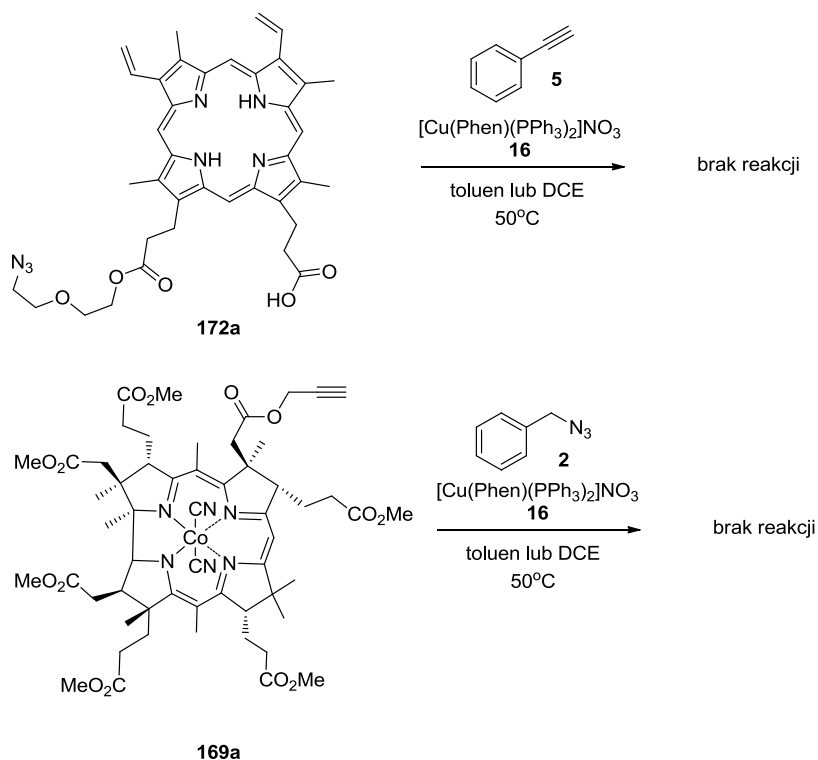
Mając opracowane efektywne metody syntezy bloków budulcowych oraz warunki CuAAC, w których nie zachodzi insercja miedzi do luki makrocyklicznej porfiryny, przystąpiłem do otrzymywania połączeń hybrydowych.

Jako związki modelowe wybrałem pochodną kobinamidu **169a** (ester propargilowy kwasu **168**) oraz monoester **172a** otrzymany z PpIX. Ku mojemu zaskoczeniu, reakcja koryny **169a** z porfiryną **172a**, wobec katalizatora **16** nie zachodziła w ogóle (Schemat 3.16). Niezależnie od ilości użytego katalizatora i czasu prowadzenia reakcji odzyskiwałem substraty oraz obserwowałem tworzenie się niewielkich ilości bardzo polarnych, niezidentyfikowanych produktów ubocznych.



Schemat 3.16. Próba połączenia koryny **169a** i porfiryny **172a** z użyciem kompleksu **16**.

Związki typu **169** oraz **172** nie były wykorzystywane podczas optymalizacji i badań nad ograniczeniami metody prowadzenia CuAAC wobec kompleksu **16**. Postanowiłem więc sprawdzić czy w warunkach, które przyjąłem za optymalne, substraty do syntezy połączeń hybrydowych są reaktywne.



Schemat 3.17. Próby wprowadzenia pochodnych **169a** i **172a** a w reakcję z użyciem kompleksu **16**.

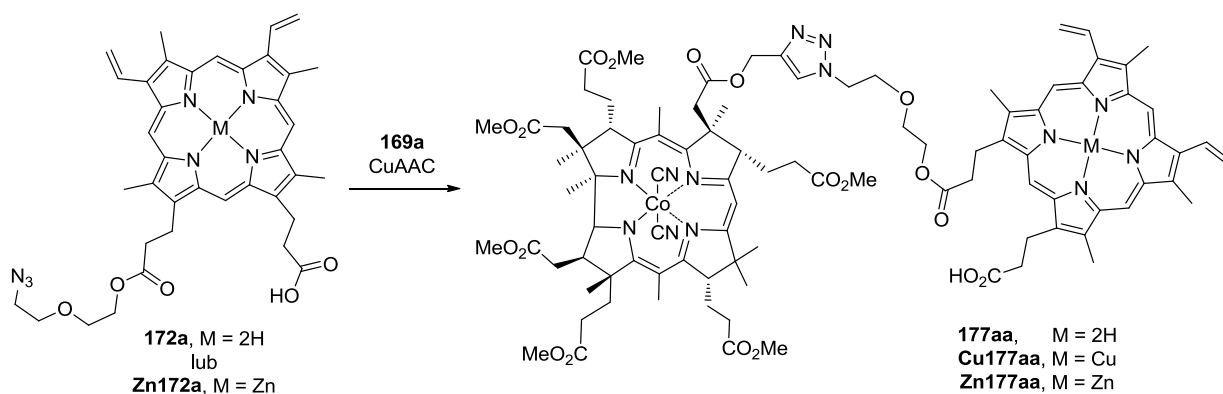
Z przeprowadzonych eksperymentów, w których alkin **169a** i azydek **172a** próbowałem poddać CuAAC z prostymi, reaktywnymi partnerami: azydkiem benzylu **2** i fenyloacetylenem **5** (Schemat 3.17) wynikało, że ani monoester PpIX **172a** ani ester propargilowy **169a** nie wchodzi w reakcję CuAAC w opracowanych warunkach. W żadnej z tych reakcji nie zaobserwowałem tworzenia się oczekiwanego produktu, jedynie zwrot substratów. Przyczyny nie udało mi się ustalić.

W sytuacji, kiedy w opracowanych warunkach CuAAC żaden z substratów nie wchodził w kluczową reakcję cykloaddycji, zmuszony byłem do poszukiwań innego układu katalitycznego, który pozwoliłby na połączenie otrzymanych bloków budulcowych (Tabela 3.7). Badania rozpocząłem od sprawdzenia najprostszego układu katalitycznego, czyli generowania Cu(I) *in situ*. Zastosowanie CuSO₄/NaAsk do reakcji alkinu **169a** z azydkiem **172a** w polarnych rozpuszczalnikach (wiersze 1 i 2) doprowadziło do otrzymania wyłącznie śladów produktu.¹⁸ Obecność w widmie spektrometrii mas sygnału przy $m/z = 1761.6$ odpowiadającego jonowi pseudomolekularnemu [M-CN]⁺ wykazała, że wydzielony związek jest oczekiwanym produktem cykloaddycji **177aa**. Obecność sygnału przy $m/z = 1822.7$ wskazywała na to, że jest on zanieczyszczony produktem insercji miedzi do luki makrocyklicznej jednostki profirynowej. Nie pomogło zastosowanie dodatku liganda stabilizującego Cu(I) (TBTA)³⁶ nawet w dużym nadmiarze (wiersz 3). Zmiana źródła miedzi na układ CuI/TBTA również nie poprawiła wyniku reakcji – śladowe ilości hybrydowego produktu **177aa** zanieczyszczone były jego kompleksem z miedzią **Cu177aa** (wiersze 4-6).

Okazało się, że przeprowadzenie reakcji na porfirynie **172a** w formie wolnej zasady jest dużo trudniejsze niż się spodziewałem. Dlatego też, zdecydowałem się na zastosowanie kompleksu cynku jako substratu. Kompleks cynkowy porfiryny **Zn172a** otrzymywałem w reakcji z Zn(AcO)₂. Niestety porfiryna **Zn172a** okazała się nietrwała, zatem wydzielalem ją wyłącznie technikami ekstrakcji i używałem bezpośrednio do następnego etapu.

Reakcja porfiryny **Zn172a** z pochodną kobinamidu **169a** w obecności CuSO₄/NaAsk postępowała bardzo powoli (wiersz 7), a powstawaniu produktu towarzyszyło tworzenie się znacznych ilości polarnych produktów ubocznych. Po czterech dniach prowadzenia reakcji udało się wydzielić zaledwie 10% pożądanego kompleksu cynkowego hybrydy **Zn177aa**. Znacznie aktywniejszy katalizator, układ CuI/TBTA nie przyspieszył przebiegu reakcji. Niezależnie od zastosowanego rozpuszczalnika (wiersze 8-11) konwersja wciąż była bardzo powolna, a reakcja nieselektywna. Zastosowanie karbenowego kompleksu Cu(I), opisanego jako niezwykle efektywnego katalizatora CuAAC,⁴⁵ nie doprowadziło do powstania nawet śladów produktu (wiersze, 12 i 13).

Tabela 3.7. Optymalizacja warunków CuAAC pochodnej kobinamidu **169a** z pochodnymi PpIX **172a** i **Zn172a**.^a



L.p.	M	Katalizator	Rozpuszczalnik	t [h]	Wydajność [%] ^b
1	2H	CuSO ₄ /NaAsk ^c	<i>t</i> -BuOH/H ₂ O	12	ślady ^{f,h}
2	2H	CuSO ₄ /NaAsk ^c	DMF	12	ślady ^{f,h}
3	2H	CuSO ₄ /NaAsk/TBTA ^{c,e}	DMF	12	ślady ^{f,h}
4	2H	CuI/TBTA ^{c,d}	<i>t</i> -BuOH/H ₂ O	12	ślady ^{f,h}
5	2H	CuI/TBTA ^{c,d}	DMF	12	ślady ^{f,h}
6	2H	CuI/TBTA ^{c,e}	DMF	12	ślady ^{f,h}
7	Zn	CuSO ₄ /NaAsk ^c	DMF	4 dni	10 ^{f,g}
8	Zn	CuI/TBTA ^{c,d}	<i>t</i> -BuOH/H ₂ O	12	ślady ^{f,g}
9	Zn	CuI/TBTA ^{c,d}	DMF	12	ślady ^{f,g}
10	Zn	CuI/TBTA ^{c,e}	DMF	12	ślady ^{f,g}
11	Zn	CuI/TBTA ^{c,d}	THF	12	ślady ^{f,g}
12	Zn	(SIMes)CuBr	DCM	12	- ⁱ
13	Zn	(SIMes)CuBr	MeCN	12	- ⁱ
14	Zn	CuOAc	DCM	45 min.	75%

[a] Warunki prowadzenia reakcji: katalizator (30 mol%) w roztwarzano odpowiednim rozpuszczalniku (3 ml) i dodawano substraty (0.02 mmol). Postęp reakcji monitorowano techniką TLC; [b] wydajność wydzielonego produktu; [c] katalizator formowano przez 20 min. przed dodaniem substratów; [d] użyto 30 mol% TBTA; [e] użyto 90 mol% TBTA; [f] konwersja niepełna; [g] tworzenie się polarnych produktów ubocznych; [h] mieszanina hybryd **177aa** i **Cu177aa**; [i] nie zaobserwowałem konwersji (analiza TLC).

Ostatecznie, zastosowanie katalitycznych ilości CuOAc i prowadzenie reakcji w atmosferze argonu w bezwodnym DCM okazało dobrym wyborem.³⁵ Reakcja przebiegała bardzo selektywnie, a niemal pełna konwersja następowała w ciągu 45 minut (wiersz 14). Związek hybrydowy **Zn177aa** wydzieliłem z wydajnością 75%.

Zastosowanie innych rozpuszczalników wiązało się z wydłużeniem czasu reakcji oraz znacznie obniżało jej selektywność (Tabela 3.8, wiersze 1-3).

Tabela 3.8. Modyfikacja warunków syntezy hybrydy **Zn177aa**.^a

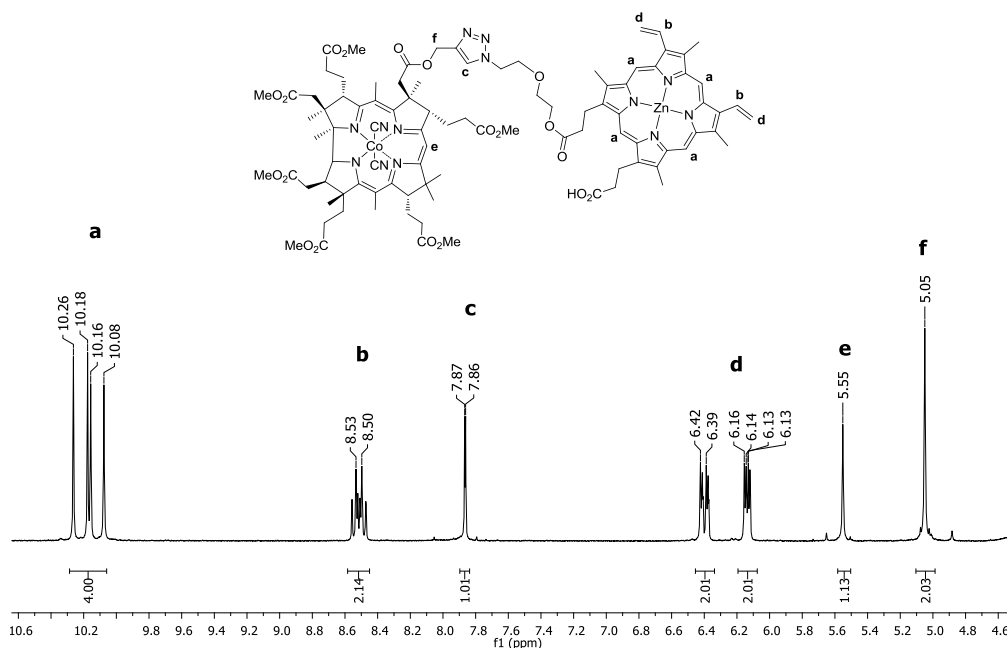
L.p.	Rozpuszczalnik [obj.]	t [h]	Wydajność [%] ^b
1	Toluen (3 ml)	12	_c,d
2	CHCl ₃ (3 ml)	12	13 ^{c,d}
3	THF (3 ml)	12	ślady ^{c,d}
4	DCM (3 ml) ^e	12	70
5	DCM (1 ml)	20 min	40 ^d
6	DCM (9 ml)	1.5	68
7	DCM (3 ml) ^f	40 min	48 ^d
8	DCM (3 ml) ^g	1	_c,h

[a] Warunki prowadzenia reakcji: reakcje prowadzono w bezwodnych rozpuszczalnikach w atmosferze argonu, do roztworu substratów **169a** (0.02 mmol) i **Zn172a** (0.02 mmol) w odpowiednim rozpuszczalniku dodawano katalizator (30 mol%). Postęp reakcji monitorowano techniką TLC; [b] wydajność wydzielonego produktu; [c] konwersja niepełna; [d] tworzenie się polarnych produktów ubocznych; [e] reakcja prowadzona w 0 °C; [f] użyto DCM klasy czysta, reakcja nie była prowadzona w atmosferze argonu; [g] reakcja pomiędzy **169a** a **172a**; [h] mieszanina hybryd **177aa** i **Cu177aa**.

Modyfikacje warunków prowadzenia reakcji w DCM również nie spowodowały wzrostu wydajności pożądanego produktu. Obniżenie temperatury do 0 °C dramatycznie spowolniło reakcję, ale nie wpłynęło znacznie na jej wydajność i selektywność (wiersz 4). Trzykrotne obniżenie ilości rozpuszczalnika (wiersz 5) doprowadziło do powstawania polarnych produktów ubocznych i spadku selektywności. Z kolei rozcieńczenie mieszaniny reakcyjnej spowodowało wydłużenie czasu potrzebnego do osiągnięcia pełnej konwersji substratów bez znaczącego wpływu na wydajność (wiersz 6). Rezygnacja z warunków ściśle bezwodnych i beztlenowych spowodowała wyraźny spadek selektywności i wydajności (wiersz 7). Niestety, użycie profiryny **172a** w formie wolnej zasady doprowadziło do otrzymania hybrydy **177aa** zanieczyszczonej

produktem insercji miedzi do luki makrocyklicznej jednostki porfirynej (wiersz 8). Co prawda, wyżej opisane modyfikacje warunków nie poprawiły wydajności (Tabela 3.7, wiersz 14), jednak była ona na tyle satysfakcjonująca, że układ CuOAc/bezwodny DCM uznałem za optymalny.

Analiza widm NMR (w tym widm korelacyjnych) i spektrometrii mas pozwoliła na jednoznaczne potwierdzenie struktury otrzymanej hybrydy **Zn177aa**. W celu uzyskania widma NMR dobrej rozdzielczości konieczny był odpowiedni dobór rozpuszczalnika. Widma ^1H NMR rejestrowane w CDCl_3 były nieczytelne, ze względu na znaczne poszerzenie sygnałów i nie nadawały się do interpretacji, natomiast prowadzenie pomiarów w DMSO-d_6 pozwoliło na otrzymanie widm dobrej jakości. Fragment widma ^1H NMR hybrydy **Zn177aa** przedstawiłem na Rysunku 3.3. Sygnały przy $\delta = 7.87$ i 7.86 ppm pochodzą od protonu w pierścieniu triazolu. Sygnał ten występuje w postaci dwóch singletów, ponieważ otrzymana hybryda **Zn177aa** jest mieszaniną regioizomerów, których nie byłem w stanie rozdzielić technikami chromatograficznymi. Pozostałe sygnały pochodzą od charakterystycznych grup protonów jednostki PpIX: 4 protonów *mezo*-CH i grup winylowych (a, b i d) oraz pochodnej kobinamidu: *mezo*-CH i protonów pochodzących od grupy CH_2 estru w pozycji *c*- (e i f).



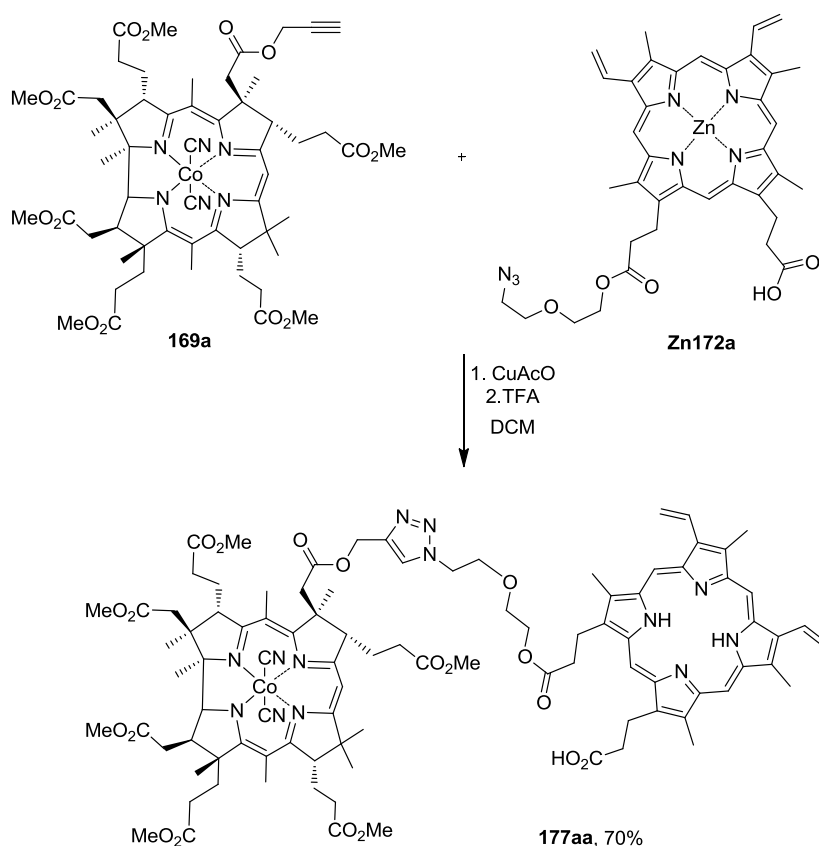
Rysunek 3.3. Widmo ^1H NMR związku **Zn177aa** w zakresie 10.5-4.5 ppm. Widmo zarejestrowane zostało w DMSO-d_6 w temperaturze pokojowej na aparacie Varian 600 MHz.

Widmo MS hybrydy **Zn177aa** jest bardzo złożone, jednak wnikliwa interpretacja pozwoliła mi przypisać osiem najintensywniejszych sygnałów. Cztery sygnały przy $m/z = 1823.8$, 1845.8 , 1872.8 i 1894.8 odpowiadają jednododatnim jonom pseudomolekularnym odpowiednio: $[\text{M-CN}]^+$, $[\text{M-HCN}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ i $[\text{M-H}+2\text{Na}]^+$, z kolei sygnały przy $m/z = 923.6$, $934.$, 948.1

i 959.1 pochodzą od dwudodatnich jonów $[M-CN+Na]^{2+}$, $[M-H-CN+2Na]^{2+}$, $[M+2Na]^{2+}$ i $[M-H+3Na]^{2+}$. Obecność jonów typu $[M-CN]$ wynika z faktu, że jeden z ligandów cyjankowych w fragmencie pochodzącym od kobinamidu jest labilny i łatwo oddysocjowuje. Jest to cechą wspólną pochodnych dicyjanokobinamidu. Obecność jonów typu $[M-H+xNa]$ spowodowana jest obecnością wolnej grupy kwasowej w strukturze otrzymanego związku i tworzeniem się w warunkach pomiaru soli sodowych.

Mając opracowaną efektywną metodę łączenia pochodnych kobinamidu z pochodnymi cynkowych kompleksów PpIX przystąpiłem do otrzymania docelowego związku – hybrydy, w której jednostka porfirynowa występuje w postaci wolnej zasady. Usunięcie cynku z luki makrocyclicznej porfiryny przeprowadziłem poprzez potraktowanie hybrydy **Zn177aa** mieszaniną DCM/TFA w proporcji 1:1. Prowadzenie reakcji przez 4 godziny w ściśle bezwodnych warunkach, pozwoliło ilościowo usunąć jon cynku i otrzymać pożądaną hybrydę **177aa** z wydajnością 88%, produkty rozkładu tworzyły się w niewielkich ilościach.

Zarówno etapy CuAAC jak i usuwania cynku prowadziłem w tym samym rozpuszczalniku (bezwodnym DCM), postanowiłem więc sprawdzić, czy możliwe jest przeprowadzenie obu tych reakcji metodą „one-pot” (Schemat 3.18).



Schemat 3.18. Dwuetapowa synteza hybrydy **177aa** prowadzona metodą „one-pot”.

Po stwierdzeniu pełnej konwersji substratów w reakcji koryny **169a** z porfiryną **Zn172a** (analiza TLC), do mieszaniny reakcyjnej dodałem TFA i po 4 godzinach przerwałem reakcję. Hybrydę **177aa** udało się wydzielić z wydajnością 70%. Takie podejście znacznie upraszczało całą procedurę.

Zastosowanie technik NMR oraz spektrometrii mas potwierdziło strukturę otrzymanego związku hybrydowego. Widmo ^1H NMR hybrydy **177aa** różniło się od widma **Zn177aa** obecnością sygnału przy -4.20 ppm pochodzącego od protonów NH jednostki pirolowej. Sygnał pochodzący od protonu w pierścieniu 1,2,3-triazolu ponownie występował w postaci dwóch singletów, tym razem lepiej rozseparowanymi (7.97 i 7.80 ppm). Zaobserwować mogłem również wyraźny, choć znacznie poszerzony sygnał przy $\delta = 12.27$ ppm odpowiadający protonowi –COOH. W widmie MS hybrydy **177aa** występował analogiczny zestaw sygnałów jak w przypadku hybrydy **Zn177aa**. Najintensywniejszy sygnał przy $m/z = 1761.9$ odpowiadał jonowi pseudomolekularnemu $[\text{M-CN}]^+$.

3.4.5. Synteza serii połączeń hybrydowych

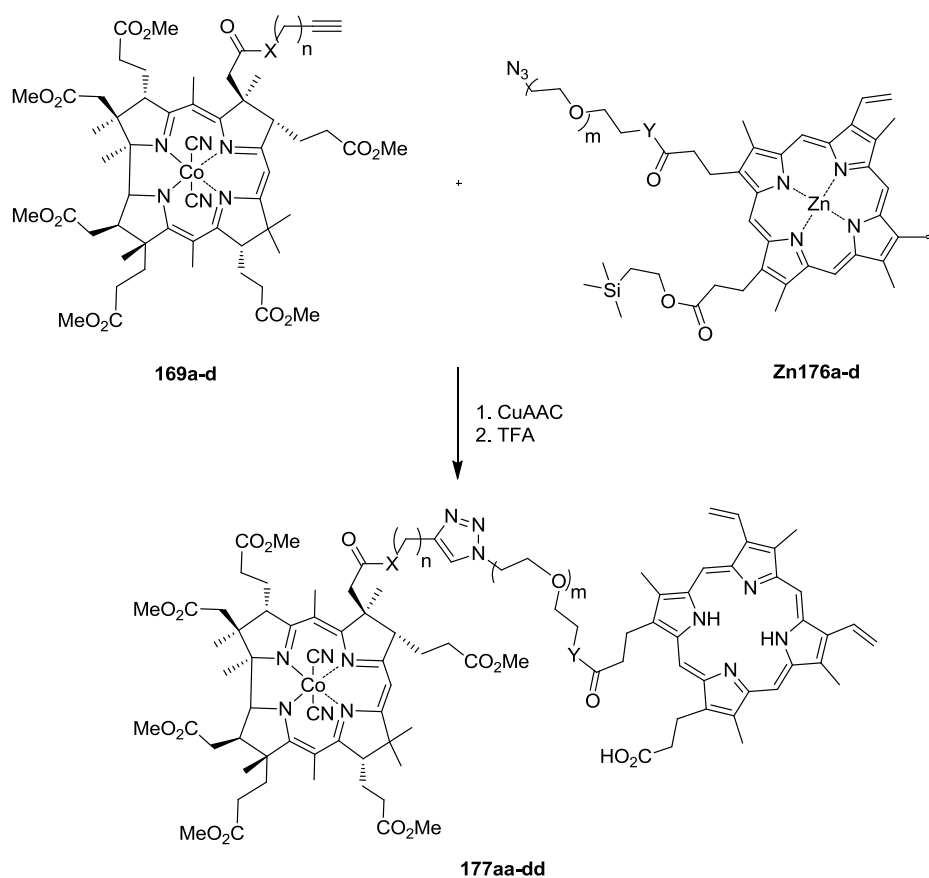
Wykorzystując opracowaną, dwuetapową metodę syntezy związków hybrydowych przystąpiłem do prac nad otrzymaniem serii związków różniących się długością i strukturą łącznika.

Początkowo skupiłem się na przeprowadzeniu reakcji pochodnej kobinamidu **169a**, z monoestrowymi pochodnymi PpIX **Zn172a-c**. Pomimo, że reakcje zachodziły bardzo selektywnie, to wydzielenie otrzymanych związków technikami chromatograficznymi było kłopotliwe. Stosowane substraty **169a** i **Zn172a-c**, hybrydowe produkty cykloaddycji oraz niewielkie ilości produktów ubocznych powstających w trakcie reakcji mają zbliżoną polarność. W związku z tym oczyszczenie pożądaných związków hybrydowych jest żmudne i czasochłonne, wymagało użycia dużych ilości żelu krzemionkowego i rozpuszczalników, a także powtórzenia chromatografii w celu uzyskania związków o czystości > 95%. Ponadto nietrwałość cynkowych pochodnych monoestrów **Zn172a-c** i problemy z ich wydzieleniem technikami ekstrakcyjnymi powodowały duże straty na etapie ich otrzymywania.

Mając w perspektywie syntezę kilkunastu połączeń hybrydowych, postanowiłem zmodyfikować strategię ich otrzymywania (Schemat 3.19). Pierwszą zmianą, było użycie jako substratów diestrowych pochodnych PpIX typu **176**, w których grupa kwasowa zastąpiona została estrem 2-trimetylosililoetylowym. Ponadto okazało się, że cynkowe kompleksy typu **Zn176** były wyraźnie trwalsze i łatwiejsze do wydzielenia. Druga modyfikacja obejmowała rezygnację z

przeprowadzania procesów CuAAC i usuwania cynku w jednym naczyniu, pomimo tego, że początkowo takie podejście wydawało się bardzo atrakcyjne. Korzyścią płynącą z tej zmiany była możliwość użycia porfiryn **Zn176a-d** w nieznacznym nadmiarze (1.1 Eq), co zapewniało pełną konwersję pochodnej kwasu kobyrinowego. Pozostała, nieprzereagowana pochodną PpIX mogłem łatwo i bardzo szybko oddzielić od otrzymanej hybrydy ze względu na znaczne różnice w ich polarności. Oczyszczony kompleks cynkowy związku hybrydowego **Zn177** traktowałem następnie mieszaniną TFA/DCM. W tych warunkach jednocześnie zachodziło odbezpieczenie estru 2-trimetylosililo-etylowego oraz usunięcie cynku z luki makrocyklicznej części porfirynowej.

W tak zmodyfikowanych warunkach otrzymałem serię związków stosując wszystkie możliwe kombinacje alkinowych pochodnych kobinamidu **169a-d** z cynkowymi kompleksami pochodnych PpIX **Zn176a-d** (Schemat 3.19, Tabela 3.9).



Schemat 3.19. Synteza serii związków hybrydowych typu **177**.

Wydajności wydzielonych związków hybrydowych typu **177** wahały się w granicach 27-86%. Niska wydajność hybrydy **177ad** (wiersz 1, kolumna 4) związana była z jej powolnym rozkładem w czasie wydzielania techniką chromatografii kolumnowej, jednak szybkie przeprowadzenie chromatografii pozwoliło na otrzymanie próbki, której ilość, czystość i trwałość były wystarczające do przeprowadzenia pełnej charakterystyki i badań biologicznych.

Tabela 3.9. Połączenia pochodnych kobinamidu i PpIX otrzymane na drodze CuAAC.

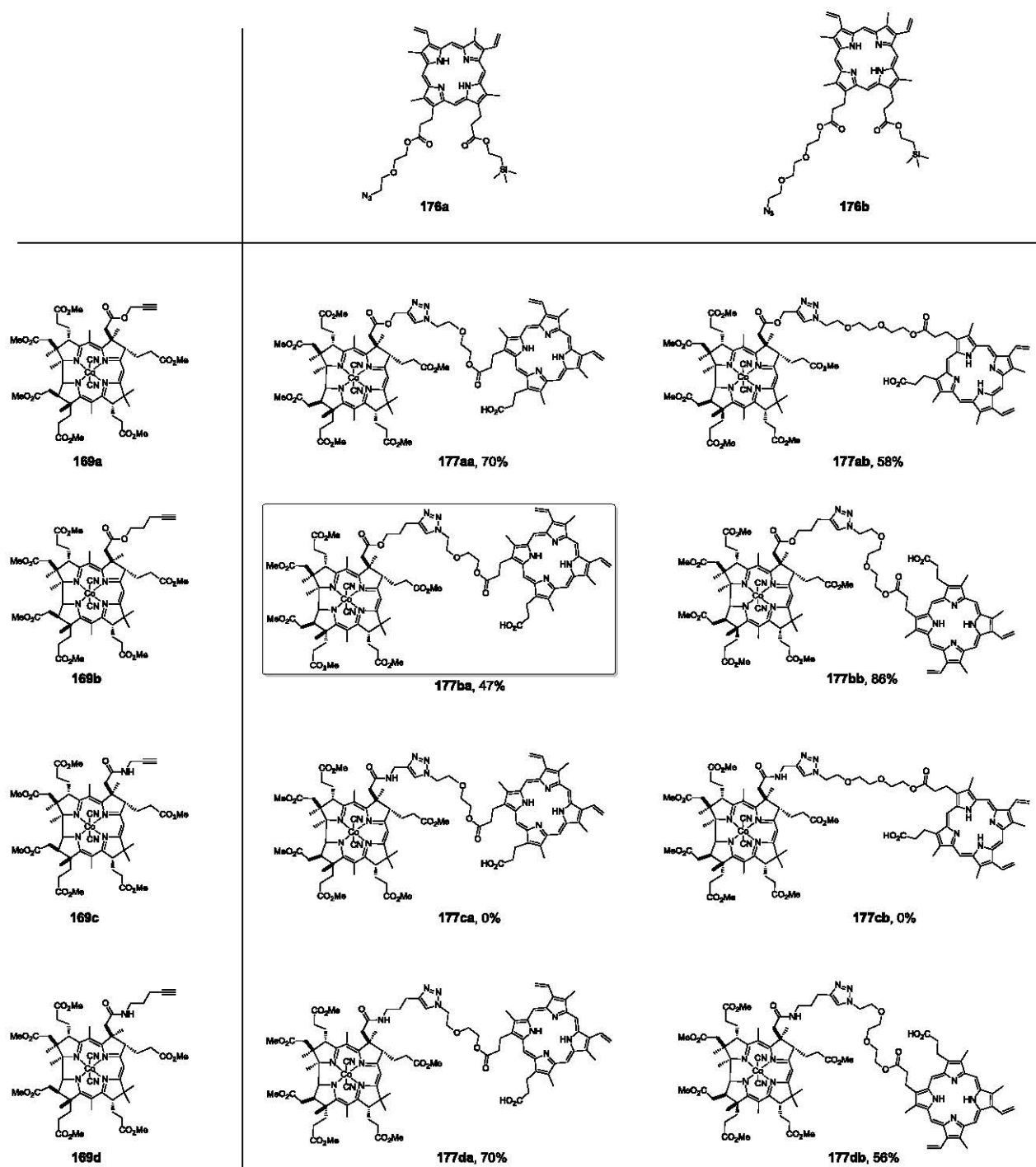
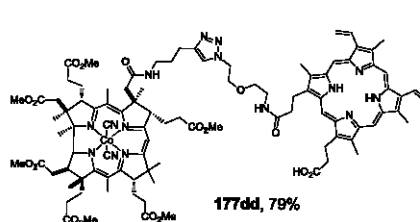
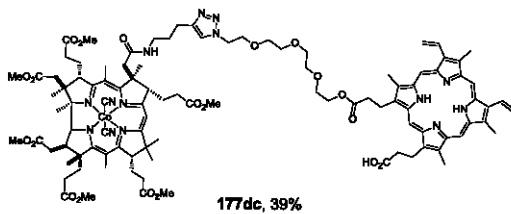
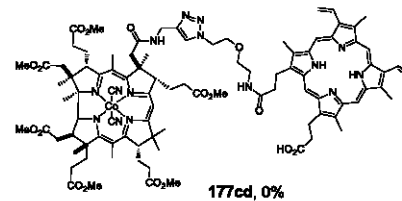
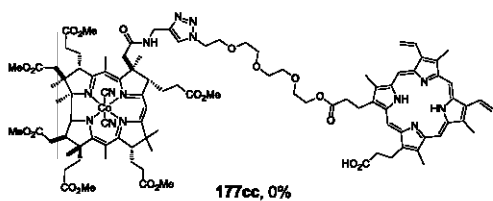
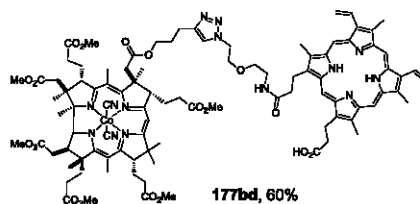
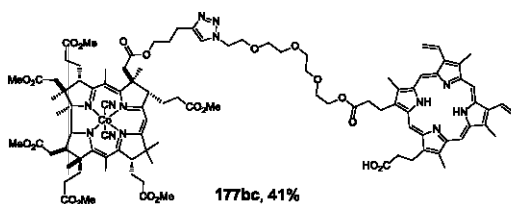
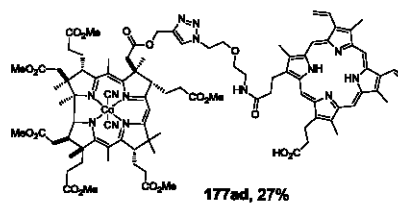
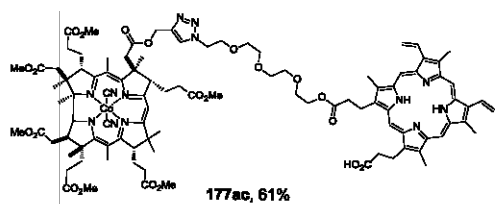
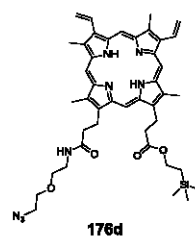
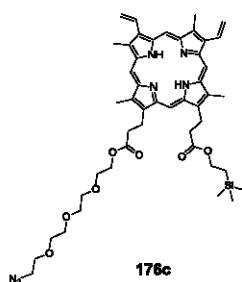
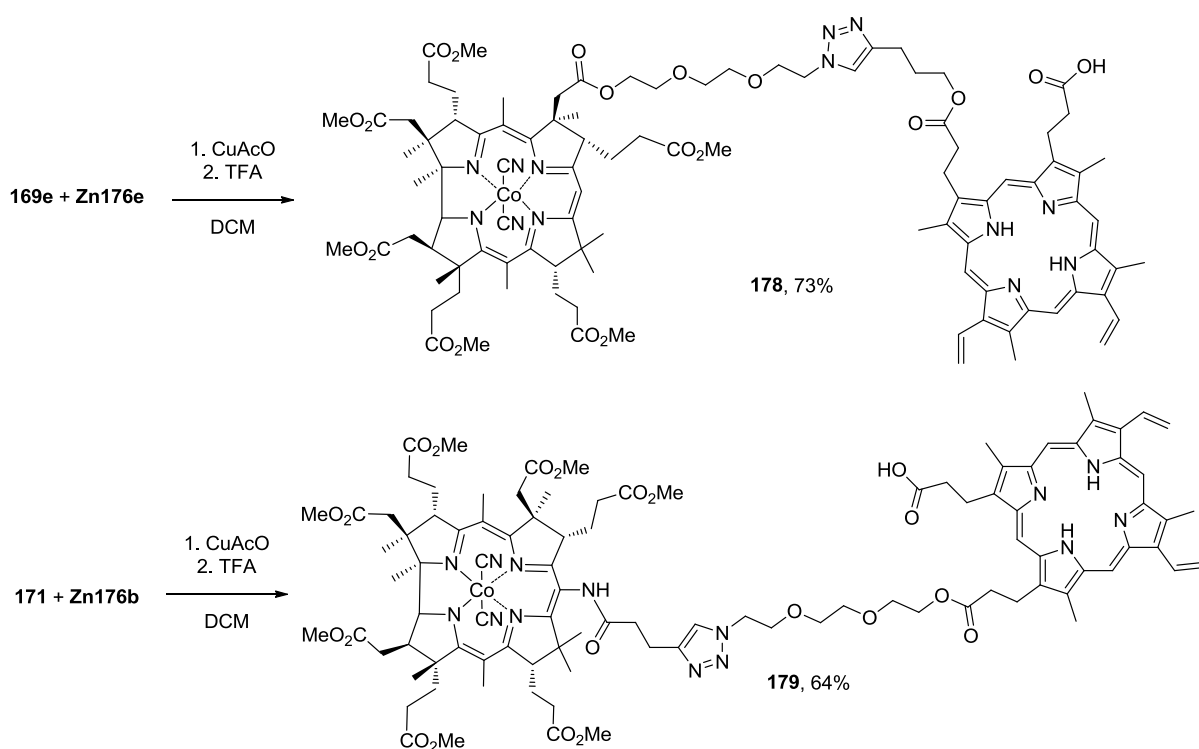


Tabela 3.9. Ciąg dalszy



Podobny problem zaistniał podczas syntezy hybryd z użyciem związku **169c**, amidu propargilowego kwasu **168** (wiersz 3). Pomimo obiecującego przebiegu ich syntezy (analiza TLC), wszystkie otrzymane hybrydy **177ca-177cd** były bardzo niestabilne zarówno w warunkach chromatografii kolumnowej, jak i po wydzieleniu, co uniemożliwiło ich charakterystykę oraz przeprowadzenie badań biologicznych. Pozostałe 11 związków hybrydowych odznaczało się wysoką stabilnością, zarówno w postaci czystej jak i w roztworach. Nie wymagały one przechowywania w niskich temperaturach i w atmosferze argonu, i nawet po kilku miesiącach przechowywania nie zaobserwowałem ich rozkładu (analiza TLC).

Uzupełnieniem otrzymanej biblioteki połączeń hybrydowych były związki **178** i **179** (Schemat 3.20), otrzymane odpowiednio z koryny **169e** i porfiryny **Zn176e** oraz koryny **171** i porfiryny **Zn176b** w celu zbadania wpływu struktury łącznika oraz pozycji jego wiązania z jednostką pochodnej kobinamidu.



Schemat 3.20. Synteza związków hybrydowych **178** i **179**.

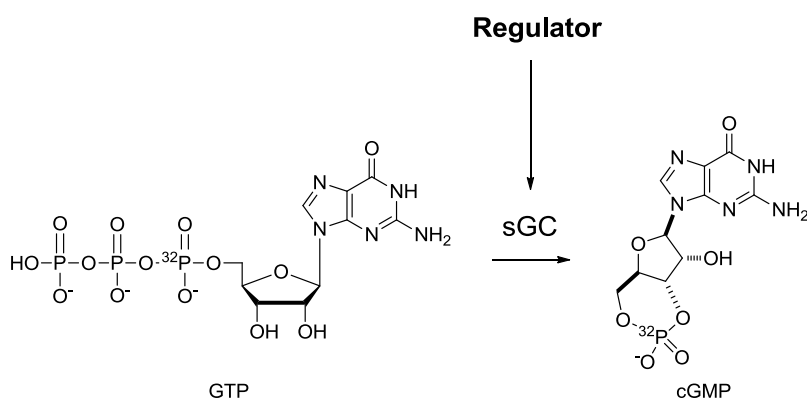
Hybryda **178** zawiera łącznik o takiej samej długości i strukturze jak **177bb**, z tym, że jest on połączony „odwrotnie” z odpowiednimi blokami budulcowymi. Z kolei związek **179** zawiera łącznik o długości zbliżonej do tej, która w toku badań biologicznych okazała się optymalna, jednak miejscem jego przyłączenia do jednostki kobinamidu nie jest pozycja *c*-, jak w przypadku pozostałych związków, lecz pozycja *mezo*.

3.2.6. Badania nad aktywacją sGC przez związki hybrydowe

Zdolność otrzymanych związków hybrydowych do aktywacji sGC przebadana została przez Martina w University of Texas Health Science Center w Houston. Dzięki jego uprzejmości, część badań wykonałem osobiście w trakcie trzytygodniowego stażu odbytego w okresie 28.04-21.05.2011. Poniższy opis przeprowadzonych testów biologicznych i ich interpretacji jest skrótowy i ma za zadanie przedstawienie wyłącznie najważniejszych wyników i wykazanie zależności właściwości biologicznych od struktury.

Przeprowadzone testy obejmowały porównanie aktywności związków hybrydowych i bloków budulcowych, z których zostały otrzymane, udowodnienie założonej synergii farmakoforów znajdujących się w hybrydzie oraz ustalenie zależności pomiędzy długością i strukturą łącznika a zdolnością do aktywacji sGC.

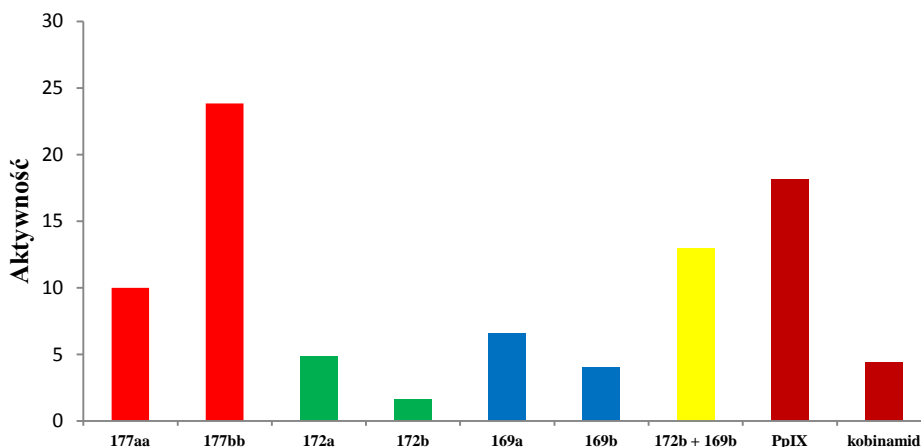
Badania aktywatorów sGC polegają na porównaniu ilości cGMP powstałego w reakcji katalizowanej oczyszczonym enzymem bez dodatku regulatora z ilością powstałą w reakcji wobec enzymu inkubowanego z hybrydą. W praktyce, przeprowadza się to stosując GTP znakowany ^{32}P w pozycji α (Schemat 3.21) jako substrat.¹²¹ Po odpowiednim czasie reakcję enzymatyczną przerywa się dodając sól Zn(II) a wytworzony cGMP oddziela chromatograficznie od nieprzereagowanego GTP. Na podstawie pomiaru emisji promieniowania Czerniakowa otrzymanej próbki można obliczyć ilość powstałego cGMP. Normalizacja danych pozwala na określenie aktywności sGC w obecności badanego związku względem czystego sGC.



Schemat 3.21. Badanie aktywności sGC z użyciem GTP znakowanego ^{32}P .

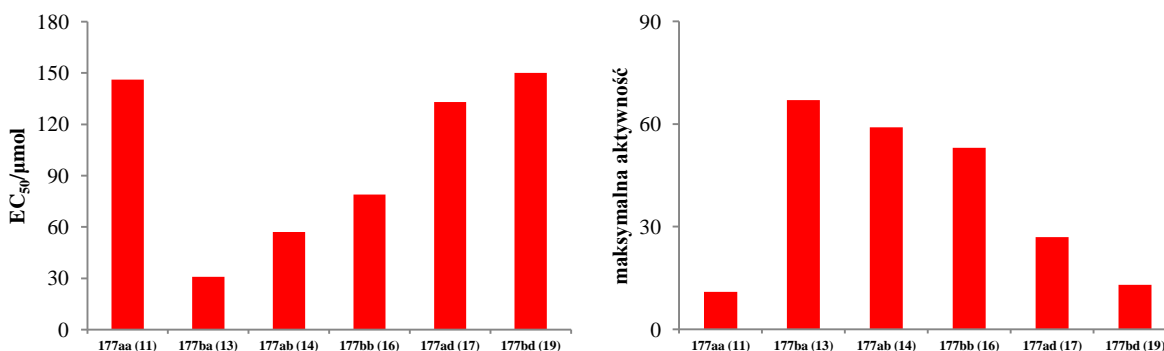
Początkowe badania przeprowadzone dla związków hybrydowych **177aa** i **177bb** wykazały, że są one znacznie silniejszymi aktywatorami sGC niż bloki budulcowe, z których zostały otrzymane (Rysunek 3.4). Aktywność hybrydy **177bb** przy stężeniu 200 μM była nieco większa niż PpIX i znacznie wyższa niż dla kobinamidu. Dodatkowy eksperyment przeprowadzony został dla równomolowej mieszaniny związków **169b** i **172b**, z których została

otrzymana hybryda **177bb**. Porównanie wyniku z wynikiem otrzymanym dla związku hybrydowego wykazało, że kowalencyjne połączenie obu farmakoforów wyraźnie wzmacnia efekt aktywacji sGC. Zdolność testowanych związków hybrydowych do stymulowania sGC znacznie różniła się w zależności od długości łącznika pomiędzy farmakoforami (hybryda **177aa** vs hybryda **177bb**) co sugeruje, że jest to ważny czynnik wpływający na ich aktywność. Zatem wstępne wyniki potwierdzały przyjęte założenia.



Rysunek 3.4. Porównanie zdolności związków hybrydowych **177aa** i **177bb**, bloków budulcowych i struktur wiodących do aktywacji sGC. Pomiary prowadzono przy 200 μ l aktywatora.

Następnie przebadalem całą serię hybryd w celu ustalenia optymalnej długości łącznika, zapewniającej najwyższą aktywację. Porównanie maksymalnej aktywności sGC oraz wartości EC_{50} hybryd **177aa-177bd**, przedstawia Rysunek 3.5 (liczby w nawiasach oznaczają ilość atomów w łączniku)..



Rysunek 3.5. Porównanie EC_{50} i maksymalnej aktywności hybryd **177aa-bd**. Liczby w nawiasach oznaczają ilość atomów w łączniku.

Najważniejszym wnioskiem płynącym z tej części badań, jest istnienie optymalnej długości łącznika pomiędzy pochodnymi PpIX i kobinamidu. Hybryda **177ba**, w której farmakofory oddzielone były od siebie 13 atomami (pierścień 1,2,3-triazolu przyjęty został jako 2 atomy), była najsilniejszym aktywatorem sGC z całej serii. Dłuższe i krótsze łączniki pomiędzy farmakoforami powodowały spadek maksymalnej aktywności oraz wzrost wartości EC_{50} .

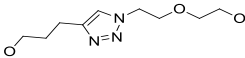
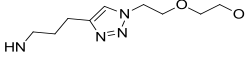
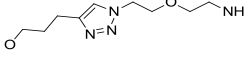
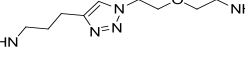
Kolejne eksperymenty zmierzały do udowodnienia jednoczesnego działania związków hybrydowych na domeny regulatorową i katalityczną sGC. W tym celu sGC została poddana odpowiednim modyfikacjom.

I tak, eksperymenty mające na celu wykazanie, że związki hybrydowe oddziałują z domeną regulatorową przeprowadzone zostały na sGC, z której cząsteczka hemu została usunięta poprzez inkubowanie enzymu ze środkiem powierzchniowo czynnym. Taki zabieg ułatwia i przyspiesza wiązanie aktywatora w domenie regulatorowej, przez co wzmacnia jego działanie (obniża EC_{50}).¹²² Enzym pozbawiony hemu był około sześciokrotnie silniej aktywowany przez hybrydę **177ba** ($EC_{50} = 5.4 \mu\text{M}$), niż pierwotna forma, zawierająca hem ($EC_{50} = 31.0 \mu\text{M}$), co dowodziło, że hybryda oddziałuje z sGC poprzez domenę regulatorową.

Podobne badania przeprowadzone zostały na zmutowanej formie sGC, w której domena regulatorowa została usunięta na etapie biosyntezy enzymu. Tak przygotowanej sGC pochodne PpIX nie aktywują w ogóle, natomiast pochodne kobinamidu „nie czują” braku domeny zawierającej hem i ich zdolność do aktywowania enzymu pozostaje bez zmian. W przypadku modelowego związku hybrydowego **177ba** usunięcie domeny regulatorowej spowodowało spadek aktywności do poziomu odpowiadającego pochodnej kobinamidu **169b**, z której hybryda **177ba** została otrzymana. Oznacza to, że związek hybrydowy z całą pewnością oddziałuje również z domeną katalityczną poprzez fragment będący pochodną kobinamidu. Taką samą zależność przejawiały również inne związki hybrydowe poddane takim testom. Uzyskane dane dowiodły, że wysoka aktywność sGC w obecności związków hybrydowych wynika z jednoczesnego działania na domenę regulatorową i katalityczną.

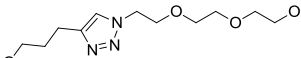
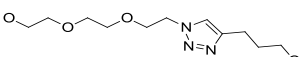
Kolejną, dość zaskakującą, obserwacją była dramatycznie niższa aktywność hybryd otrzymanych z amidowych pochodnych kobinamidu lub PpIX (Tabela 3.10). Związki **177da**, **177bd** i **177dd** (wiersze 2, 3 i 4) o identycznej długości łącznika co związek **177ba** (wiersz 1), lecz posiadające grupę lub grupy amidowe w miejscu wiązania się łącznika z farmakoforami, praktycznie nie aktywowały sGC. Przyczyna tego zjawiska jest wciąż niejasna.

Tabela 3.10. Wpływ obecności grupy amidowej w miejscu wiązania się łącznika z farmakoforami na aktywność biologiczną związków hybrydowych.

L.p.	Numer związku	Struktura łącznika	EC ₅₀ [μM]	Maksymalna aktywacja
1	177ba		31	67±2.1
2	177da		136	5.3±0.9
3	177bd		-	1.3±0.1
4	177d		-	0.9±0.2

Ponadto związek **178**, w którym łącznik jest identyczny jak w **177bb**, lecz „odwrócony” względem farmakoforów, chociaż posiadał zbliżoną wartość EC₅₀, wykazywał czterokrotnie niższą maksymalną aktywność (Tabela 3.11), co świadczy o tym, że nie tylko długość, ale i struktura łącznika (np. pozycja pierścienia 1,2,3-triazolu) odgrywa istotną rolę w oddziaływaniu hybryd z sGC.

Tabela 3.11. Porównania aktywności biologicznej związków **177bb** i **178**.

L.p.	Numer związku	Struktura łącznika	EC ₅₀ [μM]	Maksymalna aktywacja
1	177bb		79	53.7 ± 4.0
2	178		89	13.2±1.4

3.2.7. Podsumowanie

Zaprojektowane i otrzymane przeze mnie związki hybrydowe typu **177** okazały się silnymi regulatorami sGC. Istotnymi czynnikami wpływającymi na aktywność biologiczną były struktura i długość łącznika użytego do rozdzielenia farmakoforów w przestrzeni. Kluczowy okazał się również brak grup amidowych w miejscu wiązania się łącznika z farmakoforem.

Otrzymane związki są pierwszymi hybrydowymi aktywatorami sGC i potwierdzają, że możliwe jest aktywowanie tego enzymu poprzez symultaniczne oddziaływanie jednej cząsteczki z domeną regulatorową i domeną katalityczną.

„Warunkiem niezbędnym do spowodowania zmiany jest praktyczna zdolność do uruchomienia we właściwy sposób niezbędnych sił.”

Aleister Crowley, „Magia w teorii i praktyce”

3.3. Zastosowanie AAC do modyfikacji witaminy B₁₂

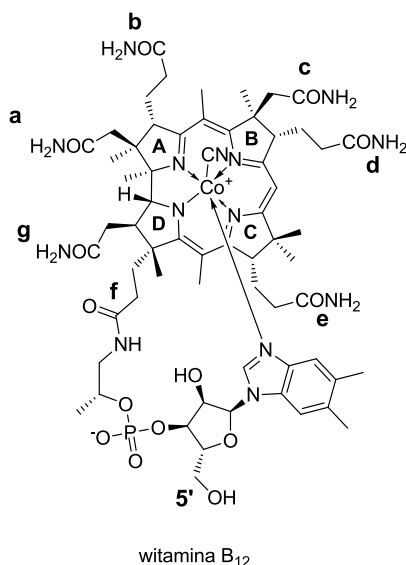
3.3.1. Wstęp

Od czasu odkrycia witaminy B₁₂ budzi niesłabnące zainteresowanie chemików i biologów.^{123, 124} Ma ona najbardziej skomplikowaną strukturę spośród wszystkich witamin (Rysunek 3.6) i jest jednym z nielicznych przykładów naturalnego związku metaloorganicznego. Jest to kompleks kobaltu(III) i koryny, wysycony koordynacyjnie przez ligand cyjankowy od strony β (górną) koryny i atom azotu benzimidazolu będącego częścią pętli nukleotydowej znajdującej się po stronie α (dolnej). Pierścień koryny jest dodatkowo niesymetrycznie podstawiony czterema grupami propionamidowymi, trzema grupami acetamidowymi i ośmioma grupami metylowymi.

Ustalenie struktury witaminy B₁₂ przez Dorothy Hodgkin oraz zaplanowanie i przeprowadzenie syntezy totalnej przez Roberta Woodwarda i Eshenmosera były osiągnięciami na miarę Nagrody Nobla.

Witamina B₁₂ jest związkiem niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania organizmów ssaków. Organizm ludzki nie potrafi jej wytwarzać. Dlatego też musi być ona dostarczana z pożywieniem. Wiele pracy zostało poświęcone dokładnemu poznaniu mechanizmu wchłaniania B₁₂ z układu pokarmowego. Obecnie przyjęty model obiegu witaminy B₁₂ zakłada jej rozpoznanie i transport przez trzy enzymy obecne na kolejnych odcinkach układu pokarmowego: Transkobalaminę I (haptokorynę, TCI) obecną w ustach, Czynniki Wewnętrzny (Czynnik Castle’a, IF) w żołądku oraz Transkobalaminę II (TCII), która transportuje B₁₂ z jelit do krwi i dalej do odpowiednich komórek.^{125, 126}

Ze względu na swój specyficzny i dobrze rozpoznany szlak metaboliczny, B₁₂ jest w ostatnich latach badana jako transporter leków podawanych doustnie. Podstawą tej koncepcji jest założenie, że odpowiednie połączenie cząsteczki biologicznie czynnej z witaminą B₁₂ zachowa się jak „koń trojański” i pozwoli na wykorzystanie kaskady enzymów rozpoznających i transportujących witaminę B₁₂ na dostarczenie jej do odpowiednich komórek.^{12, 127}



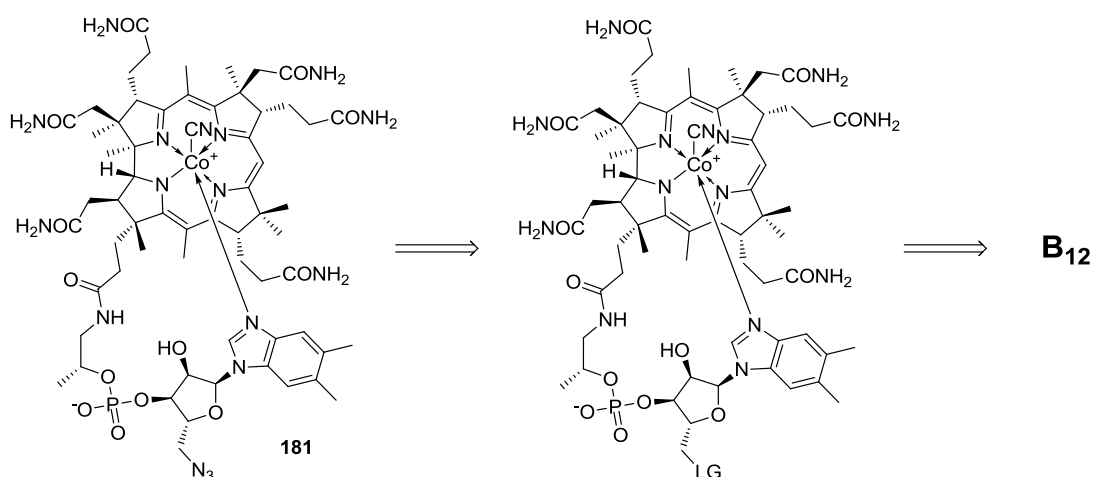
Rysunek 3.6. Oznaczenia grup funkcyjnych w cząsteczce witaminy B₁₂

Wykorzystanie tej strategii nie byłoby możliwe bez dokładnej wiedzy na temat, jak modyfikacje poszczególnych grup funkcyjnych w strukturze witaminy B₁₂ wpływają na jej rozpoznanie przez odpowiednie białka (oznaczenia poszczególnych grup przedstawia rysunek 3.6).¹²⁵ Szeroko zakrojone badania zostały przeprowadzone przez Wilbura,¹²⁸ który wykazał, że modyfikacje propionamidowych grup w pozycjach *b* i *e* tylko nieznacznie wpływają na wiązanie się pochodnych z TCII, w porównaniu z niemodyfikowaną B₁₂. Modyfikacje pierwszorzędowej grupy hydroksylowej 5'OH oraz zmiany liganda od strony β praktycznie nie zmieniają stałych wiązania z TCI, IF i TCII.

Funkcjonalizacja grup propionamidowych *b* i *e* możliwa jest jedynie po przeprowadzeniu łagodnej hydrolizy, w wyniku której otrzymuje się złożoną mieszaninę monokwasów, a pożądane związki wydziela się skomplikowanymi technikami chromatograficznymi.¹²⁹ Modyfikacje ligandów na kationie kobaltu realizuje się zazwyczaj w sekwencji przemian: redukcja Co(III) \rightarrow Co(I) i następcza reakcja z elektrofilem.¹¹³ Niestety, przeprowadzenie takich modyfikacji jest z reguły trudne, wydajności są niskie a otrzymane związki nietrwałe. Stosunkowo najprostsze i najczęściej stosowane są transformacje grupy 5'OH.¹³⁰ W metodzie tej, w pierwszym etapie przeprowadza się reakcję z elektrofilowym donorem grupy karbonylowej (np. 1,1'-karbonylo-di(1,2,4-triazolem)) i następnie reakcję ze związkami zawierającymi grupę aminową lub hydroksylową w wyniku której uzyskuje się uretan lub węglan. Takie połączenia można otrzymać z dobrymi wydajnościami i zazwyczaj są one stabilne. Najnowsza metoda modyfikacji grupy 5'OH polega na jej utlenieniu do odpowiedniego kwasu karboksylowego, który następnie można poddać estryfikacji lub amidowaniu.¹³¹

W literaturze brak jest doniesień o zastosowaniu 1,3 dipolarnej cykloaddycji w chemii witaminy B₁₂. Uznałem, że CuAAC, której skuteczność została potwierdzona nawet dla bardzo

skomplikowanych układów, byłaby atrakcyjnym narzędziem do łączenia B₁₂ z innymi cząsteczkami, tutaj z protoporfiryną IX. Miałem nadzieję, że stworzenie hybrydy tych dwóch związków zwiększy biodostępność PpIX i zaowocuje stworzeniem aktywatora sGC działającego *in vivo*. Projektując odpowiednie pochodne B₁₂, założyłem, że możliwe jest wprowadzenie grupy azydkowej w pozycję 5' witaminy B₁₂ poprzez przekształcenie pierwszorzędowej grupy hydroksylowej w dobrą grupę odchodzącą (LG) i następczą reakcją substytucji anionem azydkowym (Schemat 3.22). Spodziewałem się, że pierwszorzędowy azydek **181** będzie dobrym substratem CuAAC.



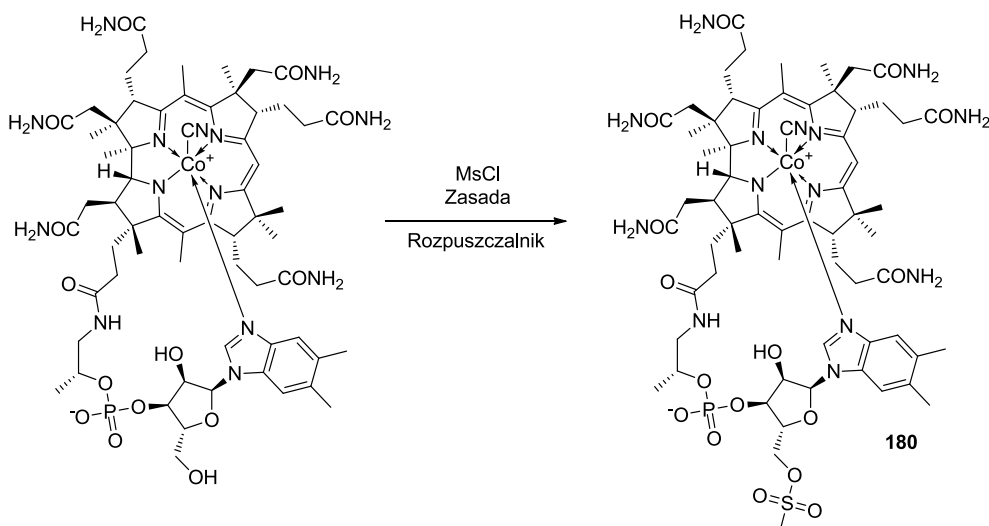
Schemat 3.22. Analiza retrosynteniczna azydku **181**.

3.3.2. Optymalizacja syntezy azydkowej pochodnej witaminy B₁₂

Pierwszy etap otrzymywania zaprojektowanej pochodnej **181** wymagał przekształcenia jedynej pierwszorzędowej grupy -OH w strukturze B₁₂ w dobrą grupę odchodzącą. Reakcja tego typu również nie była do tej pory opisana. Z chemicznego punktu widzenia jest to reakcja banalna, jednak skomplikowana struktura i ograniczona rozpuszczalność witaminy B₁₂ w rozpuszczalnikach organicznych sprawia, że na pozór niewymagające reakcje mogą okazać się kłopotliwe.

Początkowo, podjąłem próby przeprowadzenia grupy 5'OH w odpowiedni tosylian w reakcji witaminy B₁₂ z chlorkiem kwasu *p*-toluenosulfonowego, stosując różne kombinacje mieszanin polarnych aprotycznych rozpuszczalników (DMF, DMSO, DMA, DMPU, HMPA, NMP) i zasad (pirydyna, DIPEA, TEA). Niestety, w wyniku przeprowadzonych eksperymentów uzyskiwałem bardzo skomplikowane mieszaniny reakcyjne, które, jak wykazała analiza MS, zawierały substrat, liczne niezidentyfikowane produkty uboczne i śladowe ilości właściwego produktu. Podobne efekty uzyskałem stosując inne odczynniki sulfonujące: chlorek 4-

nitrofenylosulfonylu, chlorek 2-nitrofenylosulfonylu, chlorek 2,4-dinitrofenylosulfonylu, bezwodnik *p*-toluenosulfonylowy. Jedynie w reakcji z chlorkiem metanosulfonylu w mieszaninie DMA/DIPEA zaobserwowałem selektywne tworzenie się tylko jednego związku (Schemat 3.23, Tabela 3.12, wiersz 1). Związek ten wydzieliłem, a analizy widm NMR i spektrometrii mas potwierdziły, że jest on oczekiwanym produktem mesylowania grupy 5'OH. W widmie ¹H NMR mesylanu **180** zaobserwowałem pojawienie się nowego singletu przy δ = 3.29 ppm pochodzącego od grupy –SO₂CH₃.



Schemat 3.23. Reakcja witaminy B₁₂ z chlorkiem metanosulfonylu.

Bazując na tym wyniku przystąpiłem do optymalizacji warunków reakcji. Postawiłem sobie za cel dobranie takich parametrów, aby możliwe było uniknięcie chromatograficznego oczyszczania produktu. Zwiększanie stężenia MsCl w mieszaninie reakcyjnej spowodowało wzrost konwersji przy jednoczesnym spadku selektywności (wiersze 2-4). Jednak nawet przy zastosowaniu bardzo dużego nadmiaru MsCl, konwersja była wciąż niepełna (wiersz 4). Zmiana zasady z DIPEA na TEA pozwoliła na osiągnięcie wysokiej konwersji bez potrzeby używania znacznych nadmiarów MsCl. Jednak w reakcji tworzyło się dużo produktów ubocznych. Kolejne reakcje przeprowadziłem używając NMP jako rozpuszczalnika, w którym reakcja przebiegała selektywnie, ale z niską konwersją (wiersze 6 i 7). Kluczowym czynnikiem, który ostatecznie zapewnił wysoką konwersję, było dodawanie reagentów do roztworu witaminy B₁₂ w trzech porcjach w godzinnych odstępach (wiersz 8). Takie podejście pozwoliło na osiągnięcie pełnej i selektywnej konwersji w czasie 4 godzin oraz wykluczyło potrzebę używania dużych nadmiarów MsCl. Reakcję można było przeprowadzić w skali preparatywnej (wiersz 9) bez spadku konwersji i selektywności. W mieszaninie reakcyjnej produkt **180** był jedyną pochodną witaminy B₁₂ (analiza HPLC), zatem jego wydzielenie wymagało jedynie przeprowadzenia serii odpowiednich ekstrakcji roztworem fenolu w DCM. Uniknięcie konieczności wydzielenia pochodnej **180** technikami chromatograficznymi znacznie uprościło i skróciło całą procedurę.

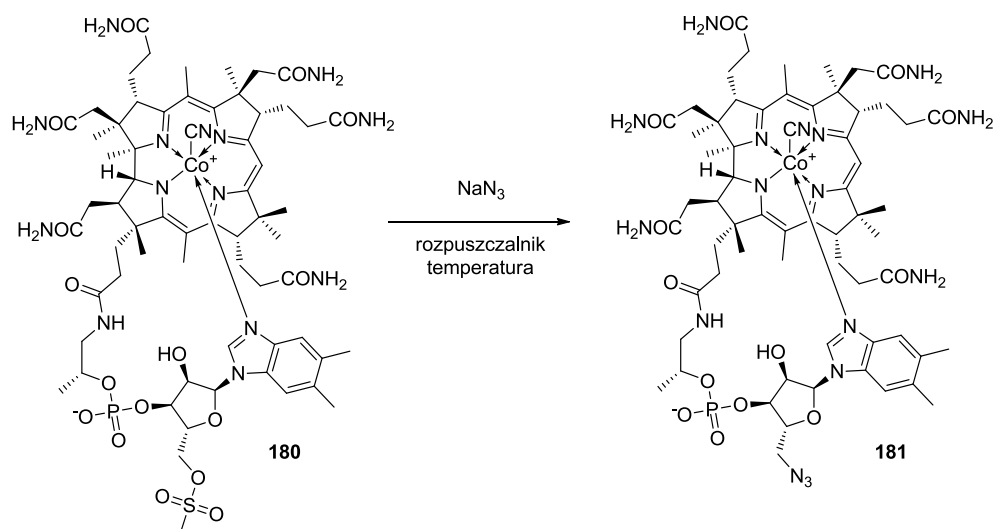
Tabela 3.12. Optymalizacja warunków reakcji witaminy B₁₂ z chlorkiem metanosulfonylu.^a

L.p.	MsCl [Eq]	Rozpuszczalnik	Zasada	Konwersja [%] ^b
1	5	DMA	DIPEA	36
2	15	DMA	DIPEA	70 ^c
3	30	DMA	DIPEA	80 ^c
4	60	DMA	DIPEA	85 ^c
5	15	DMA	TEA	80 ^c
6	15	NMP	DIPEA	43
7	15	NMP	TEA	40
8 ^d	15	NMP	DIPEA	100 ^e
9 ^d	5	NMP	DIPEA	100 ^e (90) ^f

[a] Ogólne warunki reakcji: witaminę B₁₂ (1.3 mg, 1.0 μmol) roztwarzano w odpowiednim rozpuszczalniku (100 μl), do roztworu dodawano MsCl i zasadę (50 μl); [b] oszacowana na podstawie analizy HPLC po 18 h prowadzenia reakcji; [c] w mieszaninie reakcyjnej obecne były niezidentyfikowane produkty uboczne; [d] Roztwór MsCl w NMP (100 μl) i zasada dodawane były w trzech równych porcjach w godzinnych odstępach; [e] konwersja po godzinie od dodania ostatnich porcji roztworu MsCl i zasady; [f] wydajność wydzielonego produktu **180** w reakcji przeprowadzonej w skali 1 mmol witaminy B₁₂.

Mając opracowaną doskonałą metodę syntezy pochodnej **180** przystąpiłem do optymalizacji warunków reakcji podstawienia grupy 5'OMs anionem azydkowym. Wydawać by się mogło, że jest to reakcja wyjęta wprost z elementarza chemii organicznej i znowu dała o sobie znać niebanalna struktura witaminy B₁₂, która komplikuje prowadzenie nawet najprostszych reakcji. Reakcję pomiędzy mesylanu **180** z azydkiem sodu początkowo prowadziłem w DMF (Tabela 3.13, wiersze 1-3). W temperaturze pokojowej reakcja przebiegała selektywnie, ale bardzo powoli, po trzech dniach konwersja wynosiła zaledwie 36% (wiersz 1).

Tabela 3.13. Optymalizacja otrzymywania azydku **181**.^a

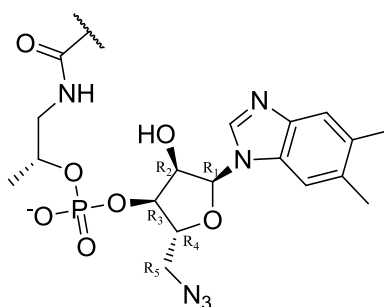


L.p.	Rozpuszczalnik	T [°C]	Konwersja [%] ^b	
			24 h	72 h
1	DMF	25	25	36
2	DMF	40	30	72 ^c
3	DMF	60	50 ^c	-
4	DMSO	25	ślady	10
5	DMPU	25	62	80
6	DMPU	40	100 ^{c,d}	-
7	NMP	25	15	50
8	NMP	40	80 ^c	-
9	HMPA	25	92	92
10	HMPA	40	100 (93) ^e	-

[a] Ogólne warunki reakcji: mesylan **180** (5 mg, 3.5 μmol) i NaN_3 (1 mg, 17.5 μmol) roztworzano w odpowiednim rozpuszczalniku (100 μl), umieszczano w łaźni olejowej i ogrzewano do odpowiedniej temperatury; [b] oszacowana na podstawie analizy HPLC; [c] tworzenie się produktów wymiany liganda na atomie kobaltu; [d] w mieszaninie reakcyjnej obecne były niezidentyfikowane produkty uboczne; [e] wydajność wydzielonego produktu **181** w reakcji przeprowadzonej w skali 0.5 mmol.

Widmo spektrometrii mas surowej mieszaniny reakcyjnej potwierdziło powstanie pożądanego produktu. Podniesienie temperatury, tak jak się spodziewałem, przyspieszyło reakcję, lecz spowodowało częściową wymianę liganda cyjankowego na atomie kobaltu na azydkowy, zarówno w substracie, jak i w produkcie (wiersze 2 i 3). Zamiana rozpuszczalnika na DMSO znacznie spowolniła reakcję (wiersz 4), prowadząc jedynie do powstania śladów produktu. Przy zastosowaniu DMPU, po trzech dniach konwersja zatrzymała się na poziomie 80%. Nie poprawił jej nawet dodatek kolejnych porcji NaN₃ (wiersz 5). Podniesienie temperatury do 40 °C, pomimo, że zapewniło pełną konwersję, spowodowało znaczny spadek selektywności reakcji (wiersz 6). Podobny rezultat uzyskałem stosując NMP jako rozpuszczalnik (wiersze 7 i 8). Dopiero reakcja prowadzona w HMPA prowadzona w temperaturze 40 °C przebiegła z zadowalającą szybkością, wysoką selektywnością i konwersją (wiersz 9). Wydajność azydku **181**, w reakcji przeprowadzonej w skali 0.5 mmol, wynosiła 93% a jego wydzielanie produktu z mieszaniny preakcyjnej ograniczone było jedynie do technik ekstrakcyjnych.

Tabela 3.14. Porównanie sygnałów w widmie ¹³C NMR pochodzących od fragmentu rybozy w B₁₂ i azydku **181**.^a

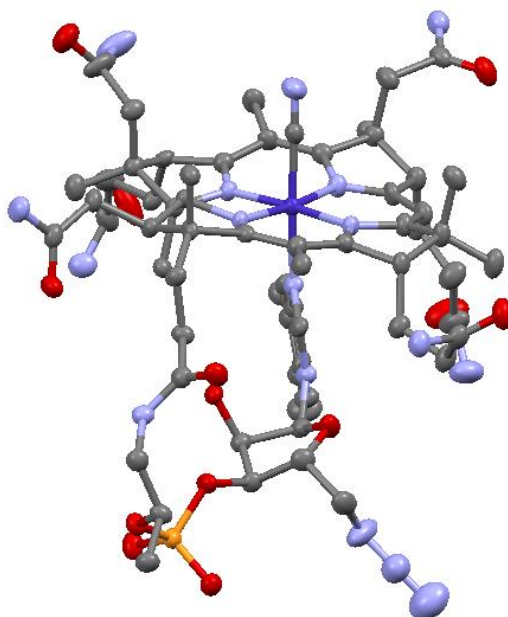


Przypisanie	B ₁₂	Azydek 181		
	¹³ C NMR [ppm]	¹³ C NMR [ppm]	HSQC [ppm]	HMBC
R1	85.4	85.9	6.32	-
R2	69.2	68.9	3.99	-
R3	74.7	72.6	4.58	-
R4	81.4	80.2	4.03	-
R5	61.9	51.2	3.86; 3.59	4.58 (R3)

[a] Widma zarejestrowane zostały w DMSO-d₆ na aparacie Varian 600 MHz. Wartości δ podane są względem resztkowych sygnałów rozpuszczalnika użytych jako wzorzec wewnętrzny (δ = 2.50 i 39.52).

Struktura azydku **181** została potwierdzona z użyciem całego arsenału technik magnetycznego rezonansu jądrowego i spektrometrii mas. Obecność grupy azydkowej potwierdzało charakterystyczne, intensywne pasmo przy 2106 cm^{-1} w widmie IR. W widmie ESIMS obecne były sygnały przy $m/z = 701.79, 712.17, 1380.58$ i 1402.56 odpowiadające jonom pseudomolekularnym odpowiednio: $[M+H+Na]^{2+}$, $[M+2Na]^{2+}$, $[M+H]^+$ i $[M+Na]^+$. Analiza widm NMR pozwoliła na przypisanie prawie wszystkich obserwowanych sygnałów. Kluczowy sygnał w widmie ^{13}C NMR pochodzący od węgla R5 we fragmencie rybozy jest przesunięty w górę pola o 10.7 ppm w porównaniu do analogicznego sygnału w witaminie B_{12} (Tabela 3.14, wiersz 5). Zmiany w wartościach przesunięć pozostałych sygnałów pierścienia rybozy były nieznaczne.

Ostatecznym potwierdzeniem struktury azydku **181** było wykonanie rentgenowskiej analizy strukturalnej monokryształu uzyskanego przez dyfuzję par acetonu do wodnego roztworu **181** (Rysunek 3.7). Azydek **181** krystalizował w układzie rombowym w grupie przestrzennej $\text{P}2_12_12_1$, charakterystycznej dla witaminy B_{12} i jej pochodnych. Zastąpienie grupy hydroksylowej azydkiem nie spowodowało znaczących zmian strukturalnych w obrębie cząsteczki. Zauważalnemu wydłużeniu uległo jedynie wiązanie R4-R5, którego długość w azydku **181** wynosi 1.527 \AA w porównaniu do 1.450 \AA w witaminie B_{12} .¹²³



Rysunek 3.7. Struktura krystaliczna azydku **181**.

3.3.3. Zastosowanie azydkowej pochodnej witaminy B_{12} w reakcjach AAC.

Kolejnym krokiem moich badań było sprawdzenie, czy azydek **181** może być użyty jako substrat w CuAAC. Alkinem, wybranym przeze mnie do badań nad poszukiwaniem optymalnych warunków reakcji był alkohol propargilowy (Tabela 3.15). Wybór tego alkinu podyktowany był

spodziewaną różnicą w polarności substratu i produktu, która ułatwiłaby kontrolę przebiegu reakcji techniką HPLC.

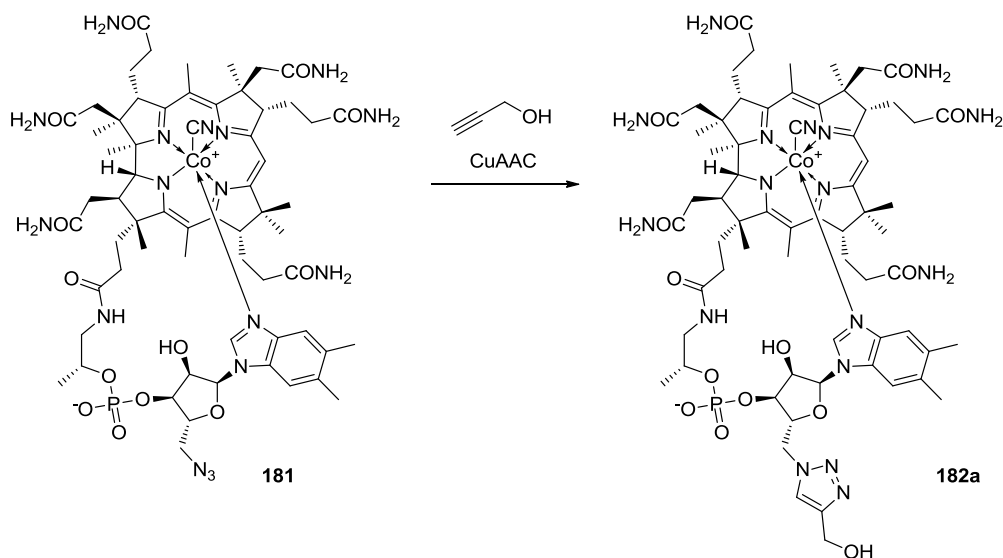


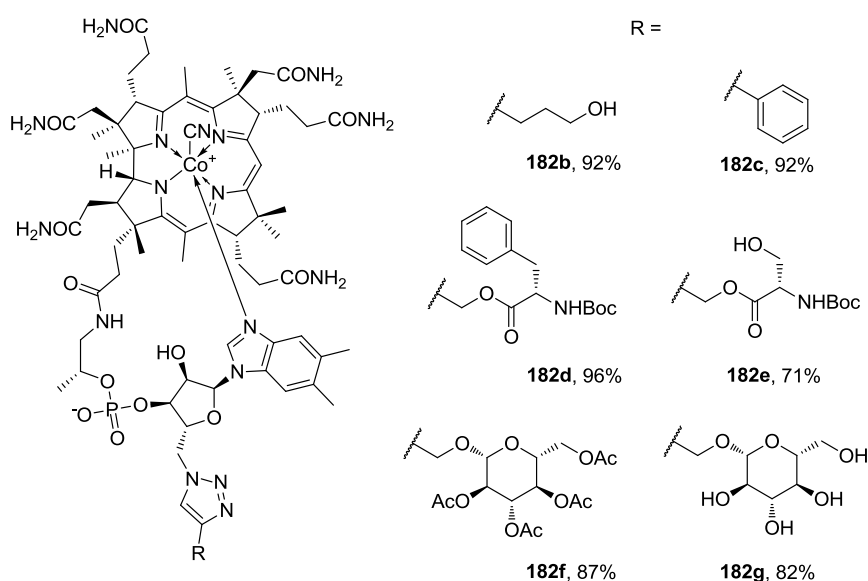
Tabela 3.15. Optymalizacja warunków CuAAC azydki **181** z alkoholem propargilowym.^a

L.p.	Katalizator	Rozpuszczalnik	t [h]	Konwersja [%] ^b
1	CuSO ₄ /NaAsk	DMF	24	60 ^e
2	CuSO ₄ /NaAsk/TBTA	DMF	3	45 ^e
3	CuI/TBTA	DMF	24	25
4	CuOAc	H ₂ O	3	50 ^d
5	[PhenCu(PPh ₃) ₂] ₂ NO ₂	H ₂ O	24	0
6	CuI/TBTA	H ₂ O	24	93
7	CuI/TBTA	H ₂ O/ <i>t</i> -BuOH ^c	24	88
8	CuI/TBTA	H ₂ O/THF ^c	24	90
9	CuI/TBTA	H ₂ O/DMF ^c	24	100(96) ^f

[a] Ogólne warunki reakcji: azydek **181** (5 mg, 0.003 mmol) i alkohol propargilowy (0.5 μl) dodawano do roztworu katalizatora (40 mol%) w odpowiednim rozpuszczalniku (200 μl), reakcje prowadzono w temperaturze pokojowej; [b] oszacowana na podstawie analizy HPLC; [c] mieszanina 1/1 v/v; [d] skomplikowana mieszanina reakcyjna; [e] wydajność wydzielonego produktu **182a** w reakcji przeprowadzonej w skali 0.02 mmol z użyciem 20 mol% katalizatora.

Reakcja w obecności Cu(I), generowanej *in situ*,¹⁸ doprowadziła do powstania oczekiwanego produktu, jednak konwersja była niepełna i tworzyły się liczne produkty uboczne (Tabela 3.15, wiersz 1). Dodatek TBTA³⁶ (wiersz 2) przyspieszył reakcję, lecz nie poprawił selektywności. Doskonałą selektywność zapewniło użycie układu katalitycznego CuI/TBTA, lecz reakcja była powolna (wiersz 3). Inne katalizatory, wcześniej wykorzystywane przeze mnie, również okazały się nieskuteczne (wiersze 4 i 5).^{35,43} Tylko reakcja katalizowana CuI/TBTA prowadziła do selektywnego tworzenia się cykloadduktu **182a**. Postanowiłem sprawdzić, czy zmiana rozpuszczalnika pozwoli na przyspieszenie reakcji i uzyskanie wyższej konwersji. Reakcja w wodzie była selektywna, ale przebiegała z niepełną konwersją (wiersz 6). Użycie mieszanin wody z różnymi rozpuszczalnikami (wiersze 7-9) doprowadziło do ustalenia optymalnego środowiska reakcji – mieszaniny woda/DMF (wiersz 9). W takich warunkach konwersja była całkowita, a produkt **182a** mógł być wydzielony z wydajnością 96%.

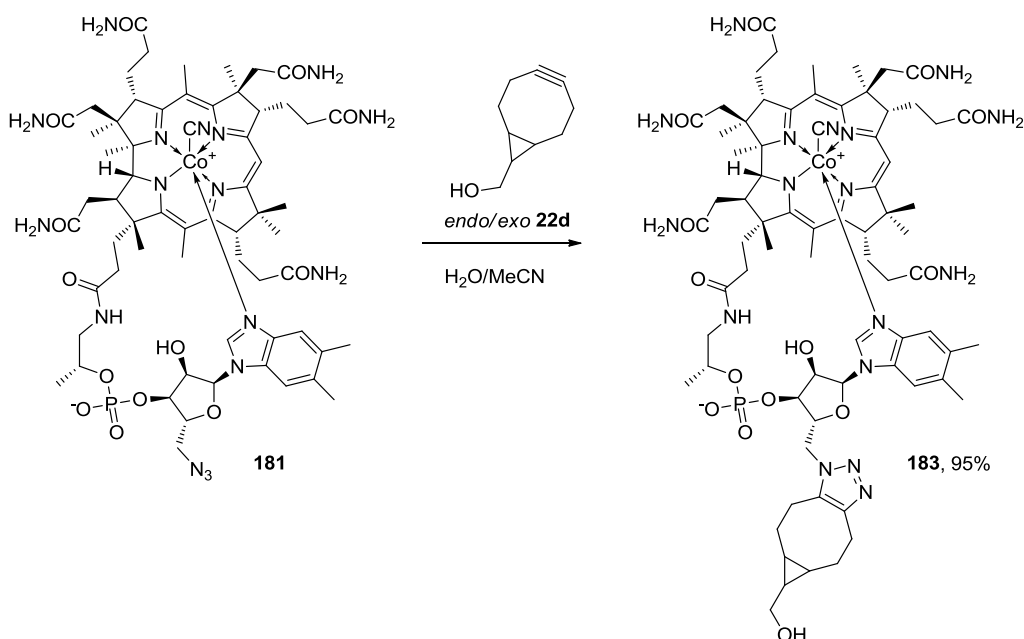
Opracowane warunki okazały się ogólne zarówno dla stosunkowo prostych związków, jak i tych bardziej sfunkcjonalizowanych (Rysunek 3.8).



Rysunek 3.8. Zastosowanie azydku **181** w reakcji CuAAC.

W reakcji azydku **181** z 4-pentyn-1-olem i fenyloacetylenem (**5**) wydajności otrzymanych cykloadduktów **182b** i **182c** wynosiły w obu wypadkach 92%. Ester propargilowy L-fenyloalaniny dał pochodną **182d** z bardzo wysoką wydajnością 96%, natomiast niższa wydajność 71% uzyskana została dla analgicznej pochodnej L-seryny **182e**. O-Glikozydy propargilowe D-glukozy reagowały podobnie, niezależnie od tego, czy użyty substrat był wyczerpująco acylowany (pochodna **182f**, 87%), czy też grupy hydroksylowe były niezabezpieczone (pochodna **182g**, 82%).

Azydki **181** okazały się również aktywne w reakcji typu SPAAC.²⁶ Bicykliczna pochodna cyklooktynu **22d**⁵⁴ użyta w formie mieszaniny izomerów *endo/exo*, spontanicznie reagowała z azydkiem **181**, dając pochodną **183** z niemal ilościową wydajnością (Schemat 3.24).

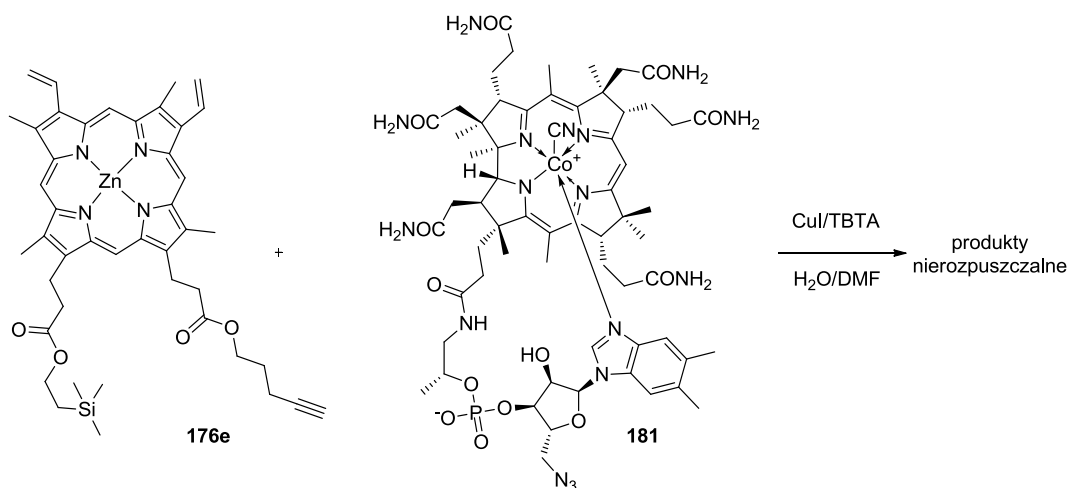


Schemat 3.24. Zastosowanie azydki **181** w SPAAC.

3.3.4. Próba syntezy połączenia pochodnych witaminy B₁₂ i PpIX.

Mając potwierdzoną wysoką reaktywność azydki **181** w reakcjach cykloaddycji do alkinów, przeprowadziłem próby jego połączenia z pochodną PpIX **176e** (Schemat 3.25). Niestety, otrzymane produkty (wśród nich zapewne i oczekiwana hybryda) wytrącały się z mieszaniny reakcyjnej i były nierozpuszczalne w żadnym rozpuszczalniku, co uniemożliwiło przeprowadzenie analiz, w tym nawet analizy TLC. Efekt innych podjętych przeze mnie prób przeprowadzenia tej reakcji był podobny. Nie pomogły ani zmiany rozpuszczalnika na bezwodny DMF, ani próby zastosowania innych katalizatorów.

Próba usunięcia silylowej grupy zabezpieczającej grupę karboksylową fragmentu PpIX 0.1 M roztworem TBAF w THF nie powiodła się. Potraktowanie mieszaniny poreakcyjnej (po starannym usunięciu rozpuszczalników) bezwodnym kwasem trifluoroctowym doprowadziło do powstania skomplikowanej mieszaniny związków. Jestem przekonany, że zastosowanie pochodnych PpIX sfunkcjonalizowanych na grupach winylowych i posiadających wolne grupy karboksylowe oraz staranna optymalizacja warunków reakcji pozwolą na otrzymanie pożądaných hybryd, ale badania związane z takimi pochodnymi PpIX nie były przedmiotem mojego doktoratu.¹³²



Schemat 3.25. Próba połączenia pochodnej witaminy B₁₂ z pochodną PpIX na drodze CuAAC.

3.3.5. Podsumowanie

Prace nad syntezą pochodnej witaminy B₁₂, mogącej być substratem w reakcji CuAAC, doprowadziły mnie do opracowania bardzo efektywnej metody wprowadzania grupy azydkowej w pozycję 5' fragmentu rybozy. Główną zaletą opracowanej, dwuetapowej syntezy azydku **181** jest jej wysoka wydajność oraz prosty sposób wydzielenia produktu, sprowadzający się wyłącznie do technik ekstrakcyjnych. Zarówno mesylian **180** jak i azydek **181** można w krótkim czasie otrzymać w skali gramowej, co jest rzadkością w chemii pochodnych witaminy B₁₂.

Azydek **181** okazał się dobrym substratem do CuAAC i SPAAC. Mam nadzieję, że opracowana metoda okaże się użytecznym rozszerzeniem dostępnych sposobów łączenia witaminy B₁₂ ze związkami o potencjalnym znaczeniu farmaceutycznym.

3.4. Alkynylowe pochodne witaminy B₁₂

3.4.1. Wstęp

Zmiana liganda na kationie kobaltu w witaminie B₁₂ nie wpływa znacząco na rozpoznanie tak zmodyfikowanej cząsteczki przez odpowiednie enzymy.¹²⁸ Strategia łączenia witaminy B₁₂ ze związkami biologicznie czynnymi poprzez modyfikacje ligandów, np. w reakcji alkilowania kationu kobaltu wydaje się atrakcyjna. Niestety, prowadzenie reakcji na centralnym kationie kobaltu witaminy B₁₂ wiąże się z licznymi trudnościami. Pierwszym problemem jest konieczność przeprowadzenia redukcji Co(III) do Co(I). Jest to proces wymagający użycia nadmiaru silnych reduktorów (np. metalicznego cynku) w ściśle bezwodnych i beztlenowych warunkach. Kolejny problem polega na tym, że otrzymane pochodne zawierające wiązanie Co-C są zazwyczaj bardzo nietrwałe i rozkładają się pod wpływem tlenu, światła i podwyższonej temperatury. Pomimo niedogodności, w literaturze znaleźć można wiele przykładów syntez pochodnych witaminy B₁₂, do których wprowadzony został ligand alkilowy,¹²³ winylowy,¹³³ a ostatnio nawet aryłowy.¹³⁴ Niektóre z tych związków wykazują bardzo ciekawe właściwości biologiczne. Metylokobalamina jest związkiem występującym w naturze, ważnym kofaktorem w enzymatycznych reakcjach transferu grupy metylowej.¹²⁵ Arylokobalamina, nazwana przez odkrywców „antywitaminą”,¹³⁴ ma tę ciekawą cechę, że jest rozpoznawana i transportowana przez odpowiednie enzymy, lecz ze względu na trwałość wiązania Co-C(sp²) nie wykazuje właściwości biologicznych charakterystycznych dla witaminy B₁₂.

Interesującym jest fakt, że chemia pochodnych witaminy B₁₂ zawierających wiązanie Co-C(sp) jest bardzo słabo poznana. W literaturze opisano dwa przykłady takich związków, lecz brak jest ogólnej metody ich otrzymywania, a głębsze badania strukturalne nie zostały do tej pory opublikowane. Pratt wykazał, że reakcje kobinamidu z acetylenem i fenyloacetylenem prowadzone w obecności soli miedzi(II) prowadzą do mieszaniny zawierającej pochodne mono- i di-alkynylowane na atomie kobaltu.¹³⁵ Szczegółowy mechanizm reakcji (zwłaszcza rola soli miedzi) i właściwości otrzymanych związków nie były dyskutowane. Klar, w krótkim i lakonicznym komunikacie, opisał reakcję witaminy B₁₂ z fenyloacetylenkiem sodu w ciekłym amoniaku.¹³⁶ Otrzymany produkt alkynylowania kobaltu nie był jednak dobrze scharakteryzowany.

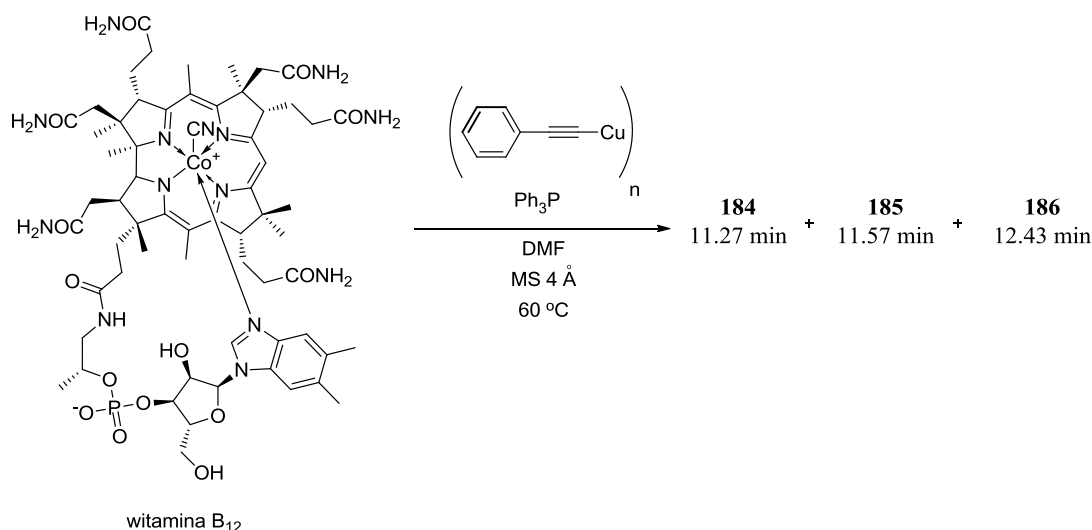
Oba doniesienia sugerowały, że możliwe jest przeprowadzenie reakcji witaminy B₁₂ z alkinami bez potrzeby redukcji kationu kobaltu. Co ciekawe, ostatnio szczegółowo opisano

reakcję zredukowanej witaminy B₁₂ z fenyloacetylenem prowadzącą wyłącznie do fenylowinylkobalaminy,¹³⁷ co jeszcze mocniej utwierdziło mnie w przekonaniu istnienia alternatywnych mechanizmów reakcji witaminy B₁₂ z alkinami przebiegających na kationie kobaltu, bez użycia reduktorów. Wydało mi się to bardzo intrygujące, warte sprawdzenia oraz ewentualnego rozwinięcia.

3.4.2. Odkrycie i optymalizacja otrzymywania alkynylowej pochodnej witaminy B₁₂

Planując wstępne eksperymenty, wziąłem pod uwagę oba czynniki umożliwiające reakcję alkynyłowania kobaltu przedstawione w przytoczonych pracach: obecność jonów miedzi¹³⁵ i obecność soli fenylacetyleny (w oryginalnym komunikacie Klara, soli sodowej).¹³⁶ Obecność obu tych czynników zapewniało użycie fenyloacetylenku miedzi(I), który jest związkiem stabilnym i łatwo dostępnym.

W reakcji witaminy B₁₂ z fenyloacetylenkiem miedzi(I) użytym w nadmiarze w obecności trifenylofosfiny zaobserwowałem tworzenie się trzech głównych produktów **184**, **185** i **186** (Schemat 3.26, na schemacie podano czasy retencji poszczególnych związków w przyjętych warunkach analizy HPLC). Przedłużanie czasu reakcji prowadziło do zaniku związku **185**, pozostałe dwa, jak się okazało, pozostawały ze sobą w równowadze w proporcji ok. 1:3 (**184**:**186**). Krótka optymalizacja mająca na celu wyeliminowanie tworzenia się produktów ubocznych pozwoliła na znalezienie warunków, w których tworzyły się wyłącznie trzy zaobserwowane wcześniej produkty.



Schemat 3.26. Reakcja witaminy B₁₂ z fenyloacetylenkiem miedzi(I).

Staranna kontrola składu mieszaniny reakcyjnej (Tabela 3.16) wykazała, że związek **185** jest najprawdopodobniej pierwotnym produktem reakcji i w czasie jej trwania przekształca się w związki **184** i **186** pozostające ze sobą w równowadze.

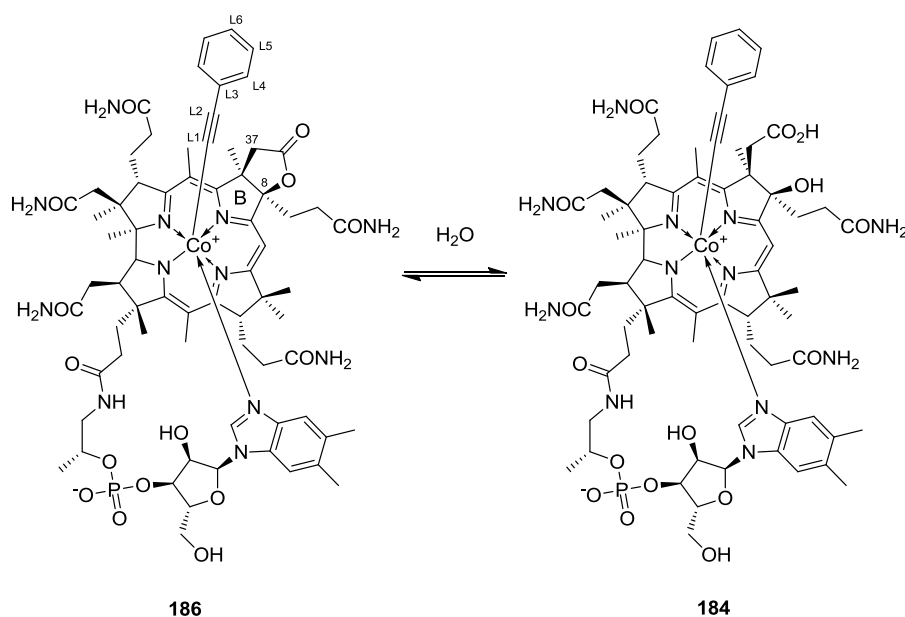
Ze względu na fakt, że związki **184** i **186** pozostają ze sobą w równowadze, ich rozdział technikami chromatograficznymi był stosunkowo trudny, jednak udało mi się wyizolować próbkę czystego związku **186** z wydajnością 22% i poddać go analizie.

Tabela 3.16. Kontrola zmiany składu mieszaniny reakcyjnej w reakcji pomiędzy B₁₂ a fenyloacetylenkiem Cu(I).^a

L.p.	t	Udział składników w mieszaninie reakcyjnej [%] ^b			
		B ₁₂	184	185	186
1	5 min	91	0	7	1
2	10 min	87	1	9	3
3	15 min	85	1	9	4
4	30 min	75	2	15	8
5	45 min	67	3	20	10
6	1h	56	3	25	15
7	2h	23	3	30	30
8	3h	15	8	34	45
9	5h	0	13	14	53
10	24h	0	22	0	71

[a] Ogólne warunki reakcji: Witaminę B₁₂ (1 Eq), fenyloacetylenek Cu(I) (10 Eq), Ph₃P (10 Eq) i sita molekularne 4Å dodano w atmosferze argonu do bezwodnego DMF i ogrzewano do 60 °C; [b] oszacowany na podstawie analizy HPLC.

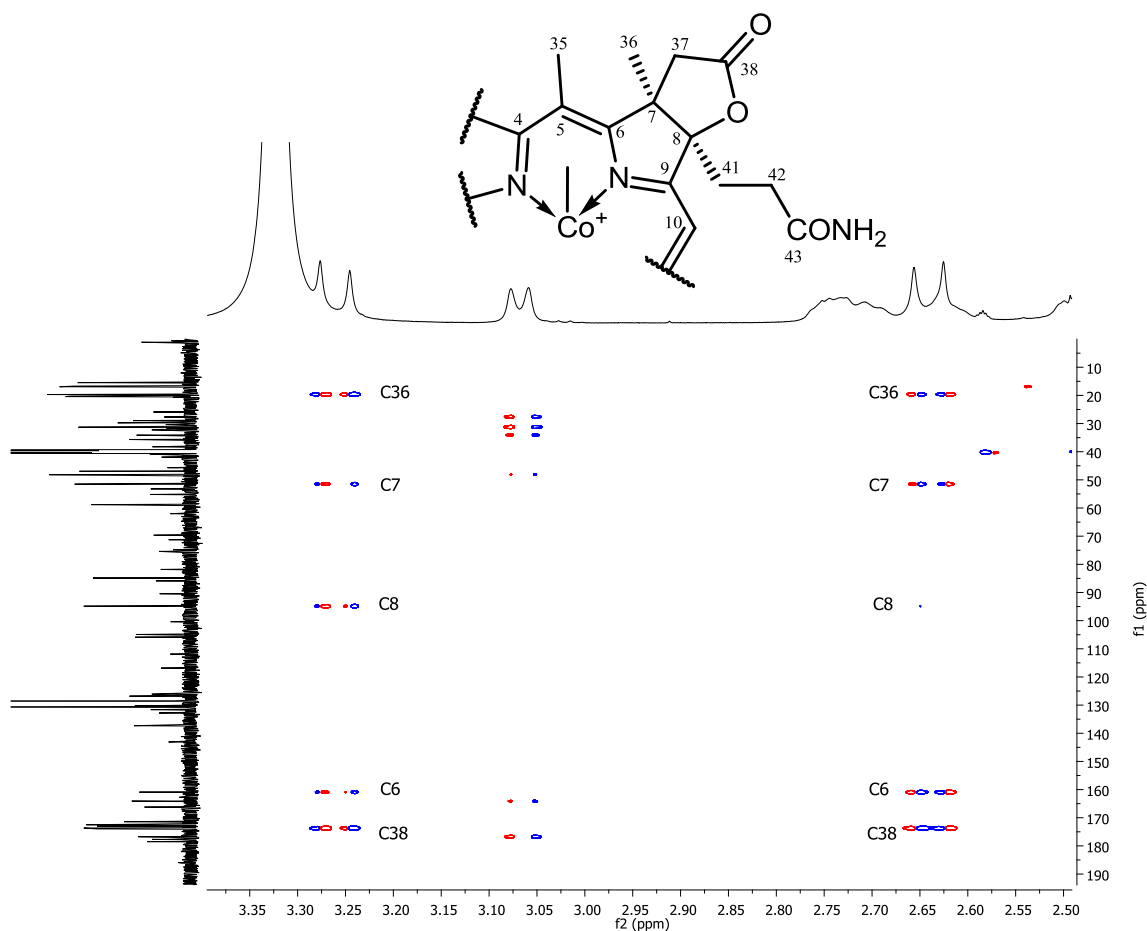
Analiza widm NMR (¹H, ¹³C i widm korelacyjnych) oraz spektrometrii mas pozwoliła na jednoznaczne określenie struktury związku **186**. Okazał się on być pochodną B₁₂, w której nastąpiło spodziewane alkynyłowanie atomu kobaltu oraz laktonizacja grupy acetamidowej znajdującej się na pierścieniu B liganda korynowego (Schemat 3.27). Zamykanie się takiego laktonu jest częstą reakcją uboczną w chemii witaminy B₁₂.¹³⁸



Schemat 3.27. Struktura związków **184** i **186**.

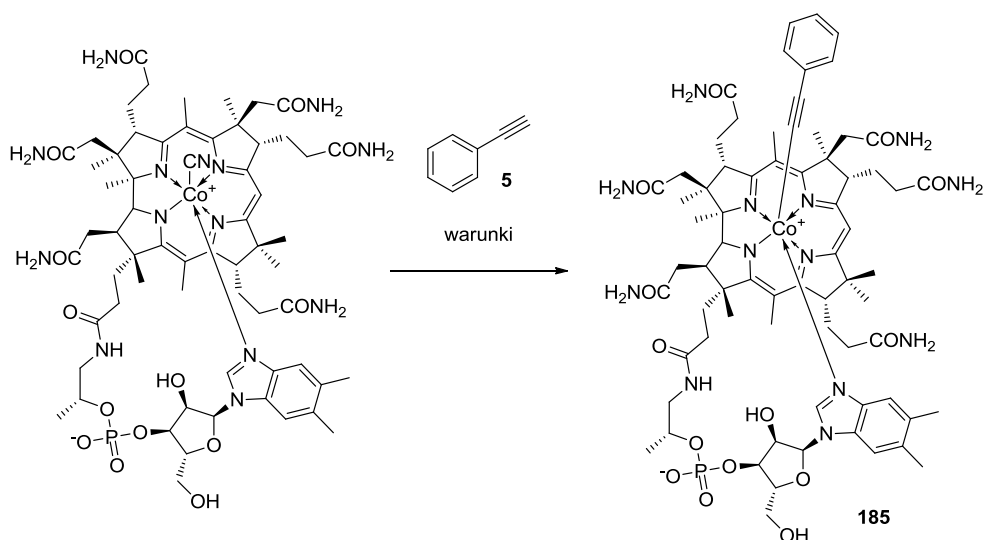
Stechiometria związku **186** określona została techniką spektrometrii mas wysokiej rozdzielczości. W widmie obecny jest sygnał $m/z = 1429.5796$ odpowiadający masie jonu pseudomolekularnego $[M+H]^+$ z dokładnością 0.8 ppm. Na widmach NMR związku **186** najbardziej charakterystyczne są sygnały pochodzące od grupy fenylovej, znajdujące się w regionach charakterystycznych dla protonów i atomów węgla aromatycznych oraz dla węgla L2 ($\delta = 100.4$ ppm w widmie ^{13}C NMR), wchodzącego w skład grupy alkinowej. Zbyt wolna relaksacja jądra atomu węgla L1 oraz znaczne poszerzenie sygnału związane z oddziaływaniem z kwadrupolowym jądrem ^{59}Co spowodowały, że odpowiedni sygnał w widmie ^{13}C NMR jest niewidoczny. Obecność laktonu na pierścieniu B koryny została potwierdzona znacznym przesunięciem się w dół pola sygnału pochodzącego od atomu węgla w pozycji 8 (94.9 ppm dla **186** w porównaniu do 54.1 ppm dla witaminy B₁₂). Ponadto usztywniona struktura laktonu powoduje, że sygnały pochodzące od protonów grupy metylenowej w pozycji 37 występują w postaci dwóch dubletów przy odpowiednio 3.25 i 2.64 ppm, które wykazują ten sam zestaw korelacji z atomami węgla w pozycjach C6, C7, C8, C36, C38 w widmie HMBC (Rysunek 3.9). Pełne przypisanie sygnałów obserwowanych w widmach ^1H i ^{13}C NMR zamieszczone jest w części eksperymentalnej.

W widmie spektrometrii mas zarejestrowanym dla mieszaniny związków **184** i **186** w stanie równowagi obecne są sygnały przy $m/z = 1429.6$ (dla **186**) i 1447.6 (dla **184**). Różnica 18 Da w masie odpowiednich jonów sugeruje, że związek **184** jest produktem przyłączenia do **186** cząsteczki wody, najprawdopodobniej w reakcji hydrolizy laktonu. Ze względu na to, że związku **184** nie udało mi się wydzielić w stanie czystym, nie przeprowadzałem jego pełnej charakterystyki.



Rysunek 3.9. Fragment widma HMBC laktonu **186**.

Struktura związku **186**, sugerowała, że pochodna **185**, pierwotny produkt reakcji, jest alkynylowaną pochodną witaminy B₁₂, która w czasie trwania reakcji przekształca się w lakton **186**. Kolejnym krokiem moich badań, było sprawdzenie, czy możliwe jest przeprowadzenie bezpośredniej reakcji pomiędzy witaminą B₁₂ i fenyloacetylenem oraz wyeliminowanie reakcji laktonizacji (Schemat 3.28). W reakcji witaminy B₁₂ z fenyloacetylenem prowadzonej w DMA w obecności CuI (0.5 Eq) i Ph₃P nie zaobserwowałem śladów konwersji nawet po trzech dniach. Po dodaniu do mieszaniny reakcyjnej DIPEA, w ciągu 20 godzin konwersja osiągnęła 54%. Jediną pochodną witaminy B₁₂, która się tworzyła był związek **185**, pierwotny produkt reakcji B₁₂ z fenyloacetylenkiem miedzi(I). Związek ten wydzieliłem i po wykonaniu kompletu analiz okazało się, że jest to oczekiwany produkt alkynylowania kobaltu (dyskusja wyników analiz spektroskopowych znajduje się kolejnym podrozdziale).



Schemat 3.28. Otrzymywanie alkynylowanej pochodnej witaminy B₁₂.

Przystąpiłem zatem do intensywnej optymalizacji badanej reakcji. Na początku postanowiłem sprawdzić, które ze składników mieszaniny reakcyjnej wpływają na konwersję. Wykluczając kolejne składniki, ustaliłem, że dodatek Ph₃P jest zbędny, natomiast obecność Cu(I) oraz zasady jest warunkiem koniecznym do zajścia reakcji. Zmiana rozpuszczalnika nie poprawiła osiągniętej konwersji (Tabela 3.17), a w przypadku użycia NMP i metanolu (wiersze 2 i 3) zaobserwowałem powolne tworzenie się laktonu **186**. Użycie wody i DMSO dało jedynie ślady produktu (wiersze 4 i 5).

Tabela 3.17 Optymalizacja rozpuszczalnika w reakcji witaminy B₁₂ z fenyloacetylenem.^a

L.p.	Rozpuszczalnik	Konwersja [%] ^b
1	DMF	20
2	NMP	46 ^c
3	MeOH	20 ^c
4	H ₂ O	2
5	DMSO	5

[a] Ogólne warunki reakcji: do roztworu witaminy B₁₂ (13 mg, 10 μmol), fenyloacetyleny (10 μl, 100 μmmol) i CuI (1 mg, 5 μmol) w odpowiednim rozpuszczalniku (0.2 ml) dodawano *i*-Pr₂EtN (8 μl, 50 μmol). Próbkki analityczne pobrane były po 20 h; [b] oszacowana na podstawie analizy HPLC; [c] tworzenie się laktonu **186**.

Kolejnym krokiem było ustalenie optymalnego źródła miedzi (Tabela 3.18). Okazało się, że dowolna sól Cu(I) katalizuje omawianą reakcję. Najszybszą konwersję zaobserwowałem w reakcji katalizowanej CuOAc, dla którego konwersja osiągnęła 54% już po czterech godzinach.

Tabela 3.18. Wpływ soli miedzi na przebieg reakcji witaminy B₁₂ z fenyloacetylenem.^a

L.p.	CuX	Konwersja [%] ^b	
		4h	24h
1	CuCl	30	50
2	CuBr	25	50
3	CuI	35	50
4	CuCN	15	50
5	CuOAc	54	54

[a] Ogólne warunki reakcji: do roztworu witaminy B₁₂ (13 mg, 10 μmol), fenyloacetyleny (10 μl, 100 μmol) i CuX (5 μmol) w DMA (0.2 ml) dodawano *i*-Pr₂EtN (8 μl, 50 μmol); [b] oszacowana na podstawie analizy HPLC.

W toku dalszych badań ustaliłem, że najlepszą zasadą dla badanej reakcji jest DBU, pozwalający na osiągnięcie konwersji 65%. Zastosowanie innych zasad (TEA, pirydyna, DABCO, morfolina) nie poprawiło wyniku, powodowało spadek selektywności i tworzenie się laktonu **186**.

Zastanawiający wydał mi się fakt, że poziom konwersji był prawie zawsze na poziomie, który odpowiadał ilości użytej soli miedzi. Sugerowało to, że reakcja nie ma charakteru katalitycznego, a sól miedzi jest reagentem. W celu ustalenia, czy moje przypuszczenia są słuszne, przeprowadziłem serię reakcji stopniowo zwiększając ilość dodawanego CuOAc (Tabela 3.19).

Tabela 3.19. Wpływ ilości CuOAc na konwersję w reakcji witaminy B₁₂ z fenyloacetylenem.^a

L.p.	CuOAc [mol%]	Konwersja [%] ^b
1	30	37
2	50	65
3	80	83
4	100	96 (85) ^c

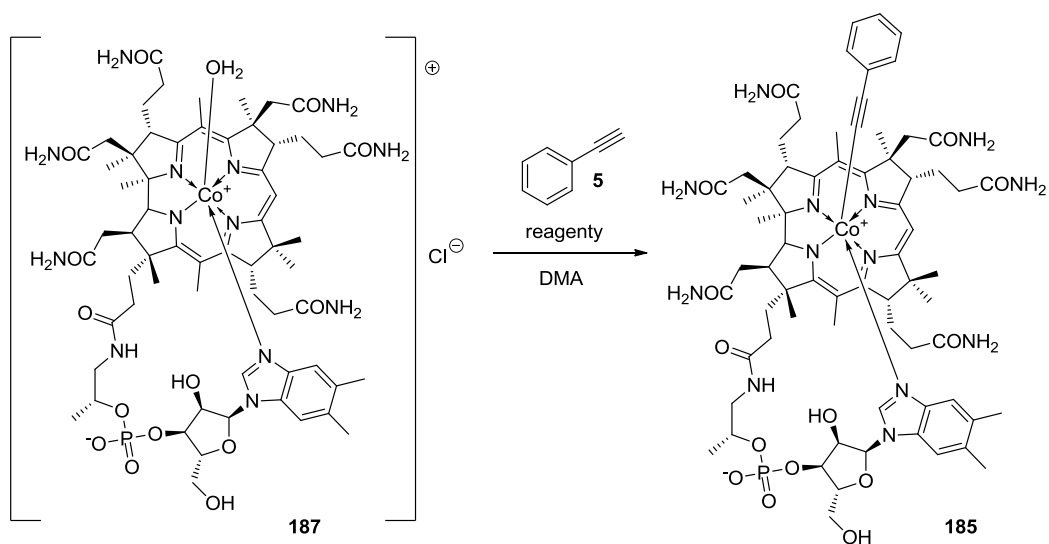
[a] Ogólne warunki reakcji: do roztworu witaminy B₁₂ (13 mg, 10 μmol), fenyloacetyleny (10 μl, 100 μmol) i CuOAc w DMA (0.2 ml) dodawano DBU (7 μl, 50 μmol), próbki analityczne pobrano po 6h; [b] oszacowana na podstawie analizy HPLC; [c] wydajność wydzielonego związku **185** w skali 100 μmol.

Z otrzymanych danych wynika, że sól Cu(I) jest reagentem stechiometrycznym i niemal ilościową konwersję zapewnia użycie jej w ilości równomolowej względem witaminy B₁₂ (Tabela 3.19, wiersz 4). Warunki, z użyciem stechiometrycznej ilości CuOAc i DBU jako zasady uznałem za optymalne. Alkynyłowaną pochodną witaminy B₁₂ otrzymałem z wydajnością 85% (wiersz 4).

Kolejnym krokiem badań, było ustalenie roli soli Cu(I) i zasady w odkrytej reakcji. Z przeprowadzonych eksperymentów wynikało, że obydwa reagenty są konieczne do jej przebiegu. Fakt, że konwersja jest ściśle skorelowana z ilością użytej soli miedzi sugeruje, że jej rolą jest ułatwienie odejścia liganda cyjankowego lub po prostu jego usunięcie. Usunięcie cyjanku z kationu prowadzić powinno do otrzymania soli witaminy B₁₂, np. akwakobalaminy, w której ligandem dla kobaltu jest cząsteczka wody. Taka wymiana liganda dla kobaltu w witaminie B₁₂ powoduje duże zmiany w widmie UV/Vis.

W wyniku reakcji B₁₂ i CuOAc w ilości równomolowej, nie zaobserwowałem tworzenia się akwakobalaminy, ani żadnych innych pochodnych witaminy B₁₂ (analizy UV/Vis, HPLC i MS). Dodatek zasady do mieszaniny reakcyjnej nie spowodował zmiany. Zatem samo wprowadzenie Cu(I) i zasady do roztworu witaminy B₁₂ nie jest w stanie usunąć liganda cyjankowego.

Kolejne eksperymenty zmierzające do ustalenia mechanizmu reakcji przeprowadziłem z użyciem chlorowodoru akwakobalaminy **187** (Schemat 3.29). Badania te miały na celu stwierdzenie, czy obecność miedzi jest konieczna do zajścia alkynyłowania kationu kobaltu w przypadku braku liganda cyjankowego (Tabela 3.20).



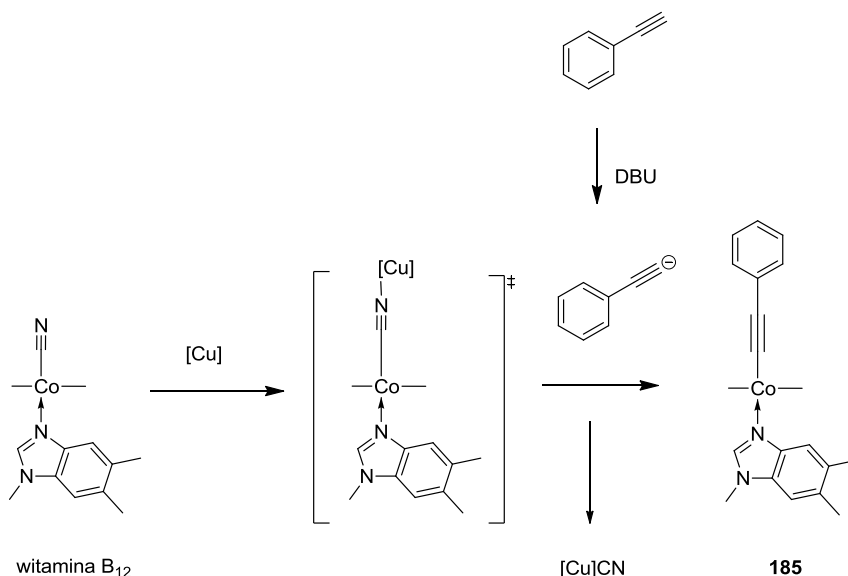
Schemat 3.29. Reakcja akwakobalaminy z fenyloacetylenem **5**

Tabela 3.20. Wpływ obecności Cu(I) na przebieg reakcji akwakobalaminy z fenyloacetylenem.^a

Lp	CuOAc	DBU	Konwersja [%] ^b
1	+	+	100
2	-	+	100
3	+	-	0
4	-	-	0

[a] Ogólne warunki reakcji: do roztworu akwakobalaminy (13 mg, 10 μ mol), fenyloacetyleny (10 μ l, 100 μ mmol) i CuOAc (1.2 mg, 10 μ mol) w DMA (0.2 ml) dodawano DBU (7 μ l, 50 μ mol), próbki analityczne pobrane były po 3h; [b] oszacowana na podstawie analizy HPLC.

Z przeprowadzonych badań jasno wynika, że w przypadku, kiedy kation kobaltu związany jest z bardzo labilnym ligandem, reakcja osiąga pełną konwersję wyłącznie w obecności zasady (Tabela 3.20, wiersz 2). W przypadku braku DBU, reakcja w ogóle nie zachodziła (wiersze 3 i 4). Oznacza to, że rolą zasady w badanej reakcji jest deprotonowanie fenyloacetyleny. Funkcją Cu(I) w reakcji z użyciem witaminy B₁₂ jest oddziaływanie z anionem cyjankowym umożliwiające atak nukleofilowy anionu fenyloacetyleny na elektrofilowy kation kobaltu (Schemat 3.30).



Schemat 3.30. Proponowany mechanizm reakcji witaminy B₁₂ z fenyloacetylenem w obecności soli Cu(I) i zasady.

Kompleksy, w których anion cyjankowy jest „mostkiem” pomiędzy kationami różnych metali (w tym miedzi) wchodzącymi w skład kompleksu, znane są w literaturze, a w niektórych przypadkach udało się je wydzielić i dokładnie scharakteryzować.¹³⁹ Możliwe jest, że w badanej reakcji mamy do czynienia z podobną sytuacją, jednak ustalenie dokładnej natury stanu

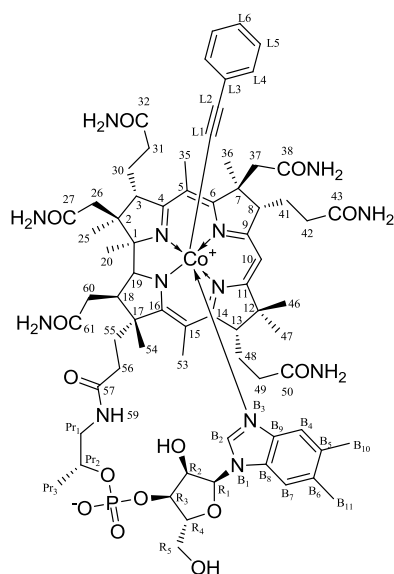
przejściowego tej reakcji wymagałoby przeprowadzenia szeroko zakrojonych badań fizykochemicznych.

3.3.3. Struktura i właściwości alkynylowej pochodnej witaminy B₁₂

Struktura pochodnej **185** określona została technikami NMR, spektrometrii mas wysokiej rozdzielczości oraz rentgenowskiej analizy strukturalnej.

W widmie mas związku **185** obecne są sygnały przy $m/z = 726.8$, 737.8 i 1452.6 odpowiadające masom jonów pseudomolekularnych odpowiednio $[M+H+Na]^{2+}$, $[M+2Na]^{2+}$ i $[M+Na]^+$. Dodatkowo, wysokorozdzielczy pomiar masy jonu $[M+Na]^+$ ($m/z = 1452.5931$) potwierdził stechiometrię związku **185** z dokładnością 0.1 ppm. W widmie IR zaobserwować można pasmo przy $\nu = 2123 \text{ cm}^{-1}$ potwierdzające obecność potrójnego wiązania węgiel-węgiel.

Wnikliwa analiza widm NMR (^1H , ^{13}C i widm korelacyjnych) zarejestrowanych w DMSO- d_6 pozwoliła na przypisanie prawie wszystkich sygnałów występujących zarówno w widmie ^1H NMR jak i ^{13}C NMR (Rysunek 3.10, Tabela 3.21).



Rysunek 3.10. Przyjęta numeracja pozycji w alkynylowej pochodnej **185**.

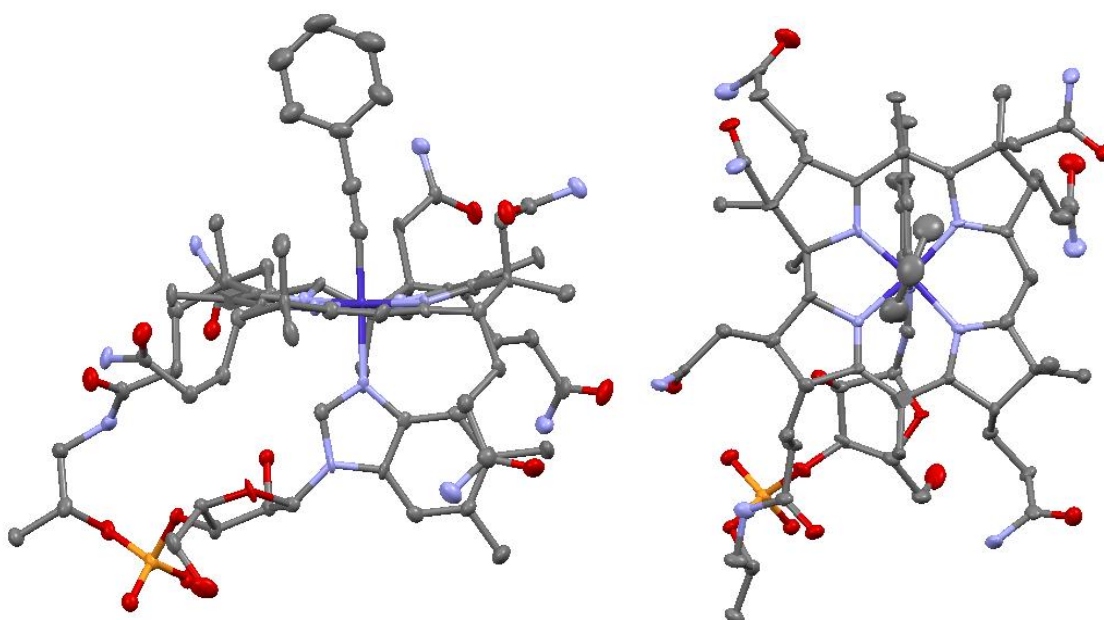
Jedynymi nieprzypisanymi sygnałami w widmie ^{13}C NMR pozostały sygnały pochodzące od atomów węgla grup amidowych. Podobnie jak w przypadku laktonu **186**, wśród sygnałów pochodzących od atomów węgla liganda alkynylowego nie obserwowalem rezonansu węgla L1 związanego z kationem kobaltu. Wszystkie pozostałe sygnały pochodzące od liganda były obecne, dobrze wydzielone i wykazywały charakterystyczne korelacje bliskiego i dalekiego zasięgu (wyróżnione w Tabeli 3.21 ciemniejszym kolorem). Wartości przesunięć chemicznych atomów węgla, z których zbudowany jest pierścień korynowy praktycznie nie uległy zmianie w porównaniu do tych otrzymanych dla witaminy B₁₂.

Tabela 3.21. Przypisanie sygnałów w widmach ^1H NMR i ^{13}C NMR związku **185** zarejestrowanych w DMSO-d_6 .

Przypisanie	^{13}C NMR [ppm]	Zaobserwowane korelacje		Przypisanie	^{13}C NMR [ppm]	Zaobserwowane korelacje	
		HSQC [ppm]	HMBC			HSQC [ppm]	HMBC
C4	178.3		C35	Pr2	71.1	4.08	Pr3
C16	176.9		C13, C54, C53	R2	69.7	3.88	
C11	174.1		C10, C13, C46, C47	R5	62.3	3.55	
	173.7			C7	58.7		C54, C60
	173.5			C3	55.1	4.58	C25, C26
C27, C32, C38, C43, C50, C57, C61	173.3			C8	53.9	3.74	C10, C36, C37
	173.2			C13	53.4	3.04	C46, C47, C49
	173.1			C7	50.3		C8, C36, C37, C10, C46, C47
C9	172.7		C8, C10	C12	47.6		
C27, C32, C38, C43, C50, C57, C6	171.8			C2	46.8		C20, C25
	171.5			Pr1	45.9	3.53, 2.44	Pr3
C6	164.9		C8, C35	C37	42.2	2.37, 1.73	C36
C14	164.3		C13, C53	C26	42.0	2.13	C25
B2	143.1	7.07		C18	38.3	2.70	C54
B9	137.3		B7, B2	C31	35.7	2.22	
B6	132.3		B4, B10	C49	34.2	2.35, 2.26	
B5	131.1		B7, B11	C60	32.5	2.44	C55
L4	130.7	6.72	L6	C42	32.4	1.55, 1.21	
B8	130.2		B2, B4	C55	31.8	2.38, 1.72	C54
L5	128.5	7.03		C46	31.6	0.94	C47
L3	127.3		L5	C56	30.3	2.63, 2.04	
L6	125.7	6.95	L4	C48	27.7	1.89, 1.54	C13, C49
B4	117.4	6.48	B11	C41	26.4	1.70, 0.94	C8, C42
B7	111.5	7.26	B10	C30	26.0	1.70, 1.64	C3, C31
C5	105.6		C35	Pr3	20.7	1.01	
C15	103.1		C53	B11	20.34	2.13	B7
L2	100.3		L4	B10	20.32	2.14	B4
C10	93.6	5.85		C20	20.2	0.29	
R1	85.24	6.24		C36	19.2	1.64	C41
C1	84.7		C3, C19, C20, C25	C54	16.9	1.16	
R4	81.7	3.87		C25	16.8	1.14	
R3	75.1	4.46	R2, R5	C35	16.1	2.43	
C19	74.8	4.21	C20	C53	15.4	2.36	

Przesunięcia chemiczne sygnałów pochodzących od pozostałych elementów struktury witaminy B₁₂ (benzimidazolu, pierścienia rybozy, grup acetamidowych, propionamidowych i metyloowych) również praktycznie nie uległy zmianie, zarówno w widmie ¹H NMR jak i ¹³C NMR.

Ostatecznym potwierdzeniem struktury alkynylowej pochodnej **185** było wykonanie rentgenowskiej analizy strukturalnej monokryształu uzyskanego przez dyfuzję par acetonu do wodnego roztworu **185** (Rysunek 3.11). Związek **185** krystalizuje w charakterystycznym dla witaminy B₁₂ i jej pochodnych układzie rombowym w grupie przestrzennej P2₁2₁2₁. Zastąpienie liganda cyjankowego fenyloalkynylowym nie spowodowało znaczących zmian strukturalnych w porównaniu do witaminy B₁₂. Ciekawy jest fakt, że wprowadzony ligand jest nieznacznie zgięty w kierunku pierścienia D koryny, kąt wiązania Co-C_{L1}-C_{L2} wynosi 173.22°.



Rysunek 3.11. Struktura krystaliczna alkynylowej pochodnej **185**.

Wysoka jakość uzyskanej analizy pozwoliła na porównanie charakterystycznych długości wiązań z danymi dla znanych metaloorganicznych pochodnych witaminy B₁₂ (Tabela 3.22).

Z przedstawionego porównania wynika, że w alkynylowej pochodnej **185** długości wiązań Co-L (wiersz 1) są zbliżone do tych zmierzonych dla witaminy B₁₂ (wiersz 6) i krótsze niż w odpowiednich pochodnych alkilowych, winylowych i arylowych, w których węgiel związany z kobaltem ma hybrydyzację inną niż sp. Różnica w długości wiązania Co-C_{L1} dla wszystkich diskutowanych związków, z wyjątkiem winylokobalaminay (wiersz 4), wynosi ok. 0.1 Å. W przypadku wiązania Co-N_{B3} różnica długości sięga nawet 0.2 Å (wiersze 1 i 3).

Tabla 3.22. Porównanie długości wybranych wiązań w metaloorganicznych pochodnych witaminy B₁₂.

L.p.	Pochodna witaminy B ₁₂	Długość wiązania Co-C [Å]	Długość wiązania Co-N _{B3} [Å]
1	Fenylotynylokobalamina 185	1.89	2.07
2	4-etylo-fenylkobalamina ¹³⁴	1.98	2.23
3	fenylowinylkobalamina ¹³⁷	2.00	2.28
4	winylokobalamina ¹³³	1.91	2.17
5	metylokobalamina ¹²³	1.99	2.19
6	cyjanokobalamina (witamina B ₁₂) ¹²³	1.86	2.01

Skracenie się wiązań kobaltu z aksjalnymi ligandami ma przełożenie na trwałość diskutowanych pochodnych. Pochodne zawierające podstawnik metylowy, winylowy i aryłowy opisane są jako związki nietrwałe, ulegające rozkładowi pod wpływem światła, podwyższonej temperatury i tlenu. W przypadku otrzymanej pochodnej alkynylowej **185**, w której omawiane wiązania uległy znacznemu skróceniu, wygląda to zupełnie inaczej.

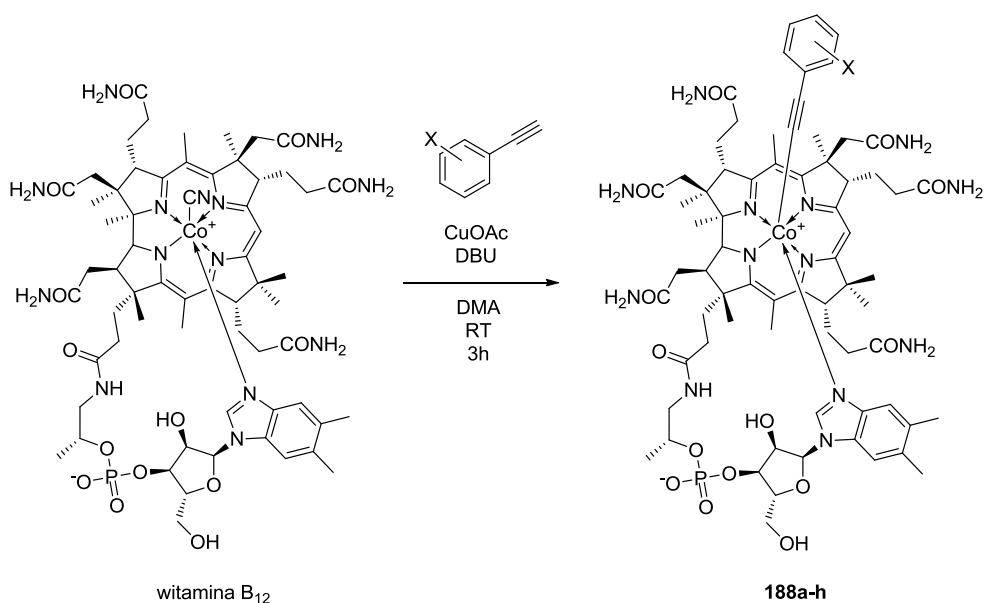
Przeprowadzone przeze mnie testy wykazały jego wysoką trwałość, niespotykaną wśród innych metaloorganicznych pochodnych witaminy B₁₂. Związek **185** ogrzewany w wodnym roztworze do temperatury wrzenia przez 24 h nie uległ rozkładowi. Podobnie, wodny roztwór związku **185** wystawiony na intensywne działanie światła słonecznego nie zmieniał swojego składu, nawet po kilku godzinach (analizy UV/VIS i HPLC). Ponadto jest on odporny na działanie słabych zasad i kwasów (w zakresie pH 4-12). W roztworach o pH poniżej 4 związek **185** ulega protonowaniu i rozkładowi, prawdopodobnie do akwakobalaminy (analiza UV/VIS). Zaskakująca dla mnie była odporność związku **185** na redukcję. Użycie odczynników stosowanych w chemii witaminy B₁₂ do redukcji centralnego kationu kobaltu (metaliczny cynk, mrówczan amonu, borowodorek sodu), w przypadku pochodnej **185** nie doprowadziły do zmiany stopnia utlenienia kobaltu i usunięcia liganda alkynylowego ze struktury.

3.3.4. Zakres i ograniczenia opracowanej metody alkynylowania witaminy B₁₂

Badania nad zakresem i ograniczeniami opracowanej metody rozpocząłem od przeprowadzenia serii reakcji z pochodnymi fenylacetylenu (Tabela 3.23) w warunkach uznanych przeze mnie za optymalne.

Reakcje przebiegały z doskonałymi wydajnościami, niezależnie od elektronowego charakteru podstawników w pierścieniu fenylowym. Pochodne fenyloacetyleny posiadające grupy silnie elektronoakceptorowe dawały wysokie wydajności odpowiednich produktów (wiersze 1-3), a udział niezidentyfikowanych produktów ubocznych w mieszaninach reakcyjnych był nieznaczny. Jedynym wyjątkiem była pochodna **188d**, posiadająca podstawnik –CN (wiersz 4). W reakcji tworzyła się dość znaczna ilość produktów ubocznych, jednak różnica w ich polarności względem pożądanej pochodnej nie powodowała problemów z wydzielaniem.

Tabela 3.23. Synteza aryloetynylowych pochodnych witaminy B₁₂.



L.p.	X	Nr. związku	Wydajność [%] ^a
1	4-NO ₂	188a	90
2	4-CF ₃	188b	70
3	2-CF ₃	188c	81
4	4-CN	188d	64
5	4-OMe	188e	80 ^b
6	2,4,6-tri-OMe	188f	0 ^c
7	4-etynyl	188g	70
8	4-Br	188h	71

[a] Wydajność wydzielonych związków; [b] pełna konwersja nastąpiła po 5 h; [c] skomplikowana mieszanina reakcyjna.

Położenie podstawnika w pierścieniu fenylovym nie miało większego wpływu na przebieg reakcji (wiersze 2 i 3), nawet *ortho* podstawiona pochodna dawała produkt **188c** z dobrą wydajnością. Obecność w pierścieniu fenylovym silnie elektronodonorowej grupy metoksylowej, spowodowała, że czas reakcji musiał być wydłużony (wiersz 5). Użycie pochodnej z trzema podstawnikami metoksyłowymi (wiersz 6) doprowadziło do powstania skomplikowanej mieszaniny reakcyjnej, w której trzy związki powstające w największych ilościach były najprawdopodobniej pożądaną pochodną oraz produktami laktonizacji i następczej hydrolizy. Wysoką wydajność uzyskałem również w reakcji z 1,4-dietynylobenzenem i 4-bromo-fenyloacetylenem (wiersze 6). Otrzymane pochodne **188g** i **188h**, zamierzałem użyć do badań nad możliwościami dalszej funkcjonalizacji tej klasy związków.

Stosując technikę dyfuzji par acetonu do wodnych roztworów związków **188a** i **188e** udało mi się otrzymać monokryształy, które poddane zostały rentgenowskiej analizie strukturalnej. Pozwoliło to na określenie wpływu właściwości elektronowych podstawników na długości wiązań aksjalnych ligandów oraz na inne elementy struktury (Tabela 3.24).

Tabela 3.24. Porównanie wybranych długości wiązań i kątów dla alkynylowych pochodnych witaminy B₁₂

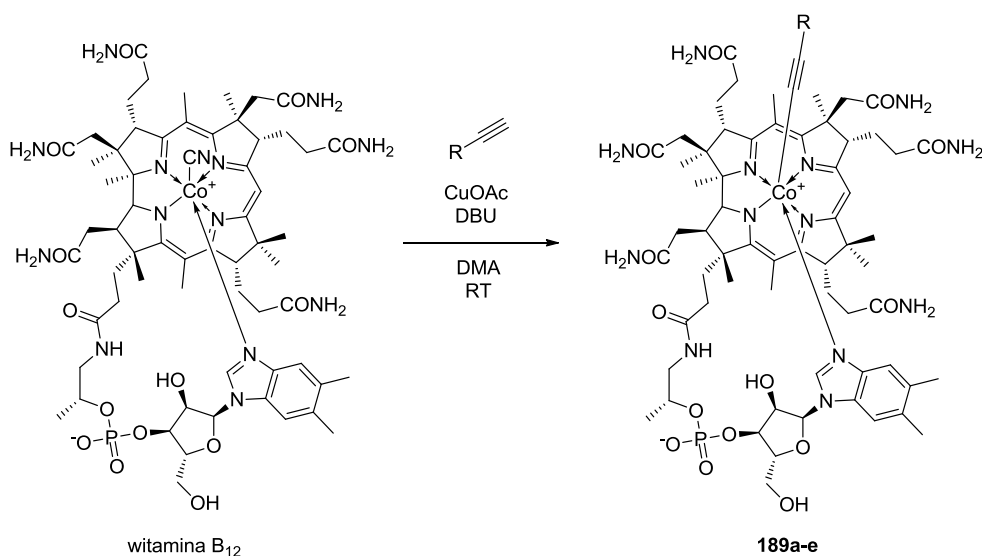
L.p.		Numer związku		
		188a	185	188e
1	Długość wiązania Co-C _{L1} [Å]	1.867	1.889	1.863
2	Długość wiązania Co-N _{B3} [Å]	2.058	2.068	2.079
3	Długość wiązania C _{L1} -C _{L2} [Å]	1.120	1.171	1.216
4	Kąt Co-C _{L1} -C _{L2} [°]	172.43	173.22	174.92
5	Kąt zgięcia pierścienia koryny [°]	20.26	17.68	18.31

Zarówno w przypadku pochodnej z podstawnikiem elektronodonorowym jak i elektroakceptorowym skróceniu uległo wiązanie Co-C (wiersz 1). W miarę wzrostu elektronodonorowych właściwości podstawnika w pierścieniu fenylovym wydłużeniu ulega wiązanie Co-N_{B3} (wiersz 2), wiązanie potrójne C≡C (wiersz 3) oraz rośnie kąt zgięcia podstawnika aryloalkynylowego w stronę pierścienia D koryny (wiersz 4). Kąt zgięcia pierścienia koryny (wiersz 5) dla pochodnej **188a**, jest największy spośród badanych związków i wynosi 20.26°. Dla dwóch pozostałych pochodnych jest on zbliżony do wartości wyznaczonej dla witaminy B₁₂ (18.0°).¹²³

Zmiany strukturalne, szczególnie skrócenie wiązań Co-N_{B3} i C_{L1}-C_{L2} w pochodnej **188a** zawierającej ligand 4-nitrofenyloacetylenowy oraz wydłużenie w pochodnej **188e** z ligandem 4-metoksyfenyloacetylenowym, mają wpływ na właściwości fizykochemiczne otrzymanych kompleksów. Związek **188a** jest odporny na działanie wysokiej temperatury i światła, podobnie jak **185**. Jednak jest znacznie odporniejszy na działanie kwasów, ponieważ protonowaniu i rozkładowi ulega dopiero w roztworze o pH ≈ 1.0. Z kolei związek **188e** jest odporny na działanie światła, lecz pod wpływem ogrzewania w roztworze wodnym rozkłada się w czasie krótszym niż 2h. Ponadto jest on znacznie bardziej wrażliwy na działanie kwasów, rozkładając się w pH ≈ 5.5.

Wiedząc, że opracowana reakcja jest ogólna i bardzo efektywna dla pochodnych fenylacetyleny, postanowiłem sprawdzić, czy proste alkiiny alifatyczne również mogą znaleźć zastosowanie w alkynylowaniu witaminy B₁₂ (Tabela 3.25).

Tabela 3.25. Zastosowanie alkinów alifatycznych w reakcji alkynylowania witaminy B₁₂.



L.p.	Alkin	Nr. związku	Wydajność [%] ^a
1		189a	0 ^b
2		189b	52
3		189c	53 ^c
4		189d	0 ^d
5		189e	85

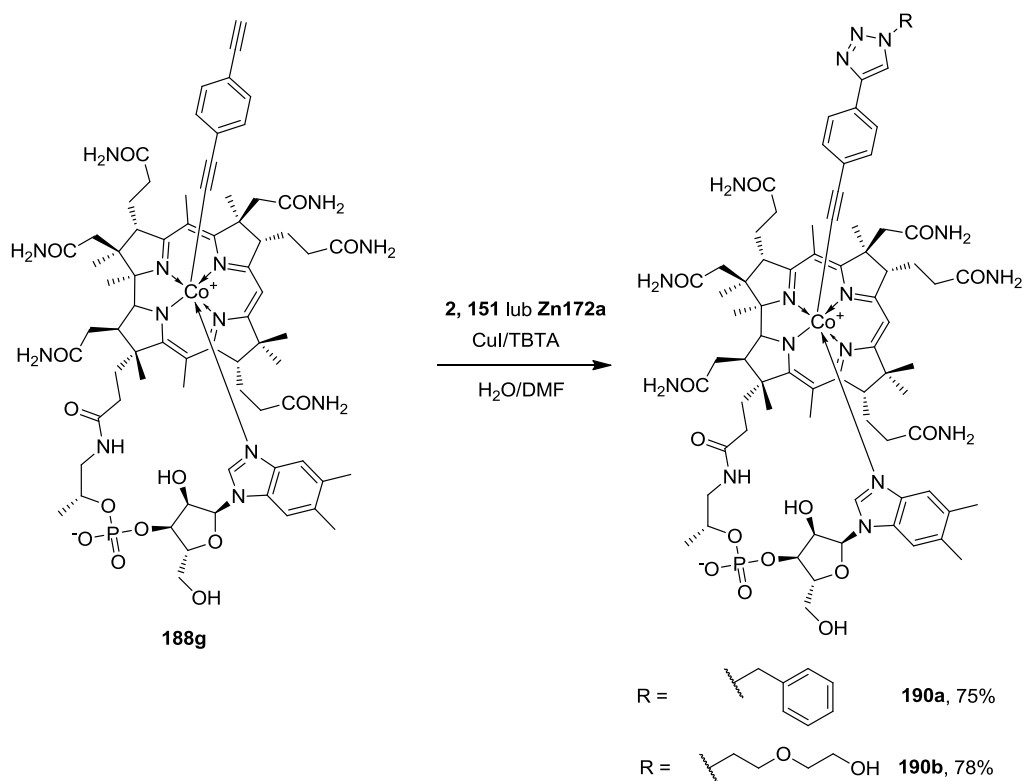
[a] Wydajność wydzielonych związków; [b] brak konwersji; [c] konwersja niepełna po 24h; [d] reakcja nieselektywna.

W reakcji z 1-heksynem (Tabela 3.25, wiersz 1) nie zaobserwowałem w ogóle tworzenia się pożądanego produktu **189a**, nawet po 24 h. Zastosowanie alkoholu propargilowego (wiersz 2) dało odpowiedni produkt alkynylowania **189b** z umiarkowaną wydajnością 52%. Podobną wydajność otrzymałem w reakcji z 2-metylo-3-butyn-2-olem (wiersz 3), chociaż reakcja przebiegała bardzo powoli, prawdopodobnie z powodu zatłoczenia sterycznego. Kwas acetylenokarboksylowy (wiersz 4) reagował bardzo nieselektywnie, dając skomplikowaną mieszaninę związków, w której dominował produkt alkynylowania z następczym zamknięciem laktonu (analiza MS surowej mieszaniny poreakcyjnej). Duża ilość produktów ubocznych oraz zmiany jej składu w czasie spowodowane nieokreślonymi równowagami uniemożliwiły wydzielenie produktu. Szczęśliwie, ester kwasu acetylenokarboksylowego reagował selektywnie i odpowiedni produkt **189e** udało mi się otrzymać z wysoką wydajnością 85% (wiersz 5). Zastosowanie estru 2-trimetylosylo-etanolu znacznie obniżyło polarność związku **189e** w porównaniu do witaminy B₁₂, co bardzo ułatwiło jego wydzielenie. Z przeprowadzonych badań wynika, że można otrzymać odpowiednie alkynyłowe pochodne z podstawnikami alifatycznymi, choć niewątpliwie są to trudne substraty w tej reakcji.

3.4.5. Zastosowanie alkynyłowanych pochodnych witaminy B₁₂ w reakcji CuAAC.

Opracowana metoda alkynyłowania kationu kobaltu pochodnymi fenyloacetyleny w witaminie B₁₂ okazała się ogólna, wydajna i praktyczna. Postanowiłem więc wykazać użyteczność otrzymanych związków w otrzymywaniu zfunkcjonalizowanych pochodnych witaminy B₁₂. W tym celu otrzymałem pochodną **188g** posiadającą w swojej strukturze terminalny alkin, mając nadzieję, że będzie możliwe użycie jej jako substratu w CuAAC. Zastosowanie katalizatora CuI/TBTA w mieszaninie woda/DMF, warunków, które okazały się doskonale dla wcześniej opracowanej azydkowej pochodnej witaminy B₁₂ **181**, pozwoliło na selektywne otrzymanie cykloadduktów **190** w reakcji pochodnej **188g** z azydkiem benzylu **2** i 2-(2-azydoetoksy)etanolem **151** z wydajnościami odpowiednio 75 i 78 % (Schemat 3.31).

Próba otrzymania połączenia pochodnej **188g** z azydkową pochodną PpIX **Zn172a** nie powiodła się (schemat 3.31). Niestety, produkty były skrajnie nierozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych, co uniemożliwiło analizę składu mieszaniny poreakcyjnej.



Schemat 3.31. Zastosowanie pochodnej **188g** w reakcji CuAAC.

3.4.6. Podsumowanie

W toku przedstawionych badań opracowałem ogólną metodę wprowadzania liganda alkynylowego na kation kobaltu witaminy B₁₂. Według mojej wiedzy, jest to pierwsza ogólna metoda syntezy metaloorganicznych pochodnych witaminy B₁₂ niewymagająca redukcji kationu kobaltu w celu wprowadzenia liganda węglowego. Przedstawiona metoda nie wymaga stosowania warunków bezwodnych i beztlenowych, jest bardzo wydajna dla pochodnych fenylacetenu i umiarkowanie wydajna dla alkinów z podstawnikiem alifatycznym.

W trakcie przygotowywania artykułu opisującego część przedstawionych wyżej wyników, ukazał się artykuł opisujący syntezę pochodnej **185**, jednak strategia zastosowana przez autorów opierała się na utartych metodach redukcji i następczej reakcji rodnikowej.¹⁴⁰ Wydajność ich syntezy (64%) była znacznie niższa niż otrzymana przeze mnie (85%), a zastosowana metoda z pewnością nie może być nazwana prostą i ogólną, co utwierdziło mnie w przekonaniu o wyjątkowości otrzymanych wyników.

Otrzymane przeze mnie związki stanowią nową klasę trwałych metaloorganicznych pochodnych witaminy B₁₂, które otwierają nowe możliwości w chemii i być może biologii tej niezwyklej cząsteczki.

„Zupełnie się do tego nie nadajesz. Oj, nie będzie z ciebie chemik...”

Mgr Bożena Nowak do M.Ch.,
lekcja chemii. L.O. im. M.Kopernika w Ostrowi Maz., wrzesień 1999

4. Podsumowanie i wnioski

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej znacznie wzbogacają arsenał dostępnych metod modyfikacji naturalnych związków tetrapirolowych oraz mogą doprowadzić do głębszego poznania ich aktywności biologicznej, w szczególności w kontekście ich oddziaływań z cyklazą guanylową.

W toku przeprowadzonych badań zaprojektowałem i otrzymałem serię pochodnych kwasu kobyrinowego i protoporfiryny IX z grupą azydkową i terminalnym alkinem. Następnie opracowałem metodę ich łączenia na drodze katalizowanej solami miedzi(I) 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydku do alkinu (CuAAC). Stosując opracowane warunki otrzymałem bibliotekę związków hybrydowych, w których jednostki koryny i PpIX oddzielone były od siebie łącznikami o różnej długości łańcucha. Badania biologiczne przeprowadzone dla otrzymanych związków wykazały, że są one dobrymi aktywatorami sGC, których aktywność silnie zależy od długości i struktury łącznika pomiędzy farmakoforami. Potwierdzone zostało również wstępne założenie, że zaprojektowane związki hybrydowe aktywują sGC jednocześnie oddziałując z domeną katalityczną i regulatorową tego enzymu.

Badania prowadzone przeze mnie w obszarze rozwoju metod funkcjonalizacji związków tetrapirolowych, doprowadziły do opracowania warunków prowadzenia CuAAC na porfirynach w formie wolnej zasady, w których nie występuje problem insercji miedzi do luki makrocyklicznej porfiryny. Opracowana metoda jest ogólna i wydajna, zarówno dla syntetycznych porfiryn podstawionych w pozycji *mezo* jak i pochodnych naturalnej protoporfiryny IX. Dodatkowo, po raz pierwszy, wykazałem możliwość zastosowania katalizy rutenem do efektywnej funkcjonalizacji porfiryn na drodze AAC, reakcji będącej komplementarnym uzupełnieniem CuAAC. Opracowane rozwiązania mogą stać się dobrą alternatywą dla dotychczas stosowanych metod.

Za ważne osiągnięcie uważam opracowanie praktycznych metod otrzymywania całkowicie nowych pochodnych witaminy B₁₂ oraz sposobów ich funkcjonalizacji na drodze CuAAC. Pierwsze podejście polega na przekształceniu pierwszorzędowej grupy hydroksylowej znajdującej się w strukturze B₁₂ w mesylan z następczym podstawieniem anionem azydkowym. Synteza azydkowej pochodnej witaminy B₁₂ może być przeprowadzona w dużej (jak na chemię witaminy B₁₂) skali bez oczyszczania technikami chromatograficznymi. Azydkowa pochodna jest

aktywna w reakcji CuAAC, co jest doskonałym uzupełnieniem dotychczas stosowanych metod łączenia pochodnych witaminy B₁₂ w pozycji 5².

Szczególnym sukcesem było odkrycie i zoptymalizowanie ogólnej metody syntezy oraz scharakteryzowanie nowej klasy metaloorganicznych pochodnych witaminy B₁₂. W toku badań odkryłem, że w bezpośredniej reakcji witaminy B₁₂ z terminalnymi alkinami prowadzonej w obecności soli Cu(I) i zasady następuje selektywne alkynyłowanie kationu kobaltu. W porównaniu z dotychczas znanymi pochodnymi B₁₂ posiadającymi wiązanie Co-C, pochodne alkynyłowe są niezwykle trwałe, nie rozkładają się pod wpływem światła ani, w większości przypadków, pod wpływem ogrzewania. Opracowana metoda jest pierwszym przykładem ogólnej syntezy metaloorganicznych pochodnych witaminy B₁₂, niewymagającym redukcji kationu kobaltu.

Reasumując, wyniki uzyskane przeze mnie w ramach pracy doktorskiej znacznie poszerzają dotychczasowy stan wiedzy na temat chemii i biologii protoporfiryny IX i pochodnych witaminy B₁₂. Otrzymane przeze mnie pochodne będące hybrydami pochodnych kwasu kobyrynowego i PpIX mogą przyczynić się do poznania mechanizmów aktywacji sGC, a opracowane przeze mnie sposoby modyfikacji witaminy B₁₂ należą do najselektywniejszych i najłatwiejszych do przeprowadzenia.

„W zajmującym ogromną winiarską piwnicę alchemicznym laboratorium praca nie ustawała, zawsze coś się działo, czy to w świętek, czy w piątek, czy w niedzielę. Nigdy nie wygaszały piece i atanory, grzejąc niemilosiernie, co dało się cenić zwłaszcza porą zimową, a także latem, jeśli zdarzyło się zimne. W atanorach dokonywały się kalcynacja i wyżarzanie, najrozmaitsze substancje przechodziły od fazy albedo do fazy nigredo, wydzielając przy przechodzeniu okropny smród. W kolbach ciegiem coś się filtrowało, destylowało względnie ekstrahowało, czemu towarzyszyły burzliwe eferwescencje i smród jeszcze straszniejszy. W wielkich aludelach kwasy działały na metale, po czym metale nieszlachetne transmutowały w szlachetne, z lepszym lub gorszym efektem. Bulgotał w tyglach merkuriusz, czyli argentum vivin, topiła się w kupelach siarka, wydzielala w retortach nitra i osadzała sól, a wyciewy wyciskały łzy z oczu. Coś tam się rozpuszczało, coś koagulowało, a coś sublimowało, pryskał na wsze strony kwas, wypalając dziurki na stolach...”

Andrzej Sapkowski, „Boży bojownicy”

5. Część eksperymentalna.

5.1. Informacje ogólne

- Handlowo dostępne odczynniki używane były bez dodatkowego oczyszczania.
- Rozpuszczalniki do preparatywnej chromatografii kolumnowej były destylowane przed użyciem.
- Bezwodne i beztlenowe rozpuszczalniki (DCM, Toluen, DCE, DMF, THF) suszone były według standardowych procedur.¹⁴¹
- Chromatografia cienkowarstwowa wykonywana była na płytkach aluminiowych pokrytych warstwą żelu krzemionkowego Silica Gel GF254 (0.20 mm).
- Chromatografia kolumnowa wykonywana była przy użyciu żelu Kiesgel 60, 230-400 mesh (Merck).
- Chromatograficzne oczyszczanie związków hybrydowych typu **177** wykonywane było na żelu krzemionkowym Kiesgel 60, 200 mesh (Macherey-Nagel).
- Preparatywna chromatografia kolumnowa na odwróconych fazach wykonywana była przy użyciu żelu Silica Gel 90 C18 (Fluka) i rozpuszczalników klasy HPLC.
- Widma NMR rejestrowane były na aparatach Varian 500, widma korelacyjne rejestrowane były na aparacie Varian 600. Widma rejestrowane były w temperaturze pokojowej, chyba, że zaznaczono inaczej. Przesunięcia chemiczne podane są w ppm z użyciem TMS lub resztkowych sygnałów rozpuszczalników jako wzorców wewnętrznych.
- Widma w podczerwieni zarejestrowano wykorzystując aparat Perkin-Elmer 1640 FT-IR.
- Widma UV-Vis zarejestrowano wykorzystując aparat Jenway 7315.

- Widma spektrometrii mas (MS) oraz wysokorozdzielczej spektrometrii mas (HR MS) zostały wykonane na aparatach 4000 Q-TRAP (Applied Biosystems) i SYNAPT G2-S HDMS (Waters) wykorzystując ESI jako technikę jonizacji.
- Analizy HPLC wykonywane były na aparacie Knauer z zastosowaniem kolumny Eurospher II 100-5 C18 250 mm x 4.6 mm z prekolumnną i detekcji UV/VIS przy $\lambda = 361$ nm.

Warunki pomiaru dla eksperymentów opisanych w rozdziale 3.3:

Przepływ: 1ml/min, ciśnienie 9.6 MPa, T = 30 °C.

Program:

Czas [min]	H ₂ O [%]	MeCN [%]
początkowy	99	1
10	80	20
20	80	20
30	30	70

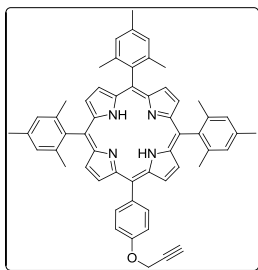
Warunki pomiaru dla eksperymentów opisanych w rozdziale 3.4:

Przepływ: 1ml/min, ciśnienie 9.6 MPa, T = 30 °C.

Program:

Czas [min]	H ₂ O [%]	MeCN [%]
początkowy	99	1
15	30	70
30	30	70

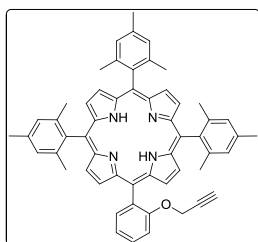
5.2. Opisy syntezy i charakterystyka nowych związków



Porfiryna 145a. Otrzymana według z procedury literaturowej.¹⁰⁶

Wydajność 11%. **HRMS ESI**, (m/z): obliczono dla $C_{56}H_{50}N_4O$ $[M+H]^+$ 795.4057; otrzymano 795.4061. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 642(3.89×10^3), 594(4.47×10^3), 548(8.71×10^3), 511(1.07×10^4), 445(2.04×10^4), 418(2.82×10^5). **1H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 8.80 (d, $J = 4.7$, 2H), 8.70 (s, 1H), 8.67 (d, $J = 4.7$ Hz, 2H), 8.63 (s, 4H),

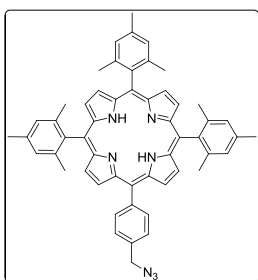
8.12 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.33 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.27 (s, 4H), 7.22 (s, 1H), 4.95 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H), 2.66 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H), 2.61 (s, 6H), 2.60 (s, 3H), 1.86 (5H s), 1.85 (s, 10H), 1.84 (s, 3H), -2.54 (s, 2H). **^{13}C NMR** (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 157.4, 149.8, 139.44, 139.3, 138.4, 138.2, 137.6, 137.4, 135.4, 132.1, 131.1, 127.7, 127.6, 118.8, 117.9, 117.6, 113.1, 112.9, 78.7, 75.81, 75.76, 56.2, 38.7, 35.4, 34.7, 26.9, 21.73, 21.67, 21.5.



Porfiryna 145b. Otrzymana według z procedury literaturowej.¹⁰⁶

Wydajność: 10%. **HRMS ESI**, (m/z): obliczono dla $C_{56}H_{50}N_4O$ $[M+H]^+$ 795.4057; otrzymano 795.4053. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 642(5.37×10^3), 594(3.24×10^3), 548(6.61×10^3), 511(9.77×10^3), 445(1.62×10^4), 418(3.02×10^5). **1H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

8.73 (d, $J = 4.6$ Hz, 2H), 8.64 (m, 2H), 8.62 (s, 4H), 8.01 (dd, $J = 1.5$, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.75 (m, 1H), 7.48 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.38 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.21 (s, 1H), 4.40 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H), 2.61 (s, 9H), 2.28 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H), 1.87 (s, 3H), 1.86 (s, 3H), 1.85 (s, 3H), 1.83 (s, 3H), -2.52 (s, 2H). **^{13}C NMR** (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 157.2, 139.51, 139.48, 139.46, 139.4, 138.4, 138.3, 137.6, 136.0, 131.8, 129.6, 127.7, 120.5, 117.8, 117.7, 114.6, 113.2, 78.7, 75.2, 56.2, 21.73, 21.70, 21.5.

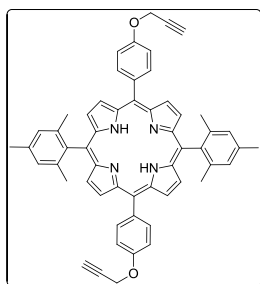


Porfiryna 146a. 5-*p*-(Bromometylo)fenylo-10,15,20-trimezityloporfiryne (**145c**) (320 mg, 0.38 mmol) i azydek sodu (200 mg, 22 mmol) roztworzono w mieszaninie DCM/woda (100 ml, 1/1 v/v). Do mieszaniny dodano wodorosiarczan tetrabutylamoniowy (42 mg, 0.13 mmol). Dwufazową mieszaninę reakcyjną mieszano intensywnie w temperaturze pokojowej przez 18 h. Fazę wodną oddzielono, fazę organiczną przemyto 3 razy wodą, suszono Na_2SO_4 i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem.

Produkt wydzielono techniką chromatografii kolumnowej stosując jako eluent mieszaninę DCM/heksan (1/4 v/v). **Wydajność** 230 mg, 76% .

HRMS ESI, (m/z): obliczono dla $C_{54}H_{50}N_7$ $[M+H]^+$ 796.4122; otrzymano 796.4108. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 643(4.47×10^5), 591(6.76×10^3), 548(9.55×10^3), 516(1.62×10^4),

418(4.07x10⁵). ¹H NMR (500 MHz; CDCl₃), δ (ppm): 8.74 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H), 8.68 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H), 8.63 (s, 4H), 8.21 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.66 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.27 (s, 4H), 7.24 (s, 2H), 4.66 (s, 2H), 2.62 (s, 6H), 2.61 (s, 3H), 1.85 (s, 6H), 1.84 (s, 12H), -2.56 (s, 2H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 149.8, 142.3, 141.5, 139.4, 139.3, 138.3, 138.1, 137.7, 134.7, 130.5, 127.7, 126.5, 118.3, 118.0, 117.8, 105.6, 88.0, 80.7, 66.2, 54.9, 52.7, 21.7, 20.5.



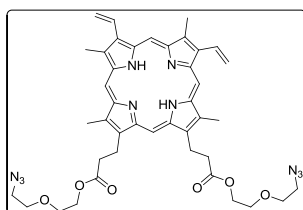
Porfiryra 148. Otrzymana według procedury literaturowej.¹¹⁰

Wydajność: 29%. **HRMS ESI**, (*m/z*): obliczono dla C₅₆H₄₇N₄O₂ [M+H]⁺ 807.3693; otrzymano 807.3701. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ε, L·mol⁻¹·cm⁻¹): 646(6.31 x10³), 596(6.92x10³), 588(6.92 x10³), 548(1.05 x10⁴), 516(1.74x10⁴), 446(2.34x10⁴), 419(3.89x10⁵). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.81 (d, *J* = 4.8 Hz, 4H), 8.68 (d, *J* = 4.2 Hz, 4H), 8.14

(d, *J* = 8.2 Hz, 4H), 7.33 (d, *J* = 8.5 Hz, 4H), 7.27 (s, 4H), 7.22 (s, 1H), 4.94 (d, *J* = 2.1 Hz, 4H), 2.66 (s, 2H), 2.62 (s, 6H), 1.84 (s, 12H), -2.54 (s, 2H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 157.4, 139.4, 138.5, 137.7, 135.5, 135.3, 127.8, 118.8, 118.2, 113.2, 78.7, 75.8, 56.2, 21.6, 21.5.

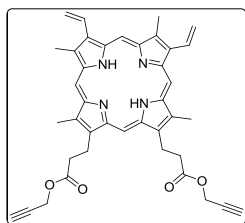
Ogólna procedura syntezy pochodnych PpIX 149 i 150.

Protoporfirynę IX (1 Eq) rozтворzono w atmosferze argonu w bezwodnym DMF (0.05 M). Otrzymany roztwór schłodzony do 0 °C i dodano EDC (6 Eq) i DMAP (6 Eq) w jednej porcji. Do mieszaniny reakcyjnej dodawano roztwór odpowiedniego alkoholu lub aminy (5 Eq) w DMF (0.1 M) utrzymując temperaturę łaźni chłodzącej poniżej 0 °C. Po dodaniu całości i ogrzaniu się mieszaniny reakcyjnej do temperatury pokojowej mieszano przez noc. Mieszaninę reakcyjną wlało do nasyconego roztworu NH₄Cl i ekstrahowano 3 razy DCM. Zebrane fazy organiczne przemyto 3 razy wodą, suszono Na₂SO₄ i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono techniką chromatografii kolumnowej stosując jako eluent mieszaninę MeOH/DCM (1-5% v/v). Frakcje zawierające produkt odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozpuszczono w DCM, wytrącono pentanem, odwirowano i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 50 °C.



Porfiryra 149 **Wydajność:** 93%. **HRMS ESI**, (*m/z*): obliczono dla C₄₂H₄₈N₁₀O₆Na [M+Na]⁺ 811.3650; otrzymano 811.3612. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ε, L·mol⁻¹·cm⁻¹): 667.7(6.03 x10²), 629.9(5.01 x10³), 575.2(6.61 x10³), 540.4(1.10 x10³), 505.0(1.32 x10⁴), 406.2(1.55 x10⁵). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 9.89 (s, 1H), 9.85 (s, 1H), 9.80 (s, 1H), 9.74 (s, 1H), 8.1-8.2 (m, 2H), 6.28 (dd, *J* = 0.8, *J* = 17.7 Hz, 1H), 6.26 (dd, *J* = 1.0, *J* = 17.8 Hz, 1H), 6.11 (dd, *J* = 1.2, *J* = 11.2 Hz, 2H), 4.28-4.34 (m, 4H), 4.12-

4.15 (m, 4H), 3.53(s, 3H), 3.51 (s, 3H), 3.49 (s, 3H), 3.27-3.30 (m, 4H), 3.22-3.26 (m, 4H), 2.95-2.98 (m, 4H), 2.62-2.66 (m, 4H), -4.32 (s, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 173.1, 138.2, 136.6, 130.2, 120.6, 97.6, 97.1, 96.8, 96.0, 69.5, 68.8, 63.4, 53.4, 50.0, 36.9, 21.7, 11.6.

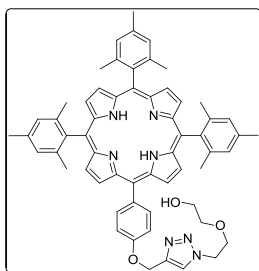


Porfiryra 150 Wydajność: 78%. **HRMS ESI**, (m/z): obliczono dla $\text{C}_{40}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 639.2966; otrzymano 639.2994. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): 630.0(4.37×10^3), 575.3(6.03×10^3), 540.3(9.77×10^3), 505.1(1.17×10^4), 406.2(1.35×10^5). **^1H NMR** (500 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 10.08 (s, 1H), 10.06 (s, 1H), 9.95 (s, 1H), 9.94 (s, 1H), 8.20-8.30 (m, 2H), 6.43 (d, $J = 18.0$ Hz, 2H), 6.16 (d, $J = 11.2$ Hz, 2H), 4.68 (s, 4H), 4.30-4.40 (m, 4H), 3.60-3.70 (m, 12H), 3.30 (t, $J = 7.7$ Hz, 4H), 2.30 (s, 2H), -3.92 (2H, s). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 172.2, 130.4, 120.8, 98.0, 97.4, 97.1, 96.1, 77.6, 74.9, 58.5, 51.1, 36.7, 29.7, 21.6, 12.7, 11.7..

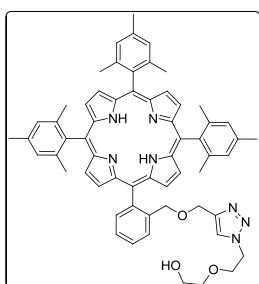
Ogólna procedura CuAAC katalizowanej $[\text{Cu}(\text{Phen})(\text{PPh}_3)_2]\text{NO}_3$

Metoda A: Porfirybę (1.0 Eq), odpowiedni azydek lub alkin (1.5 Eq) i $[\text{Cu}(\text{Phen})(\text{PPh}_3)_2]\text{NO}_3$ (0.1 Eq) umieszczano w atmosferze argonu w próbówce ciśnieniowej z kranem Rotaflo. Dodano bezwodny toluen (0.125 M) i mieszano w temperaturze pokojowej. Postęp reakcji monitorowano techniką TLC. Po stwierdzeniu całkowitej konsumpcji substratu porfiryńowego mieszaninę poreakcyjną odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielano techniką chromatografii kolumnowej stosując jako eluent mieszaninę MeOH/DCM (0-3%). Frakcje zawierające produkt odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 50°C .

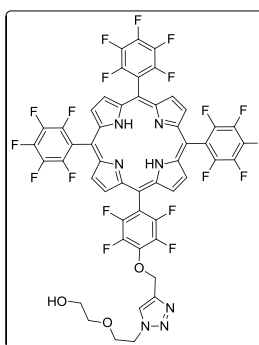
Metoda B: Porfirybę (1.0 Eq), odpowiedni azydek lub alkin (1.5 Eq) i $[\text{Cu}(\text{Phen})(\text{PPh}_3)_2]\text{NO}_3$ (0.1 Eq) umieszczano w atmosferze argonu w próbówce ciśnieniowej z kranem Rotaflo. Dodano bezwodny DCE (0.125 M), wstawiano do łaźni olejowej, ogrzanej wcześniej do temperatury 50°C i mieszano. Postęp reakcji monitorowano techniką TLC. Po stwierdzeniu całkowitej konsumpcji substratu porfiryńowego mieszaninę poreakcyjną odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielano techniką chromatografii kolumnowej stosując jako eluent mieszaninę MeOH/DCM (0-3%). Frakcje zawierające produkt odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 50°C .



Porfiryna 152. Otrzymano według metody B, czas prowadzenia reakcji 2 h. Wydajność: 96%. **Analiza elementarna** (%) obliczona dla $C_{60}H_{59}N_7O_3 + H_2O$: C 76.33, H 6.51, N 10.38; otrzymano C 76.03, H 6.92, N 9.97. **MS ESI**, (m/z): obliczono dla $C_{60}H_{59}N_7O_3 [M + H]^+$ 926.5; otrzymano 926.6. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 647 (2.63×10^3), 591 (3.80×10^3), 549 (5.89×10^3), 515 (1.23×10^4), 419 (3.24×10^5). **1H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 8.79 (d, $J = 4.7$ Hz, 2H), 8.67 (d, $J = 4.7$ Hz, 2H), 8.62 (s, 4H), 8.11 (m, 2H), 7.92 (s, 1H), 7.35 (m, 2H), 7.27 (bs, 4H), 7.24 (s, 2H), 5.45 (s, 2H), 4.63 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H), 3.95 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H), 3.75 (bt, $J = 4.1$ Hz, 2H), 3.62 (t, $J = 4.3$ Hz, 2H), 2.62 (d, $J = 3.4$ Hz, 9H), 1.95 (bs, 1H), 1.85 (d, $J = 3.3$ Hz, 18H), -2.50 (s, 2H). **^{13}C NMR** (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 157.6, 143.8, 139.0, 138.0, 137.7, 137.2, 135.0, 134.7, 130.0, 127.3, 123.5, 118.4, 117.4, 117.1, 112.5, 72.1, 69.0, 61.9, 61.3, 50.0, 21.3, 21.2, 21.0.

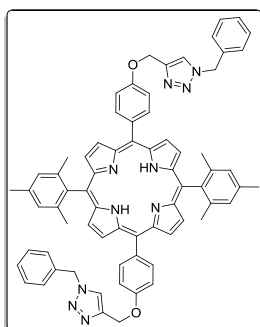


Porfiryna 153. Otrzymano według metody B, czas prowadzenia reakcji 2 h. Wydajność: 90%. **Analiza elementarna** (%) obliczona dla $C_{60}H_{59}N_7O_3$: C 77.81, H 6.55, N 9.66; otrzymano C 75.55, H 6.71, N 9.89. **MS ESI**, (m/z): obliczono dla $C_{60}H_{59}N_7O_3 [M + H]^+$ 926.5; otrzymano 926.5. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 646 (2.88×10^3), 593 (4.57×10^3), 547 (6.61×10^3), 513 (1.58×10^4), 418 (3.47×10^5). **1H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 8.75 (d, $J = 4.7$ Hz, 2H), 8.64 (m, 6H), 7.99 (dd, $J = 7.3$, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.75-7.79 (m, 1H), 7.65-7.69 (m, 1H), 7.44-7.49 (m, 2H), 7.37 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.27 (bs, 4H), 7.24 (s, 2H), 6.09 (s, 1H), 5.18 (s, 2H), 3.73 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 3.02 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 2.62 (bs, 9H), 2.41 (bs, 1H), 3.26 (t, $J = 4.6$ Hz, 2H), 1.82-1.87 (m, 18H), -2.57 (s, 2H). **^{13}C NMR** (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 157.9, 144.2, 139.4, 139.2, 138.1, 137.8, 136.0, 132.1, 131.9, 131.2, 130.0, 128.5, 127.8, 122.5, 120.2, 117.8, 115.2, 112.5, 71.1, 68.3, 63.2, 59.8, 49.4, 29.7, 21.6.

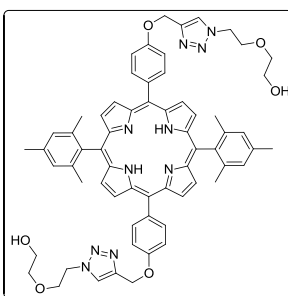


Porfiryna 155. Otrzymano według metody A, czas prowadzenia reakcji 5 h. Wydajność: 70%. **Analiza elementarna** (%) obliczona dla $C_{51}H_{22}F_{19}N_7O_3 + H_2O$: C 52.82, H 2.09, N 8.45; otrzymano C 52.96, H 1.78, N 8.36. **MS ESI**, (m/z): obliczono dla $C_{51}H_{22}F_{19}N_7O_3 [M + H]^+$ 1142.3; otrzymano 1142.5. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 637 (4.17×10^2), 582 (2.95×10^3), 535 (2.19×10^3), 506 (8.91×10^3), 411 (1.48×10^5). **1H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 8.95 (d, $J = 4.3$ Hz, 2H), 8.91 (bs, 6H), 8.08 (s, 1H), 5.74 (s, 2H), 4.69 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H), 3.97 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H), 3.76 (bt, $J = 4.2$ Hz, 2H), 3.62 (t, $J = 4.3$ Hz, 2H), 1.91 (bs, 1H), -2.91 (2H, s). **^{13}C NMR** (125

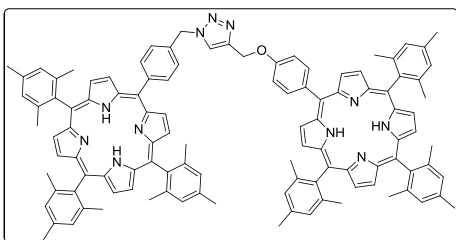
MHz, CDCl₃), δ (ppm): 148.3, 147.5, 145.6, 143.3, 142.9, 142.4, 141.2, 140.2, 138.6, 137.9, 137.6, 136.5, 124.8, 115.6 (t, $J = 20.8$ Hz), 114.5, 104.8, 103.5, 72.6, 69.3, 68.0, 61.7, 50.5.



Porfiryra 156. Otrzymano według metody B, czas prowadzenia reakcji 2 h. Wydajność: 99%. **MS ESI**, (m/z): obliczono dla C₁₇H₆₁N₁₀O₂ [M+H]⁺ 1073.5, otrzymano 1073.5. **UV/Vis** (DCM), λ_{\max} (nm) (ϵ , L·mol⁻¹·cm⁻¹): 650 (1.38 x10²), 593 (1.62 x10³), 551 (2.19 x10³), 517 (9.77 x10³), 419 (1.58 x10⁵). **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.79 (d, $J = 4.6$ Hz, 4H), 8.68 (d, $J = 4.6$ Hz, 4H), 8.10 (d, $J = 8.1$ Hz, 4H), 7.65 (s, 2H), 7.33-7.42 (m, 6H), 7.31 (s, 4H), 7.30 (s, 4H), 7.26 (s, 4H), 5.56 (s, 4H), 5.39 (s, 4H), 2.26 (s, 6H), 1.83 (s, 12H), -2.60 (s, 2H). **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 158.0, 144.6, 139.4, 138.5, 137.7, 135.5, 134.9, 134.4, 129.2, 128.8, 128.1, 127.7, 122.7, 118.8, 118.2, 113.0, 62.31, 54.3, 21.6, 21.4.

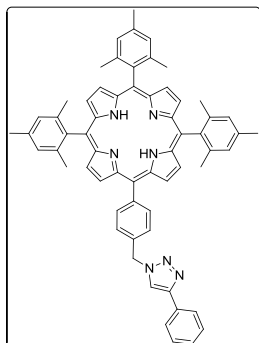


Porfiryra 157. Otrzymano według metody B, czas prowadzenia reakcji 2 h. Wydajność: 76%. **Analiza elementarna** (%) obliczona dla C₆₄H₆₄N₁₀O₆ + H₂O: C 70.70, H 6.12, N 12.88; otrzymano C 70.59, H 6.14, N 12.86. **MS ESI**, (m/z): obliczono dla C₆₄H₆₄N₁₀O₆ [M + H]⁺ 1069.5; otrzymano 1069.6. **UV/Vis** (DCM), λ_{\max} (nm) (ϵ , L·mol⁻¹·cm⁻¹): 648 (3.72 x10³), 592 (4.68 x10³), 551 (7.76 x10³), 516 (1.48 x10⁴), 420 (3.89 x10⁵). **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.81 (d, $J = 4.7$ Hz, 4H), 8.68 (d, $J = 4.7$ Hz, 4H), 8.12 (d, $J = 8.2$ Hz, 4H), 7.93 (s, 2H), 7.35 (d, $J = 8.2$ Hz, 4H), 7.27 (bs, 4H), 5.46 (s, 4H), 4.62 (t, $J = 4.9$ Hz, 4H), 3.94 (t, $J = 4.9$ Hz, 4H), 3.74 (bs, 4H), 3.60 (t, $J = 4.5$ Hz, 4H), 2.61 (s, 6H), 2.11 (bs, 2H), 1.83 (s, 12H), -2.60 (s, 2H). **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 158.1, 144.2, 139.4, 138.5, 137.7, 135.6, 135.0, 127.8, 124.0, 118.9, 118.2, 113.0, 72.6, 69.3, 62.3, 61.7, 50.4, 21.6, 21.5.

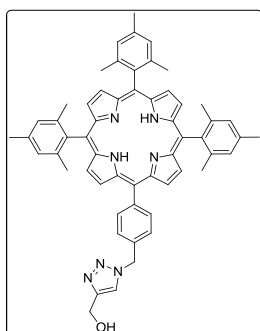


Dimer 158. Otrzymano według metody B w temperaturze 60°C, czas prowadzenia reakcji 18 h. Wydajność: 63%. **HRMS ESI**, (m/z): obliczono dla C₁₁₀H₁₀₀N₁₁O [M+H]⁺ 1590.8107, otrzymano 1590.8112. **UV/Vis** (DCM), λ_{\max} (nm) (ϵ , L·mol⁻¹·cm⁻¹): 647 (5.13 x10³), 590 (6.17 x10³), 548 (1.07 x10⁴), 514 (4.47 x10⁴), 418 (8.51 x10⁵). **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.82 (d, $J = 4.6$ Hz, 2H), 8.75 (d, $J = 4.6$ Hz, 2H), 8.69 (m, 6H), 8.63 (s, 4H), 8.62 (s, 4H), 8.26 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 8.15 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 8.02 (s, 1H), 7.70 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.40 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.26 (s, 6H), 7.24 (s, 4H), 5.94 (s, 2H), 5.50 (s, 2H), 2.61 (s, 12H), 2.60 (s, 6H), 1.86 (s, 12H), 1.85 (s, 12H), 1.84 (s, 12H), -2.55 (s, 4H). **¹³C NMR**

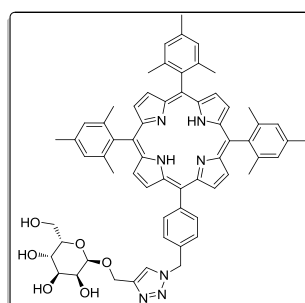
(125 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 158.2, 144.9, 142.9, 139.43, 139.40, 138.4, 138.3, 138.2, 138.1, 137.7, 137.63, 135.5, 135.2, 135.1, 133.9, 127.74, 127.71, 126.4, 123.0, 118.8, 118.1, 118.0, 117.9, 117.5, 113.0, 62.5, 54.4, 53.4, 29.7, 21.72, 21.67, 21.5.



Porfiryna 159a. Otrzymano według metody B, czas prowadzenia reakcji 2 h. Wydajność: 98%. **Analiza elementarna** (%) obliczona dla C₆₂H₅₅N₇: C 82.91, H 6.17, N 10.92; otrzymano C 79.16, H 5.89, N 10.01. **MS ESI**, (m/z): obliczono dla C₆₂H₅₆N₇ [M + H]⁺ 898.5; otrzymano 898.5. **UV/Vis** (DCM), λ_{\max} (nm) (ϵ , L·mol⁻¹·cm⁻¹): 645(9.12 x10³), 593(1.45 x10⁴), 547(1.66 x10⁴), 514(4.07 x10⁴), 418(9.77 x10⁵), 366(5.25 x10⁴). **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.77 (dd, $J = 24.6, J = 4.6$ Hz, 1H), 8.67-8.72 (m, 5H), 8.63 (s, 3H), 8.21-8.24 (m, 2H), 7.98 (s, 1H), 7.91-7.93 (m, 2H), 7.66 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.45-7.48 (m, 2H), 7.35-7.37 (m, 1H), 7.27 (bs, 4H), 7.24 (s, 2H), 5.91 (s, 2H), 2.61 (bs, 9H), 1.85-1.83 (m, 18H), -2.57 (s, 2H). **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 149.8, 149.6, 148.5, 142.8, 139.4, 139.0, 138.2, 137.5, 135.0, 134.2, 131.8, 131.1, 130.6, 128.9, 128.3, 127.7, 126.1, 125.8, 119.8, 117.8, 54.3, 29.6, 21.7.

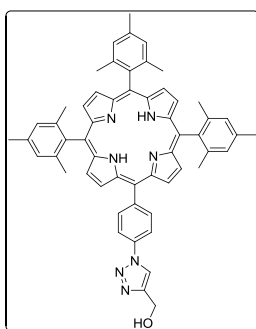


Porfiryna 159b. Otrzymano według metody B, czas prowadzenia reakcji 2 h. Wydajność: 64%. **Analiza elementarna** (%) obliczona dla C₅₇H₅₃N₇O: C 80.35, H 6.27, N 11.51; otrzymano C 78.35, H 6.72, N 10.35. **MS ESI**, (m/z): obliczono dla C₅₇H₅₃N₇O [M + H]⁺ 852.4, [M + Na]⁺ 874.4; otrzymano 852.7, 874.6. **UV/Vis** (DCM), λ_{\max} (nm) (ϵ , L·mol⁻¹·cm⁻¹): 647 (4.07 x10³), 591 (5.89 x10³), 541 (1.00 x10⁴), 513 (1.78 x10⁴), 417 (3.98 x10⁵). **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.69 (dd, $J = 15.5, J = 4.6$ Hz, 4H), 8.63 (s, 4H), 8.20 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 7.61 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 7.27 (bs, 4H), 7.25 (s, 3H), 5.88 (bs, 2H), 2.62 (s, 9H), 2.44 (bs, 1H), 1.84 (d, $J = 5.4$ Hz, 18H), 1.43 (s, 2H), -2.57 (s, 2H). **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 146.0, 142.9, 139.4, 138.3, 138.1, 137.7, 135.0, 134.0, 127.8, 126.3, 121.8, 118.1, 118.0, 117.8, 56.9, 54.2, 34.7, 26.9, 25.3, 21.6.

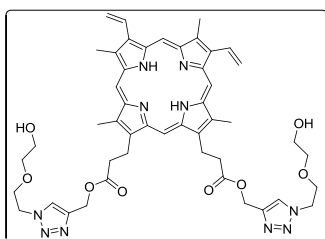


Porfiryna 159c. Otrzymano według metody B, czas prowadzenia reakcji 2 h. Wydajność: 71%. **Analiza elementarna** (%) obliczona dla C₆₃H₆₃N₇O₆ + 2H₂O: C 72.05, H 6.43, N 9.34; otrzymano C 71.89, H 6.17, N 9.20. **MS ESI**, (m/z): obliczono dla C₆₃H₆₃N₇O₆ [M + H]⁺ 1014.5; otrzymano 1014.5. **UV/Vis** (DCM), λ_{\max} (nm) (ϵ , L·mol⁻¹·cm⁻¹): 647 (3.98 x10³), 591 (6.17 x10³), 548 (8.51 x10³), 513 (2.04 x10⁴), 418 (4.68 x10⁵). **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-d₆, 80 °C), δ (ppm): 8.74 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H), 8.61 (d, $J = 4.9$ Hz, 2H), 8.58 (bs, 3H), 8.37 (s, 1H), 8.20 (d, J

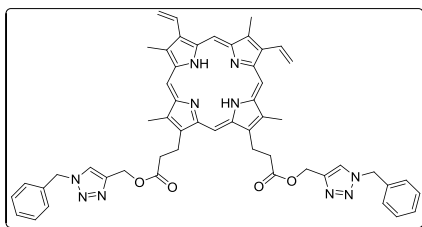
= 8.0 Hz, 2H), 7.73 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.30-7.33 (m, 4H), 5.95 (s, 2H), 4.97 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 4.81 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H), 4.71 (m, 1H), 4.56-4.58 (m, 2H), 4.39 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 4.24 (t, $J = 12.3$ Hz, 1H), 3.74-3.78 (m, 2H), 3.52-3.56 (m, 2H), 3.19-3.25 (m, 3H), 3.13-3.16 (m, 2H), 2.58 (s, 9H), 1.79 (s, 18H), -2.54 (bs, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6 , 80 °C), δ (ppm): 145.0, 141.5, 139.0, 138.0, 137.8, 136.2, 134.9, 131.8, 130.7, 130.3, 128.2, 127.9, 126.8, 125.0, 119.1, 118.0, 117.8, 102.9, 77.5, 74.0, 71.0, 62.3, 62.0, 53.3, 21.7, 21.5.



Porfiryna 160. Otrzymano według metody B, czas prowadzenia reakcji 2 h. Wydajność: 13%. **MS ESI**, (m/z): obliczono dla $\text{C}_{56}\text{H}_{51}\text{N}_7\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 838.4, otrzymano 838.6, 860.5. Ze względu na nietrwałość związku nie udało się przeprowadzić analiz NMR.

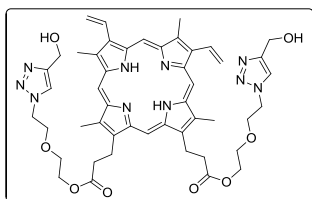


Porfiryna 161a. Otrzymano według metody A, czas prowadzenia reakcji 2.5 h. Wydajność: 33%. **MS ESI**, (m/z): obliczono dla $\text{C}_{48}\text{H}_{67}\text{N}_{10}\text{O}_8$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 901.4, otrzymano 901.9. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $\text{L} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$): 629(9.55×10^2), 578(1.86×10^3), 541(3.47×10^3), 505(5.37×10^3), 406(6.17×10^4). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 10.06 (s, 1H), 9.96 (s, 1H), 9.86 (s, 1H), 9.84 (s, 1H), 8.22 (m, 2H), 6.37 (m, 2H), 6.21 (m, 2H), 5.74 (s, 1H), 5.63 (s, 1H), 4.84 (s, 2H), 4.83 (s, 2H), 4.33 (m, 4H), 3.67 (s, 3H), 3.65 (s, 3H), 3.52 (s, 6H), 3.28 (m, 4H), 3.00 (m, 4H), 2.77 (t, $J = 4.7$ Hz, 2H), 2.66 (t, $J = 4.7$ Hz, 2H), 2.58 (m, 4H), 2.18 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), -4.80 (s, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 173.0, 142.06, 142.03, 130.01, 129.97, 123.4, 123.3, 121.2, 97.7, 97.2, 96.9, 96.6, 71.6, 71.5, 67.8, 67.7, 60.78, 60.76, 57.6, 48.6, 48.5, 36.6, 29.7, 21.8, 12.7, 11.7.

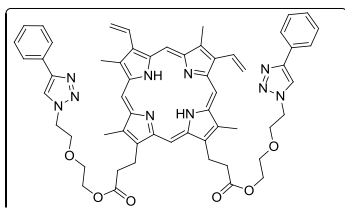


Porfiryna 161b. Otrzymano według metody A, czas prowadzenia reakcji 2.5 h. Wydajność: 89%. **MS ESI**, (m/z): obliczono dla $\text{C}_{54}\text{H}_{53}\text{N}_{10}\text{O}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 905.4, otrzymano 906.0. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$): 631(1.95×10^3), 577(3.16×10^3), 541(5.25×10^3), 505(6.46×10^3), 407(5.75×10^4). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 9.75 (s, 1H), 9.72 (s, 1H), 9.55 (s, 2H), 8.08 (m, 2H), 7.64 (m, 1H), 7.38-7.58 (m, 1H), 6.95 (m, 2H), 6.79 (m, 4H), 6.09-6.34 (m, 5H), 5.95 (m, 4H), 5.32 (s, 1H), 5.21 (s, 1H), 4.78 (s, 2H), 4.74 (s, 2H), 4.20 (s, 4H), 3.50 (s, 3H), 3.49 (s, 3H), 3.40 (s, 3H), 3.37 (s, 3H), 3.15 (m, 4H), -4.80 (s, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 172.8, 42.23, 142.16, 133.62, 133.60, 132.1, 132.0, 131.9, 130.0, 128.5,

128.4, 128.3, 128.2, 127.9, 126.9, 126.8, 122.3, 122.2, 120.7, 97.4, 96.9, 96.6, 95.9, 57.5, 57.49, 52.3, 52.2, 36.5, 21.6, 12.53, 12.51, 11.5, 11.4



Porfiryra 162a. Otrzymano według metody A, czas prowadzenia reakcji 2.5 h. Wydajność: 66%. **Analiza elementarna (%)** obliczona dla $C_{48}H_{56}N_{10}O_8 + H_2O$: C 62.73, H 6.36, N 15.24; otrzymano C 62.51, H 6.16, N 15.00. **MS ESI**, (m/z): obliczono dla $C_{48}H_{56}N_{10}O_8$ $[M + H]^+$ 901.4; otrzymano 901.4. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 629 (6.61×10^3), 580 (9.77×10^3), 540 (1.62×10^4), 508 (1.78×10^4), 406 (2.14×10^5). **1H NMR** (500 MHz $CDCl_3$), δ (ppm): 10.02 (s, 2H), 9.99 (s, 1H), 9.86 (s, 1H), 9.87 (s, 1H), 8.18 (m, 2H), 6.53 (d, $J = 21.7$ Hz, 2H), 6.33 (d, $J = 17.7$ Hz, 2H), 6.17 (d, $J = 11.5$ Hz, 2H), 4.28-4.35 (m, 8H), 3.94 (bs, 4H), 3.62 (s, 6H), 3.55 (s, 6H), 3.23-3.29 (m, 8H), 3.00 (m, 4H), 2.82 (m, 4H), 1.64 (bs, 2H), -4.21 (bs, 2H). **^{13}C NMR** (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 173.2, 147.2, 138.3, 137.0, 136.8, 136.5, 130.1, 122.1, 121.0, 98.0, 97.2, 97.0, 96.3, 68.5, 56.1, 49.1, 36.8, 21.8, 12.6, 11.7.

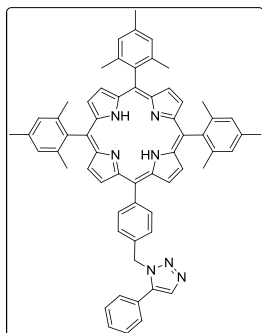


Porfiryra 162b. Otrzymano według metody A, czas prowadzenia reakcji 2.5 h. Wydajność: 89%. **MS ESI**, (m/z): obliczono dla $C_{58}H_{59}N_{10}O_6$ $[M+H]^+$ 993.5, otrzymano 993.9. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 670(2.69×10^3), 630(2.51×10^3), 576(3.31×10^3), 541(5.50×10^3), 504(6.46×10^3), 406(7.24×10^4). **1H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 9.95 (s, 2H), 9.82 (s, 2H), 8.14 (m, 2H), 7.48 (m, 4H), 7.13 (m, 4H), 7.00 (m, 2H), 6.65 (s, 1H), 6.63 (s, 1H), 6.30 (m, 2H), 6.15 (m, 2H), 4.28 (bs, 4H), 3.94 (m, 4H), 3.58 (s, 3H), 3.55 (s, 3H), 3.48 (s, 3H), 3.47 (s, 3H), 3.19 (m, 4H), 2.99 (s, 4H), 2.94 (s, 4H), 2.68 (s, 4H), -4.21 (s, 2H). **^{13}C NMR** (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 173.0, 146.97, 146.95, 130.4, 130.0, 128.5, 128.4, 127.7, 125.32, 125.31, 120.9, 119.9, 97.8, 97.1, 96.8, 96.2, 68.5, 68.30, 63.1, 48.9, 36.8, 21.8, 12.6, 11.6, 11.5

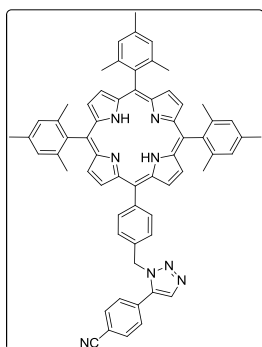
Ogólna procedura RuAAC katalizowanej $Cp^*RuCl(COD)$

Alkin (3.0 Eq) i $Cp^*RuCl(COD)$ (0.1 Eq) rozтворzono w bezwodnym THF ($C_{porf} = 0.125$ M) w atmosferze argonu. Do mieszaniny dodano porfiryne **145d** (1 Eq) i mieszano w temperaturze pokojowej. Postępowanie reakcji monitorowano techniką TLC. Po stwierdzeniu całkowitej konsumpcji substratu porfirynowego mieszaninę poreakcyjną rozcieńczano DCM, przemywano 3 razy wodą, suszono Na_2SO_4 i odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielano techniką chromatografii kolumnowej stosując jako eluent mieszaninę MeOH/DCM (0-3%).

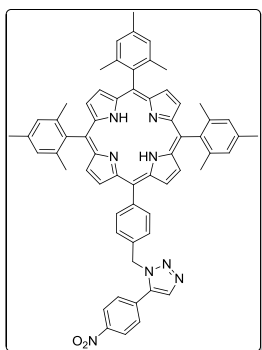
Fracje zawierające produkt odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 50 °C.



Porfiryra 163a. Wydajność: 91%. **HRMS ESI**, (m/z): obliczono dla $C_{62}H_{56}N_7$ $[M+H]^+$ 898.4591; otrzymano 898.4589. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 645(9.12×10^3), 593(1.45×10^4), 547(1.66×10^4), 514(4.07×10^4), 418(9.77×10^5), 366(5.25×10^4). **1H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 8.67 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H), 8.64 (d, $J = 4.5$ Hz, 2H), 8.63 (s, 4H), 8.08 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.80 (s, 1H), 7.58-7.52 (m, 2H), 7.46 (dd, $J = 1.9$, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.37 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.27 (d, $J = 0.9$ Hz, 4H), 7.26 (d, $J = 0.6$ Hz, 2H), 7.24 (s, 1H), 5.89 (s, 2H), 2.62 (s, 6H), 2.61 (s, 3H), 1.85 (s, 6H), 1.84 (s, 12H), -2.58 (s, 2H). **^{13}C NMR** (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 142.1, 139.4, 139.3, 138.31, 138.28, 138.1, 137.72, 137.71, 134.8, 134.7, 133.5, 129.7, 129.10, 129.08, 127.75, 127.74, 127.1, 125.5, 118.0, 118.1, 117.9, 52.0, 31.6, 29.7, 21.72, 21.67, 21.46, 21.45.

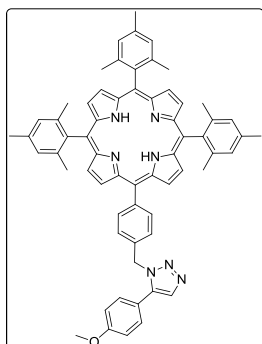


Porfiryra 163b. Wydajność: 53%. **HRMS ESI**, (m/z): obliczono dla $C_{63}H_{55}N_8$ $[M+H]^+$ 923.4544; otrzymano 923.4532. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 645(1.20×10^4), 590(8.32×10^3), 548(1.12×10^4), 514(1.58×10^4), 443(1.29×10^5), 418(4.90×10^5). **1H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 8.68 (d, $J = 4.6$ Hz, 2H), 8.63 (s, 4H), 8.60 (d, $J = 5.0$ Hz, 2H), 8.10 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.82 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.53 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.30 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.28 (d, $J = 0.5$ Hz, 4H), 7.23 (s, 2H), 5.82 (s, 2H), 2.62 (s, 6H), 2.61 (s, 3H), 1.90 (s, 2H), 1.85 (s, 6H), 1.84 (s, 12H), 1.82 (s, 2H), -2.58 (s, 2H). **^{13}C NMR** (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 149.9, 149.8, 149.7, 149.3, 142.6, 139.4, 138.2, 138.0, 137.76, 137.73, 136.4, 134.8, 134.2, 133.8, 132.8, 132.6, 131.6, 129.5, 129.1, 127.8, 125.2, 127.5, 124.7, 118.1, 118.0, 117.9, 117.6, 113.7, 52.3, 21.9, 21.72, 21.66, 21.46, 21.44.

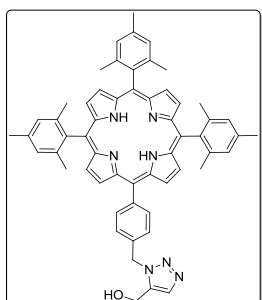


Porfiryra 163c. Wydajność: 41%. **HRMS ESI**, (m/z): obliczono dla $C_{62}H_{55}N_8O_2$ $[M+H]^+$ 943.4442; otrzymano 943.4433. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 644(9.77×10^4), 593(4.07×10^4), 548(2.45×10^4), 514(2.29×10^4), 443(1.15×10^6), 419(5.13×10^5), 363(9.77×10^4). **1H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 8.68 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H), 8.63 (s, 4H), 8.61 (d, $J = 4.6$ Hz, 2H), 8.42 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 8.12 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.65 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.80 (1H, s), 7.36 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.27 (s, 3H), 7.25 (s, 3H), 5.90 (s, 2H), 2.61 (s, 3H), 1.85 (s, 6H), 1.84 (s,

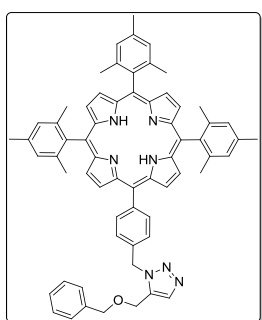
12H), -2.58 (s, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 148.5, 144.0, 142.7, 138.2, 139.4, 138.0, 137.7, 136.2, 134.9, 134.2, 134.1, 133.4, 129.8, 127.8, 127.7, 125.2, 124.3, 120.9, 118.1, 118.0, 117.6, 83.4, 70.3, 52.4, 45.9, 29.7, 24.5, 21.8, 21.7, 21.5



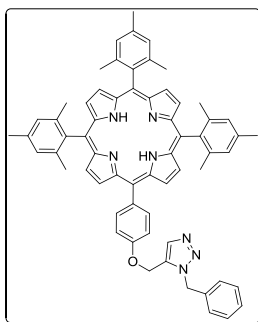
Porfiryra 163d Wydajność: 82%. **HRMS ESI**, (m/z): obliczono dla $\text{C}_{63}\text{H}_{58}\text{N}_7\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 928.4697; otrzymano 928.4694. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} , (nm) (ϵ , $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): 645(1.23×10^4), 592(4.37×10^3), 548(3.55×10^3), 514(4.47×10^3), 443(1.07×10^5), 418(2.04×10^5), 365(1.51×10^4). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 8.66 (td, $J = 3.1$, $J = 7.7$ Hz, 5H), 8.63 (s, 4H), 8.09 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.34 (t, $J = 7.1$ Hz, 4H), 7.26 (s, 2H), 7.27 (s, 4H), 7.24 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 5.79 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 2.62 (s, 6H), 2.61 (s, 3H), 1.85 (s, 6H), 1.84 (s, 12H), -2.58 (s, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 149.8, 149.7, 149.5, 142.1, 139.4, 138.3, 138.11, 138.06, 137.7, 135.0, 134.7, 133.1, 130.4, 127.8, 125.5, 119.1, 118.1, 118.0, 117.9, 114.6, 114.3, 55.4, 55.3, 51.8, 21.96, 21.94, 21.8, 21.74, 21.68, 21.5.



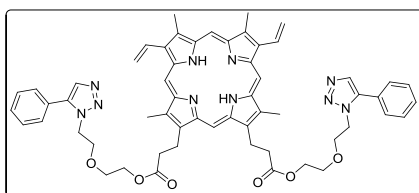
Porfiryra 163e. Wydajność: 43%. **HRMS ESI**, (m/z): obliczono dla $\text{C}_{57}\text{H}_{54}\text{N}_7\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 852.4384; otrzymano 852.4373. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): 590(2.75×10^3), 548(5.52×10^3), 515(7.94×10^3), 418(1.74×10^5). Ze względu na nietrwałość związku nie udało się przeprowadzić analiz NMR.



Porfiryra 163f. Wydajność: 44%. **MS ESI**, (m/z): obliczono dla $\text{C}_{64}\text{H}_{60}\text{N}_7\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 942.5; otrzymano 942.5. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): 640(1.00×10^3), 590(1.78×10^3), 548(3.80×10^3), 513(6.03×10^3), 418(1.74×10^5). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.63 (d, $J = 15.3$ Hz, 9H), 8.11 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.44 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.37 (d, $J = 4.5$ Hz, 4H), 7.30 (t, $J = 4.3$ Hz, 1H), 7.27 (s, 5H), 7.24-7.20 (m, 1H), 5.85 (s, 2H), 4.61 (s, 2H), 4.57 (s, 2H), 2.62 (s, 6H), 2.61 (s, 3H), 1.85 (s, 6H), 1.84 (s, 12H), -2.58 (s, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 149.8, 142.3, 139.3, 138.3, 138.1, 137.7, 136.8, 134.7, 134.4, 134.1, 133.2, 128.7, 128.6, 128.4, 128.3, 128.1, 128.0, 127.7, 127.5, 118.3, 118.0, 117.9, 110.0, 72.6, 72.1, 59.8, 52.3, 34.1, 29.7, 22.3, 21.9, 21.8, 21.7, 21.6, 21.4.



Porfiryra 164. Porfirybę **145a** (30.0 mg, 40 μmol , 1 Eq.) i $\text{Cp}^*\text{RuCl}(\text{COD})$ (1.5 mg, 4 μmol , 0.1 Eq.) roztworzono w atmosferze argonu w bezwodnym THF (0.5 ml). Do mieszaniny dodano azydek benzylu 12 μl , 100 μmol , 2.5 Eq.) i mieszano przez 2 h w temperaturze pokojowej. Mieszaninę poreakcyjną rozcieńczono DCM, przemyto 3 razy wodą, suszono Na_2SO_4 i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono techniką chromatografii kolumnowej stosując jako eluent mieszaninę MeOH/DCM (0-3%). Frakcje zawierające produkt odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 50 °C. **Wydajność:** 12.6 mg, 34%. **HRMS ESI**, (m/z): obliczono dla $\text{C}_{63}\text{H}_{59}\text{N}_7\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 928.4697; otrzymano 928.4631. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): 649(5.01×10^3), 592(6.03×10^3), 546(1.07×10^4), 516(1.95×10^4), 419(5.01×10^5). **^1H NMR** (500 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 8.74 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H), 8.68 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H), 8.08 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 8.63 (s, 4H), 7.42-7.36 (m, 4H), 7.27 (s, 4H), 7.26 (s, 4H), 7.25 (s, 1H), 5.75 (s, 2H), 5.10 (s, 2H), 2.62 (s, 6H), 2.61 (s, 3H), 1.85 (s, 6H), 1.84 (s, 12H). **^{13}C NMR** (125 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 149.8, 142.3, 139.4, 138.3, 138.1, 137.7, 136.8, 134.8, 134.4, 134.1, 133.2, 128.7, 128.6, 128.4, 128.3, 128.1, 128.0, 127.7, 127.5, 125.8, 118.8, 117.9, 72.6, 29.8, 52.2, 34.1, 22.3, 21.9, 21.8, 21.71, 21.66, 21.5.

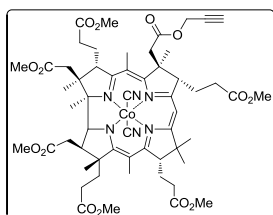


Porfiryra 166. Fenyloacetylen (3.0 Eq.) i $\text{Cp}^*\text{RuCl}(\text{COD})$ (0.1 Eq.) roztworzono w atmosferze argonu w bezwodnym THF ($C_{\text{porf}} = 0.125$ M). Do mieszaniny dodano pochodną protoporfiryryny **149** i mieszano w temperaturze pokojowej. Postęp reakcji monitorowano techniką TLC. Po stwierdzeniu całkowitej konsumpcji substratu porfiryrynowego mieszaninę poreakcyjną rozcieńczano DCM, przemywano 3 razy wodą, suszono Na_2SO_4 i odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielano techniką chromatografii kolumnowej stosując jako eluent mieszaninę MeOH/DCM (0-3%). Frakcje zawierające produkt odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 50 °C. **Wydajność** 93%. **HRMS ESI**, (m/z): obliczono dla $\text{C}_{58}\text{H}_{59}\text{N}_{10}\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 993.4770, otrzymano 993.4772. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): 670(2.69×10^3), 630(2.51×10^3), 576(3.31×10^3), 541(5.50×10^3), 504(6.46×10^3), 406(7.24×10^4). **^1H NMR** (500 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 9.95 (s, 1H), 9.90 (s, 1H), 9.87 (s, 1H), 9.83 (s, 1H), 8.15 (td, $J = 11.5$, $J = 17.7$ Hz, 2H), 7.49 (s, 2H), 7.24 (s, 2H), 7.16-7.11 (m, 6H), 7.07 (d, $J = 3.7$, $J = 7.4$ Hz, 4H), 6.31 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H), 6.27 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 6.14 (dd, $J = 6.6$, $J = 11.4$ Hz, 2H), 4.30 (t, $J = 7.6$ Hz, 4H), 3.97 (t, $J = 4.7$ Hz, 4H), 3.66 (t, $J = 5.3$ Hz, 4H), 3.55 (s, 3H), 3.52 (s, 3H), 3.50 (s, 3H), 3.24 (dd, $J = 5.9$, $J = 13.8$ Hz, 4H), 3.19 (t, $J = 7.7$ Hz, 4H), 3.11 (dd, $J = 5.3$, $J = 10.0$ Hz, 4H), -4.11 (s, 2H). **^{13}C NMR** (125 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 173.0, 138.5, 132.6,

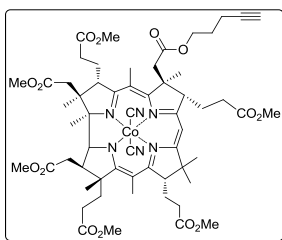
130.18, 130.15, 129.1, 128.8, 128.6, 126.6, 120.8, 97.8, 97.2, 96.9, 96.2, 68.9, 68.7, 63.2, 53.4, 47.1, 36.8, 31.5, 22.7, 21.7, 12.6, 11.69, 11.67.

Ogólna procedura syntezy pochodnych kwasu kobrynowego

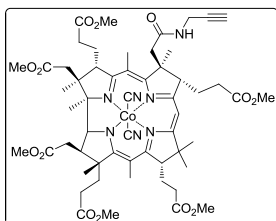
Monokwas **168**¹¹⁵ (1 Eq.) rozpuszczono w bezwodnym DCM (0.1 M) w atmosferze argonu. Otrzymany roztwór schodzono do 0°C i dodano EDC (3Eq.) i DMAP (3 Eq.) w jednej porcji a następnie odpowiedni alkohol lub aminę (10 Eq.). Po ogrzaniu się mieszaniny reakcyjnej do temperatury pokojowej mieszano przez noc. Mieszaninę reakcyjną rozcieńczono DCM i przemyto buforem fosforanowym (pH = 7) zawierającym ok 1% KCN. Fazę organiczną suszono nad Na₂SO₄ i odparowano. Produkt wydzielono techniką DCVC używając mieszaniny 5% MeOH/DCM. Frakcje zawierające produkt odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, roztworzono w DCM, przemyto buforem fosforanowym (pH = 7) zawierającym ok 1% KCN. Fazę organiczną suszono nad Na₂SO₄ i odparowano. Produkt roztworzono w DCM, wytrącono pentanem, odwirowano i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 50 °C.



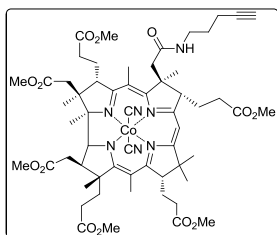
Pochodna 169a. Wydajność: 91%. **Analiza elementarna (%)** obliczona dla: C₅₆H₇₃CoN₆O₁₄ + H₂O: C 59.46, H 6.68, N 7.43; otrzymano: C 59.59, H 6.94, N 7.34. **HRMS ESI, (m/z):** obliczono dla C₅₅H₇₃CoN₅O₁₄ [M-CN]⁺: 1086.4481; otrzymano 1086.4533. **UV/Vis (DCM), λ_{max} (nm)** (ε, L·mol⁻¹·cm⁻¹): 589.3 (1.09x10⁴), 549.6 (8.51x10³), 422 (2.86x10³), 371 (2.82x10⁴), 316.5 (9.25x10³), 278.8 (1.2x10⁴). **¹H NMR** (500 MHz, toluen-d₈), δ (ppm): 5.67 (bs, 1H, CH *meso*), 4.42 (dd, J = 1.9 Hz, J = 15.5 Hz, 1H, O-CH₂-CCH), 4.25 (dd, J = 1.9 Hz, J = 15.5 Hz, 1H O-CH₂-CCH), 3.94 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 3.90-3.85 (m, 1H), 3.61-3.54 (m, 1H), 3.47 (s, 3H, O-CH₃), 3.39 (s, 3H O-CH₃), 3.38 (s, 6H, 2x O-CH₃), 3.33 (s, 3H, O-CH₃), 3.29 (s, 3H, O-CH₃), 2.90-2.79 (m, 3H), 2.72-2.43 (m, 8H), 2.42-2.33(m, 3H), 2.32-2.21 (m, 4H), 2.20 (s, 3H, CH₃), 2.04 (s, 3H, CH₃), 2.00-1.91 (m, 4H), 1.84-1.65 (m, 3H), 1.44 (s, 3H, CH₃), 1.36 (s, 3H, CH₃), 1.69 (s, 3H, CH₃), 1.12 (s, 3H, CH₃), 0.95 (s, 6H, 2xCH₃). **¹³C NMR** (125MHz, toluen-d₈) δ (ppm): 176.1, 174.9, 173.3, 172.7, 172.3, 172.0, 171.7, 171.3, 171.2, 169.1, 163.3, 91.0, 82.5, 77.9, 74.8, 74.5, 58.1, 56.7, 54.1, 53.6, 51.3, 51.2, 50.9, 50.8, 50.6, 50.5, 48.7, 46.5, 45.7, 41.9, 41.2, 39.4, 34.6, 33.4, 32.7, 31.5, 30.9, 30.3, 30.1, 29.5, 26.9, 26.5, 25.5, 25.3, 24.6, 22.7, 22.5, 21.9, 19.0, 18.8, 17.7, 16.6, 15.5, 15.1, 13.9, 11.2.



Pochodna 169b. Wydajność 89%. **Analiza elementarna (%)** obliczona dla $C_{58}H_{77}CoN_6O_{14}$: C 61.04, H 6.80, N 7.36; otrzymano: C 60.90, H 6.84, N 7.16. **MS ESI**, (m/z): obliczono dla $C_{57}H_{77}CoN_5O_{14}$ $[M-CN]^+$: 1114.5; otrzymano: 1114.4. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 589.3 (0.93×10^4), 550.6 (7.31×10^3), 422 (2.36×10^3), 371 (2.45×10^4), 315.0 (7.86×10^3), 278.8 (9.93×10^3). **1H NMR** (500 MHz, toluen- d_8), δ (ppm): 5.68 (bs, 1H), 3.94 (t, $J = 6.3$ Hz, 3H), 3.89 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 3.63 (dd, $J = 5.0$ Hz, $J = 3.5$ Hz, 1H), 3.47 (s, 3H), 3.403 (s, 3H), 3.339 (s, 3H), 3.39 (s, 3H), 3.34 (s, 3H), 3.29 (s, 3H), , 2.88-2.81 (m, 4H), 2.71-2.54 (m, 4H), 2.54-2.46 (m, 4H), 2.46-2.23 (m, 8H), 2.21 (s, 3H), 2.04 (s, 3H) 1.98-1.94 (m, 4H), 1.79 (t, $J = 2.5$ Hz, 1H), 1.53-1.47 (m, 3H), 1.45 (s, 3H), 1.41 (s, 3H), 1.21 (bs, 1H), 1.18 (s, 3H), 1.15 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 0.99 (s, 3H). **^{13}C NMR** (125 MHz, toluen- d_8), δ (ppm): 176.0, 175.1, 174.8, 173.4, 172.8, 172.8, 172.3, 172.0, 171.7, 171.4, 171.3, 169.9, 163.6, 163.1, 103.3, 102.3, 91.1, 82.9, 82.5, 74.8, 69.2, 58.1, 56.7, 54.2, 53.7, 51.3, 50.9, 50.9, 50.6, 50.5, 48.8, 46.5, 45.7, 42.1, 41.2, 39.4, 34.6, 33.4, 32.7, 31.6, 31.5, 30.8, 30.4, 30.1, 29.5, 29.1, 27.3, 26.9, 26.4, 25.5, 25.2, 24.6, 22.7, 21.9, 19.1, 18.9, 17.7, 16.5, 15.1, 15.0, 13.9, 11.2.



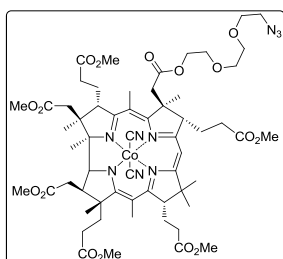
Pochodna 169c. Wydajność: 85%. **Analiza elementarna (%)** obliczona dla $C_{56}H_{74}CoN_7O_{13} + H_2O$: C 59.51, H 6.78, N 8.68; otrzymano C 59.77, H 6.53, N 8.51. **MS ESI**, (m/z): obliczono dla $C_{55}H_{74}CoN_6O_{13}$ $[M-CN]^+$ 1085.46; otrzymano 1085.40, dla $C_{56}H_{74}CoN_7O_{13}Na$ $[M+Na]^+$ 1034.46; otrzymano 1034.40. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 589 (1.09×10^4), 550 (8.60×10^3), 422 (2.85×10^3), 371 (2.92×10^4), 317 (9.25×10^3), 279 (1.23×10^4). **1H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 7.47 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 5.54 (s, 1H), 3.89 (ddd, $J = 17.3$, $J = 5.5$, $J = 2.4$ Hz, 2H), 3.80-3.72 (m, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 3.64 (s, 3H), 3.05 (dd, $J = 6.7$, $J = 4.4$ Hz, 1H), 2.86-2.79 (m, 1H), 2.68-2.59 (m, 4H), 2.58-2.35 (m, 8H), 2.34-2.26 (m, 3H), 2.24 (s, 3H), 2.23-2.14 (m, 4H), 2.13 (s, 3H), 2.08 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 2.10-1.95 (m, 2H), 1.87-1.74 (m, 2H), 1.79 (s, 3H), 1.74-1.59 (m, 3H), 1.51 (s, 3H), 1.36 (s, 3H), 1.28 (s, 3H), 1.21 (s, 3H). **^{13}C NMR** (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 175.8, 175.7, 175.4, 173.8, 173.6, 172.8, 172.6, 171.7, 171.6, 171.1, 169.4, 163.5, 160.6, 135.9, 129.1, 107.0, 102.2, 91.4, 82.7, 79.9, 74.7, 70.4, 58.9, 58.4, 57.0, 53.5, 52.4, 51.83, 51.79, 51.61, 51.58, 51.5, 47.1, 46.9, 45.7, 41.3, 39.2, 33.6, 32.4, 31.7, 31.5, 30.9, 30.7, 29.6, 28.7, 25.7, 25.6, 24.8, 22.1, 19.7, 19.3, 18.4, 16.9, 15.7, 15.2.



Pochodna 169d. Wydajność: 75%. **Analiza elementarna (%)**

obliczona dla $C_{58}H_{78}CoN_7O_{13}+H_2O$: C 60.15, H 6.96, N 8.47; otrzymano C 60.23, H 7.09, N 8.49. **MS ESI, (m/z):** obliczono dla $C_{57}H_{78}CoN_6O_{13}$ $[M-CN]^+$ 1113.50; otrzymano 1113.50, dla $C_{58}H_{78}CoN_7O_{13}Na$ $[M+Na]^+$ 1162.49; otrzymano 1162.50. **UV/Vis**

(DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 589 (1.15×10^4), 550 (8.57×10^3), 423 (2.85×10^3), 371 (2.89×10^4), 317 (9.30×10^3), 279 (1.24×10^4). **1H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 7.09 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 5.55 (s, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.71 (s, 6H), 3.70 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 3.64 (s, 3H), 3.48-3.37 (m, 1H), 3.08-3.02 (m, 1H), 2.97-2.88 (m, 1H), 2.86-2.78 (m, 1H), 2.67 (dd, $J = 9.4$, $J = 4.5$ Hz, 1H), 2.64-2.34 (m, 10H), 2.33-2.26 (m, 2H), 2.24 (s, 3H), 2.22-2.12 (m, 4H), 2.10 (s, 3H), 2.08-1.96 (m, 2H), 1.90 (s, 1H), 1.88 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H), 1.86-1.81 (m, 2H), 1.79 (s, 3H), 1.77-1.55 (m, 6H), 1.51 (s, 3H), 1.38 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.21 (s, 3H). **^{13}C NMR** (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 175.9, 175.7, 175.3, 173.8, 173.5, 172.8, 172.5, 171.6, 171.4, 171.3, 169.6, 163.5, 161.2, 106.6, 102.2, 91.3, 83.4, 82.6, 74.6, 68.6, 58.7, 58.4, 56.5, 53.5, 52.4, 51.9, 51.80, 51.79, 51.57, 51.55, 51.4, 47.2, 46.9, 46.1, 41.7, 39.2, 38.7, 33.6, 32.4, 31.7, 31.4, 30.8, 30.7, 29.60, 29.58, 27.9, 25.7, 25.6, 24.8, 22.0, 19.7, 19.2, 18.4, 16.9, 16.1, 15.29, 15.27.



Pochodna 169e. Wydajność: 89%. **Analiza elementarna (%)** obliczona

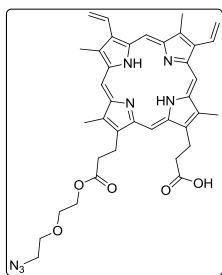
dla $C_{59}H_{82}CoN_9O_{16}+H_2O$: C 56.68, H 6.77, N 10.08; otrzymano C 56.42, H 6.93, N 9.83. **MS ESI, (m/z):** obliczono dla $C_{58}H_{82}CoN_8O_{16}$ $[M-CN]^+$ 1205.52; otrzymano 1205.52, dla $C_{59}H_{82}CoN_9O_{16}Na$ $[M+Na]^+$ 1254.51; otrzymano 1254.51. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm)

(ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 589 (1.20×10^4), 552 (8.45×10^3), 423 (2.69×10^3), 371 (2.90×10^4), 317 (8.38×10^3), 279 (1.24×10^4). **1H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 5.58 (s, 1H), 4.34 (m, 4H), 3.76 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.65 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.49-3.44 (m 1H), 3.42-2.34 (m 3H), 3.06-2.98 (m, 2H), 2.87-2.78 (m, 2H), 2.77-2.24 (m, 18H), 2.23 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 2.16-1.98 (m, 2H), 1.89-1.61 (m, 4H), 1.58 (s, 3H), 1.51 (s, 3H), 1.38 (s, 3H), 1.35 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.21 (s, 3H). **^{13}C NMR** (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 176.2, 175.5, 175.2, 173.9, 173.5, 172.9, 172.7, 171.9, 171.7, 171.4, 170.5, 163.6, 163.4, 103.5, 102.1, 91.2, 82.5, 74.7, 70.6, 70.5, 70.0, 69.0, 63.6, 58.3, 56.6, 54.0, 53.6, 52.3, 51.8, 51.7, 51.6, 51.5, 50.6, 48.5, 47.0, 45.5, 42.2, 41.05, 39.2, 33.7, 32.5, 31.8, 31.0, 30.7, 29.7, 26.5, 25.7, 24.9, 22.0, 19.8, 19.0, 18.4, 16.9, 15.9, 15.2.

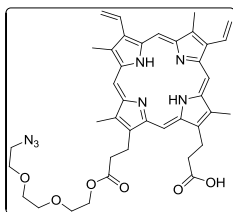
Pochodne protoporfiryny

Ogólna procedura syntezy monofunkcyjnych pochodnych PpIX 172a-c

Protoporfirynę IX (1.00 Eq.) rozтворzono w bezwodnym DMF (0.01 M) w atmosferze argonu. Otrzymany roztwór schłodzono do 0°C i dodano EDC (3.00 Eq.) i DMAP (3.00 Eq.) w jednej porcji. Do mieszaniny reakcyjnej przez 3 h dodawano po kropli roztwór odpowiedniego alkoholu lub aminy (1.05 Eq.) w DMF (0.1 M) utrzymując temperaturę łaźni chłodzącej poniżej 0 °C. Po dodaniu całości i ogrzaniu się mieszaniny reakcyjnej do temperatury pokojowej mieszano przez noc. Mieszaninę reakcyjną wiano do nasyconego roztworu NH₄Cl i ekstrahowano 3 razy DCM. Zebrane fazy organiczne przemyto 3 razy wodą, suszono Na₂SO₄ i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono techniką chromatografii kolumnowej stosując jako eluent mieszaninę MeOH/DCM (1-5% v/v). Frakcje zawierające produkt odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozpuszczono w DCM, wytrącono pentanem, odwirowano i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 50 °C.

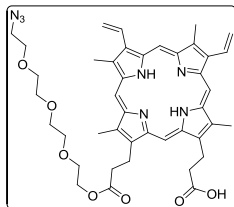


Porfiryna 172a. Wydajność: 61%. **Analiza elementarna (%)** obliczona dla C₃₈H₄₁N₇O₅ + H₂O: C 65.78, H 6.25, N 14.13; otrzymano: C 65.75, H 6.14, N 14.10. **HRMS ESI**, (*m/z*): obliczono dla: C₃₈H₄₂N₇O₅ [M+H⁺] 676.3242; otrzymano: 676.3224. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ε L·mol⁻¹·cm⁻¹): 669 (2.3x10³), 693 (4.69x10³), 576 (7.30x10³), 540 (1.04x10⁴), 505 (1.20x10⁴), 406 (1.59x10⁵). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 9.80 i 9.79 (s,s, 1H, CH mezo), 9.73 i 9.72 (s,s, 1H, CH mezo), 9.65 i 9.64 (s, s, 1H, CH mezo), 9.62 (s, 1H, CH mezo), 8.15-7.93 (m, 2H, winyl), 6.30-6.03 (m, 4H, winyl), 4.25-4.04 (m, 6H), 3.47 (s, 3H, -CH₃), 3.45 i 3.44 (s,s, 3H, -CH₃), 3.43 i 3.41 (s,s, 3H, -CH₃), 3.39 i 3.37 (s,s, 3H, -CH₃), 3.36-3.30 (m, 2H), 3.19-3.09 (m, 4H), 3.03 (t, *J* = 4.7 Hz, 2H), 2.76 (t, *J* = 4.7 Hz, 2H), -4.50 (bs, 2H, NH pirol); **¹³C NMR** (100 Hz, CDCl₃), δ (ppm) = 176.5, 173.6, 130.1, 130.0, 129.9, 120.2, 120.1, 97.2, 96.7, 96.4, 96.6, 69.3, 68.8, 63.4, 49.9, 36.9, 36.6, 21.6, 21.3, 12.0, 11.4, 11.3.



Porfiryna 172b. Wydajność: 58%. **Analiza elementarna (%)** obliczona dla C₄₀H₄₅N₇O₆: C 66.74, H 6.30, N 13.62; otrzymano: C 66.56, H 6.40, N 13.23. **HRMS ESI**, (*m/z*): obliczono. dla: C₄₀H₄₆N₇O₆ [M+H⁺] 720.35041; otrzymano: 720.3498. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ε L·mol⁻¹·cm⁻¹) = 669 (2.32x10³), 693 (4.77 x10³), 576 (7.30 x10³), 540 (1.08x10⁴), 504 (1.20x10⁴), 406 (1.60x10⁵). **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 9.62 i 9.61 (s, s, 1H), 9.48 i 9.47 (s, s, 1H), 9.45 i 9.44 (s, s, 1H), 9.40 i 9.38 (s, s, 1H), 8.11-7.76 (m, 2H), 6.30-5.97 (m, 4H), 4.25-4.16 (m, 2H), 4.14-3.95 (m, 4H), 3.47-3.40 (m, 2H), 3.37 (s, 3H), 3.36 i 3.35 (s, s, 3H), 3.34

i 3.33 (s, s, 3H), 3.30 i 3.27 (s, s, 3H), 3.16-3.05 (m, 6H), 3.33-2.97 (m, 2H), 2.96-2.90 (m, 2H), 2.89-2.83 (m, 2H), -4.50 (bs, 2H). ^{13}C NMR (125 Hz, CDCl_3), δ (ppm): 176.3, 173.8, 130.4, 120.4, 97.4, 96.9, 96.6, 95.8, 70.1, 70.04, 69.6, 69.2, 63.7, 50.4, 37.2, 37.1, 21.9, 12.7, 11.6.

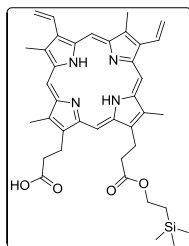


Porfiryra 172c

Wydajność 54%

Analiza elementarna (%) obliczona dla $\text{C}_{42}\text{H}_{49}\text{N}_7\text{O}_7 + 2\text{H}_2\text{O}$: C 63.06, H 6.68, N 12.26; otrzymano: C 62.83, H 6.44, N 12.37. **HRMS ESI**, (m/z): obliczono. dla: $\text{C}_{42}\text{H}_{50}\text{N}_7\text{O}_7$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 764.3766; otrzymano: 764.3774.

UV/Vis (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) = 669 (2.22×10^3), 693 (4.80×10^3), 576 (7.35×10^3), 540 (1.10×10^4), 504 (1.18×10^4), 406 (1.61×10^5). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 9.81 i 9.79 (s, s, 1H), 9 i 9.74 (s, 2H), 9.64 i 9.63 (s, s, 1H), 8.15-7.94 (m, 2H), 6.31-6.04 (m, 4H), 4.31-4.25 (m, 2H), 4.24-4.14 (m, 4H), 3.60-3.56 (m, 2H), 3.50 (s, 3H), 3.48 i 3.47 (s, s, 3H), 3.45(s, 3H), 3.42 (s, 3H), 3.16-3.05 (m, 6H), 3.33-2.97 (m, 4H), 2.96-2.90 (m, 4H), 2.89-2.83 (m, 2H), -4.60 (bs, 2H). ^{13}C NMR (125 Hz, CDCl_3), δ (ppm): 174.8, 173., 130.1, 120.4, 97.5, 96.9, 96.6, 96.1, 70.3, 70.2, 70.2, 70.0, 69.7, 69.1, 63.6, 50.4, 37.1, 36.8, 21.8, 21.4, 12.5, 11.5, 11.4.



Porfiryra 175. Wydajność: 83%. **Analiza elementarna** (%) obliczona dla $\text{C}_{39}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_4\text{Si}$: C 70.66, H 6.99, N 8.45; otrzymano C 70.64, H 7.03, N 8.40.

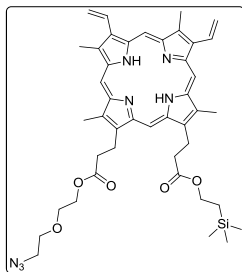
HRMS ESI, (m/z): obliczono dla $\text{C}_{39}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_4\text{Si}$ 663.3361 [$\text{M}+\text{H}^+$]; otrzymano 663.3368. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): 630 (1.03×10^4), 575 (1.37×10^4), 540 (2.31×10^4), 505 (2.86×10^4), 406 (3.32×10^5). ^1H NMR (500

MHz, CDCl_3), δ (ppm): 9.93 i 9.91 (s, s, 1H), 9.85 i 9.84 (s, s, 1H), 9.78 i 9.76 (bs, 2H), 8.14 (dd, $J = 11.6$, $J = 17.6$ Hz, 1H), 8.04 (m, 1H), 6.26 (dd, $J = 10.6$, $J = 17.6$ Hz, 2H), 6.11 (dd, $J = 4.3$, $J = 11.6$ Hz, 2H), 4.25-4.15 (m, 6H), 3.54 i 3.52 (s, s, 3H), 3.51 i 3.50 (s, s, 3H), 3.49 i 3.48 (s, s, 3H), 3.46 i 3.45 (s, s, 3H), 3.20 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.09 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 0.84 (t, $J = 8.5$ Hz, 2H), -0.09 (s, 9H), -4.23 (bs, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 176.0, 174.5, 136.4, 130.2, 130.2, 120.5, 97.6, 97.2, 96.8, 96.1, 63.4, 37.4, 36.8, 22.0, 21.6, 17.2, 12.58, 12.56, 11.6, 11.5, -1.4, -1.7.

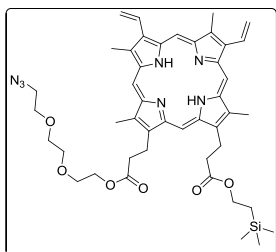
Ogólna procedura syntezy pochodnych PpIX 176a-e

Monoester PpIX **175** (1 Eq) roztworzono w bezwodnym DCM (0.01 M) w atmosferze argonu. Otrzymany roztwór schłodzony do 0 °C i dodano EDC (3 Eq) i DMAP (3 Eq) w jednej porcji. Do mieszaniny reakcyjnej dodawano odpowiedni alkohol lub aminę (3 Eq). Po ogrzaniu się mieszaniny reakcyjnej do temperatury pokojowej mieszano przez noc. Mieszaninę reakcyjną przemyto nasyconym roztworem NH_4Cl i 3 razy wodą, suszono Na_2SO_4 i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono techniką chromatografii kolumnowej stosując

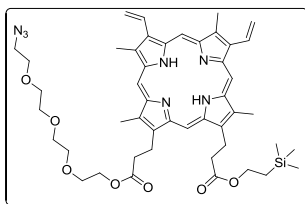
jako eluent mieszaninę 1% MeOH/DCM. Frakcje zawierające produkt odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozpuszczono w DCM, wytrącono pentanem, odwirowano i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 50 °C.



Porfiryna 176a. Wydajność: 96%. **Analiza elementarna** (%) obliczona dla $C_{43}H_{53}N_7O_5Si$: C 66.55, H 6.88, N 12.63; otrzymano C 66.70, H 6.92, N 12.47. **MS ESI**, (m/z): obliczono dla $C_{43}H_{54}N_7O_5Si$ $[M+H]^+$ 776.39; otrzymano 776.40. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 631 (9.31×10^3), 576 (7.35×10^3), 540 (1.12×10^4), 505 (1.33×10^4), 406 (1.72×10^5). **1H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 9.96 i 9.95 (s, s, 1H), 9.91 (s, 1H), 9.87 (s, 1H), 9.81 i 9.80 (s, s, 1H), 8.23-8.02 (m, 2H), 6.36-6.23 (m, 2H), 6.19-6.08 (m, 2H), 4.42-4.28 (m, 4H), 4.25-4.18 (m, 2H), 4.18-4.12 (m, 2H), 3.58 i 3.57 (s, s, 3H), 3.56 (s, 3H), 3.55 i 3.54 (s, s, 3H), 3.53 (s, 3H), 3.31-3.19 (m, 6H), 2.94 (t, $J = 4.5$ Hz, 2H), 2.62 (t, $J = 4.5$ Hz, 2H), 0.92-0.85 (m, 2H), -0.03 i -0.04 (s, s, 9H), -4.20 (bs, 2H). **^{13}C NMR** (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 173.2, 173.0, 130.2, 120.5, 97.7, 97.1, 96.8, 96.0, 69.4, 68.7, 63.4, 62.7, 50.0, 37.3, 36.9, 21.8, 21.7, 17.2, 12.6, 11.62, 11.60, 11.58, -1.6.

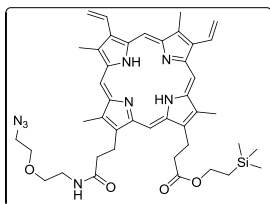


Porfiryna 176b. Wydajność: 85%. **Analiza elementarna** (%) obliczona dla $C_{45}H_{57}N_7O_6Si$: C 65.91, H 7.01, N 11.96; otrzymano C 65.72, H 7.22, N 11.63. **MS ESI**, (m/z): obliczono dla $C_{45}H_{58}N_7O_6Si$ $[M+H]^+$ 820.41; otrzymano 820.42. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 630 (1.03×10^4), 576 (7.76×10^3), 540 (1.12×10^4), 504 (1.58×10^4), 406 (1.83×10^5). **1H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 9.88 i 9.86, (s, s, 1H), 9.81 (s, 1H), 9.89 (s, 1H), 9.72 i 9.69 (s, s, 1H), 8.16-8.00 (m, 2H), 6.62-6.19 (m, 2H), 6.16-6.05 (m, 2H), 4.36-4.24 (m, 4H), 4.23-4.15 (m, 2H), 4.14-4.04 (m, 2H), 3.52 i 3.51 (s, s, 3H), 3.50 i 3.49 (s, s, 3H), 3.48 (s, 3H), 3.45 (s, 3H), 3.29-3.16 (m, 6H), 2.89-2.77 (m, 6H), 2.64-2.55 (m, 2H), 0.91-0.82 (m, 2H), -0.06 i -0.07 (s, s, 9H), -4.35 (bs, 2H). **^{13}C NMR** (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 173.3, 173.1, 130.2, 120.5, 97.6, 97.1, 96.7, 96.0, 69.9, 69.8, 69.2, 68.8, 63.6, 62.8, 50.7, 50.1, 37.3, 36.9, 21.6, 17.3, 12.6, 11.64, 11.60, -1.6.



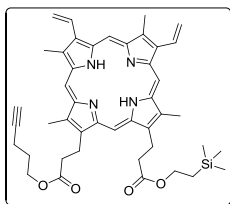
Porfiryna 176c. Wydajność: 90%. **Analiza elementarna** (%) obliczona dla $C_{47}H_{61}N_7O_7Si$: C 65.33, H 7.12, N 11.35; otrzymano C 65.21, H 7.15, N 11.11. **MS ESI**, (m/z): obliczono dla $C_{47}H_{62}N_7O_7Si$ $[M+H]^+$ 864.44; otrzymano 864.45. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} nm (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 630 (1.12×10^4), 576 (7.35×10^3), 540 (1.12×10^4), 505 (1.33×10^4), 406 (1.72×10^5). **1H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 9.92 i 9.91 (s, s, 1H), 9.85 (s, 1H), 9.85 (s, 1H), 9.76 i 9.74 (s, s, 1H), 8.22-8.01 (m, 2H), 6.36-6.21 (m, 2H), 6.19-6.06 (m, 2H),

4.40-4.30 (m, 4H), 4.27-4.20 (m, 2H), 4.19-4.14 (m, 2H), 3.35 (s, 3H), 3.54 (s, 3H), 3.53 (s, 3H), 3.51 (s, 3H), 3.39-3.34 (m, 2H), 3.33-3.30 (m, 2H), 3.30-3.21 (m, 4H), 3.20-3.17 (m, 2H), 3.14 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H), 3.08-3.03 (m, 4H), 2.92-2.86 (m, 2H), 0.95-0.86 (m, 2H), -0.02 i -0.03 (s, s, 9H), -4.29 (bs, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 173.2, 173.1, 130.2, 130.1, 120.5, 97.5, 97.0, 96.7, 95.9, 70.1, 70.02, 69.99, 69.94, 69.93, 69.6, 68.8, 63.6, 62.8, 50.4, 37.3, 36.9, 21.8, 21.7, 17.2, 12.5, 11.61, 11.57, -1.6.



Porfiryna 176d. Wydajność: 95%. **Analiza elementarna (%)** obliczona dla $\text{C}_{43}\text{H}_{54}\text{N}_8\text{O}_4\text{Si}$: C 66.64, H 7.02, N 14.46; otrzymano C 66.41, H 6.89, N 14.39. **MS ESI**, (m/z): obliczono dla $\text{C}_{43}\text{H}_{55}\text{N}_8\text{O}_4\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 775.40; otrzymano 775.50. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): 630 (1.04×10^4), 577 (6.56×10^3), 540 (1.98×10^4), 505 (1.33×10^4), 406

(2.01×10^5). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 9.82 i 9.79 (s, s, 1H), 9.81 (s, 1H), 9.70 (s, 1H), 9.65 i 9.61 (s, s, 1H), 8.18-8.02 (m, 2H), 6.33-6.21 (m, 2H), 6.17-6.07 (m, 2H), 5.86-5.76 (m, 1H), 4.32-4.18 (m, 4H), 4.05-3.96 (m, 2H), 3.53 i 3.52 (s, s, 3H), 3.51 i 3.50 (s, s, 3H), 3.47 i 3.45 (s, s, 3H), 3.44 i 3.41 (s, s, 3H), 3.20-3.13 (m, 2H), 3.09-3.33 (m, 2H), 3.02-2.97 (m, 2H), 2.46-2.40 (m, 2H), 1.70-1.62 (m, 2H), 1.40-1.33 (m, 2H), 0.70-0.63 (m, 2H), -0.20 i -0.21 (s, s, 9H), -4.58 (bs, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 173.6, 172.4, 130.2, 120.4, 97.4, 96.86, 96.83, 96.53, 96.50, 96.2, 69.0, 68.3, 62.7, 49.04, 49.02, 39.6, 38.7, 37.0, 22.8, 21.6, 17.1, 12.6, 12.5, 11.6, 11.5, 11.47, 11.41, -1.8.



Porfiryna 176e. Wydajność: 98%. **Analiza elementarna (%)** obliczona dla $\text{C}_{44}\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}_4\text{Si}$: C 72.49, H 7.19, N 7.69; otrzymano C 72.26, H 7.02, N 7.71. **MS ESI**, (m/z): obliczono dla $\text{C}_{44}\text{H}_{53}\text{N}_4\text{O}_4\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 729.38; otrzymano 729.30. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): 630 (8.34×10^3), 577 (5.76×10^3), 540 (2.17×10^4), 505 (1.43×10^4), 406

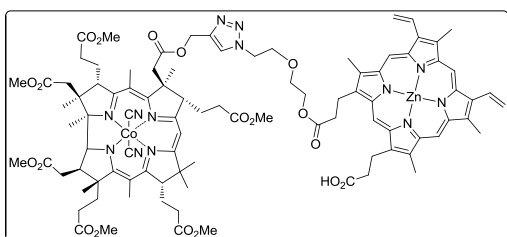
(2.56×10^5). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 10.06 (s, 1H), 1.05 (s, 1H), 9.94 (s, 1H), 9.94 (s, 1H), 8.27-8.15 (m, 2H), 6.39-6.28 (m, 2H), 6.20-6.10 (m, 2H), 4.36 (t, $J = 7.8$ Hz, 4H), 4.21-4.13 (m, 4H), 3.64 i 3.63 (s, s, 3H), 3.62 i 3.61 (s, s, 3H), 3.58 (s, 3H), 3.57 (s, 3H), 3.25 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 3.22 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.09-2.02 (m, 2H), 1.81 (t, $J = 2.7$ Hz, 1H), 1.73-1.65 (m, 2H), 0.86-0.79 (m, 2H), -0.09 i -0.10 (s, s, 9H), -3.92 (bs, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 173.2, 173.0, 130.3, 120.7, 97.9, 97.3, 97.01, 96.98, 96.1, 82.9, 68.8, 63.1, 62.8, 37.3, 37.0, 27.4, 21.82, 21.79, 17.2, 15.0, 12.67, 12.66, 11.7, -1.64.

Ogólna procedura syntezy cynkowych pochodnych PpIX Zn172a-c i Zn176a-e.

Pochodne PpIX (1 Eq.) rozтворzono w mieszaninie DCM/MeOH (1/1 v/v, 0.01 M) i dodano $Zn(AcO)_2$ (100 Eq). Po 3 h mieszaninę rozcieńczono DCM i przemyto 3 razy woda destylowaną. Fazę organiczną suszono Na_2SO_4 i odparowano. Pozostałość rozтворzono w DCM, wytrącono pentanem, odwirowano i suszono przez 2 h pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymane pochodne, ze względu na swoją nietrwałość, były używane do następnych etapów bez dodatkowego oczyszczania.

Optymalizacja reakcji CuAAC pomiędzy 169a a Zn172a

Pochodną PpIX **172a** (9 mg, 0.020 mmol) lub **Zn172a** (10 mg, 0.020 mmol) i alkin **169a** (17 mg, 0.02 mmol) rozтворzono w atmosferze argonu w odgazowanym rozpuszczalniku (3 ml). Dodawano katalizator i odpowiedni dodatek (reduktor lub ligand). Postęp reakcji monitorowano techniką TLC. Reakcję przerywano przez wlanie mieszaniny poreakcyjnej do buforu fosforanowego (pH = 7) zawierającego ok. 1% KCN. Fazę wodną ekstrahowano DCM. Zebrane fazy organiczne suszono Na_2SO_4 i odparowywano. Produkt wydzielano techniką chromatografii kolumnowej stosując jako eluent mieszaninę MeOH/DCM (1-7% v/v). Zebrane frakcje zawierające produkt odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem, rozpuszczano w DCM i przemywano buforem fosforanowym (pH = 7) zawierającym ok. 1% KCN. Fazę organiczną suszono Na_2SO_4 i odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem.



Hybryda Zn177aa. Wydajność: 75 %. **Analiza elementarna** (%) obliczona dla $C_{94}H_{112}CoN_{13}O_{19}Zn$: C 60.95, H 6.09, N 9.83; otrzymano: C 61.01, H 6.19, N 9.50. **MS ESI.** (m/z) obliczono dla: $C_{93}H_{112}CoN_{12}O_{19}Zn$ [M-CN⁺]

1823.7; otrzymano: 1823.8; dla: $C_{93}H_{111}CoN_{12}O_{19}Zn+Na^+$ [M-HCN+Na]⁺ 1845.7; otrzymano: 1845.8; dla: $C_{94}H_{112}CoN_{13}NaO_{19}Zn$ [M+Na]⁺ 1872.7; otrzymano: 1872.8; dla: $C_{94}H_{111}CoN_{13}O_{19}Zn+2Na^+$ [M-H+2Na]⁺ 1894.7; otrzymano: 1894.8. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ L·mol⁻¹·cm⁻¹): 584 (1.93x10⁴), 548 (1.91x10⁴), 421 (1.44x10⁵), 370 (4.51x10⁴), 277 (1.97x10⁴). **¹H NMR** (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 12.25 (bs, 1H, COOH), 10.26 (s, 1H, CH mezo PPIX), 10.18 (s, 1H, CH mezo PPIX), 10.16 (s, 1H, CH mezo PPIX), 10.10 (s, 1H, CH mezo PPIX), 8.57-8.45 (m, 2H, winyl), 7.87 i 7.86 (s, s, 1H, CH triazol), 6.45-6.34 (m, 2H, winyl), 6.18-6.07 (m, 2H, winyl), 5.55 (s, 1H, CH mezo vit B₁₂), 5.05 (s, 2H, CH₂-CO₂-CH₂-C_{triazol}), 4.39-4.28 (m, 4H, 2 x C_{PPIX}-CH₂-CH₂), 4.26-4.20 (m, 2H, N_{triazol}-CH₂), 4.08 (bs, 2H), 3.78-3.70 (m, 6H), 3.66 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 3.64-3.45 (m, 6H), 3.60 (s, 6H), 3.53 (s, 3H), 3.52 (s, 3H), 3.47-3.37 (m, 3H), 3.28 (t,

$J = 6\text{Hz}$, 2H), 3.20-3.12 (m, 3H), 2.90-2.85 (m, 1H), 2.82-2.70 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CO}_2\text{-CH}_2\text{-C}_{\text{triazol}}$), 2.67-2.58 (m, 3H), 2.47-2.35 (m, 3H), 2.34-2.25 (m, 3H), 2.24-2.07(m, 5H), 2.05 (s, 3H, *mezo*- CH_3), 2.02 (s, 3H *mezo*- CH_3), 1.99-1.68 (m, 6H), 1.63-1.46 (m, 4H) 1.45 (s, 3H, CH_3), 1.29 (s, 3H, CH_3), 1.25 (s, 3H, CH_3), 1.18 (s, 3H, CH_3), 1.11 (s, 3H, CH_3), 0.91 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-d_6), δ (ppm): 176.0, 175.4, 175.3, 173.7, 173.3, 173.0, 172.8, 172.75, 172.74, 172.0, 171.0, 170.1, 163.2, 162.9, 148.2, 148.1, 147.9, 147.8, 147.5, 147.2, 146.5, 146.0, 141.4 ($\text{C}_{\text{triazol}}$), 139.7, 139.2, 137.3, 137.2, 136.8, 136.6, 136.5, 130.9 (winył), 130.8 (winył), 124.8 ($\text{C-H}_{\text{triazol}}$), 119.5 (winył), 103.2 (*mezo* Vit B₁₂), 101.6 (*mezo* Vit B₁₂), 98.1 (*mezo* PPIX), 97.7 (*mezo* PPIX), 97.4(*mezo* PPIX), 96.9 (*mezo* PPIX), 90.2 (C-H, *mezo* Vit B₁₂), 82.1, 73.9, 68.3, 67.8, 63.1, 57.6, 57.3, 56.2, 53.3, 52.3, 51.9, 51.6, 51.5, 51.4, 51.3, 49.0, 47.9, 46.1, 45.2, 41.6, 40.9, 37.2, 36.9, 32.9, 31.4, 30.9, 30.6, 30.5, 30.3, 30.2, 29.1, 26.3, 25.9, 25.2, 24.7, 24.2, 22.0, 21.6, 21.5, 21.4, 18.9, 18.7, 17.5, 16.1, 15.1, 14.7, 13.9, 12.8, 11.4.

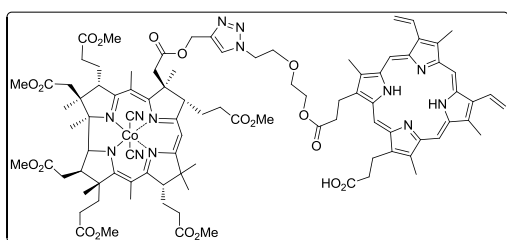
Procedura demetalacji Zn177aa

Związek **Zn177aa** (22 mg, 0.01 mmol) roztworzono w bezwodnym DCM (2 ml) w atmosferze argonu. Do otrzymanego roztworu dodano TFA (2 ml) i mieszano przez 4 h w temperaturze pokojowej. Mieszaninę poreakcyjną rozcieńczono DCM (50 ml), przemyto 3 razy wodą destylowaną i buforem fosforanowym (pH = 7) zawierającym ok. 1% KCN. Fazę organiczną suszono Na_2SO_4 i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono techniką chromatografii kolumnowej stosując jako eluent mieszaninę MeOH/DCM (1-7% v/v). Zebrane frakcje zawierające produkt odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem, rozpuszczano w DCM i przemywano buforem fosforanowym (pH = 7) zawierającym ok. 1% KCN. Fazę organiczną suszono Na_2SO_4 i odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w DCM, wytrącono pentanem, odwirowano i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 50 °C.

Ogólna procedura syntezy związków hybrydowych 177aa-177dd

Pochodną kwasu kobyrinowego **169** (1.0 Eq) i pochodną PpIX **Zn176** (1.1 Eq) roztworzono w atmosferze argonu w bezwodnym DCM. Do otrzymanego roztworu dodano CuOAc (0.3 Eq) i intensywnie mieszano. Postęp reakcji monitorowano techniką TLC. Po całkowitej konwersji związku **169** (TLC, 40-60 min) mieszaninę reakcyjną rozcieńczano DCM i przemywano 3 razy wodą destylowaną i buforem fosforanowym (pH = 7) zawierającym ok. 1% KCN. Fazę organiczną suszono Na_2SO_4 i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Fazę organiczną suszono Na_2SO_4 i odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem. Surową mieszaninę

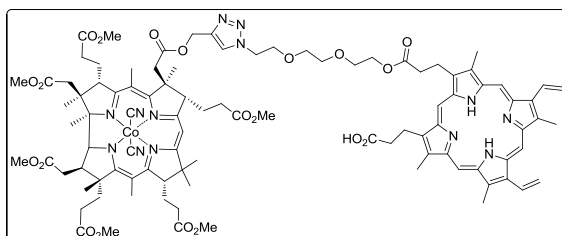
poreakcyjną наносzono na kolumnę chromatograficzną, oddzielano pozostałą pochodną **Zn176** stosując jako eluent mieszaninę 1% MeOH/DCM, a następnie eluowano związek hybrydowy stosując jako eluent mieszaninę 5% MeOH/DCM. Frakcje zawierające produkt odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość roztwarzano w DCM, przemywano buforem fosforanowym (pH = 7) zawierającym ok. 1% KCN. Fazę organiczną suszono Na₂SO₄ i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozpuszczono w DCM, wytrącono pentanem, odwirowano i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze pokojowej. Otrzymane ciało stałe roztwarzano w atmosferze argonu w bezwodnym DCM (6 ml), dodawano TFA (2 ml) i mieszało przez 4 h. Mieszaninę poreakcyjną rozcieńczono DCM (50 ml), przemywano 3 razy wodą destylowaną i buforem fosforanowym (pH = 7) zawierającym ok. 1% KCN. Fazę organiczną suszono Na₂SO₄ i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wydzielono techniką chromatografii kolumnowej stosując jako eluent mieszaninę MeOH/DCM (3-7% v/v). Zebrane frakcje zawierające produkt odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem, rozpuszczano w DCM i przemywano buforem fosforanowym (pH = 7) zawierającym ok. 1% KCN. Fazę organiczną suszono Na₂SO₄ i odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w DCM, wytrącono pentanem, odwirowano i suszono przez noc pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 50 °C



Hybryda 177a. Wydajność: 70%. **Analiza elementarna** (%) obliczona dla C₉₄H₁₁₄CoN₁₃O₁₉: C 63.11, H 6.42, N 10.18; otrzymano C 63.13, H 6.55, N 9.93. **MS ESI**, (*m/z*) obliczono dla C₉₃H₁₁₄CoN₁₂O₁₉ [M-CN]⁺ 1761.8; otrzymano

1761.8, dla C₉₃H₁₁₃CoN₁₂O₁₉+Na⁺ [M-HCN+Na]⁺ 1783.7; otrzymano 1783.7; **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ε, L·mol⁻¹·cm⁻¹): 667 (8.39x10²), 629 (3.66x10³), 579 (1.32x10⁴), 542 (1.57x10⁴), 508 (1.49x10⁴), 409 (1.31x10⁵), 278 (2.27x10⁴). **¹H NMR** (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 12.27 (bs, 1H, COOH), 10.15 (bs, 1H, *meso* PPIX), 10.13 (m, 2H, *meso* PPIX), 10.09, 10.10 (s, s 1H, *meso* PPIX), 8.50-8.35 (m, 2H, winyl), 7.80, 7.97 (s, s, 1H, triazol), 6.61 (bd, *J* = 17 Hz, 2H, winyl), 6.20 (bd, *J* = 17 Hz, 2H, winyl), 5.51 (s, 1H, *meso* vit B₁₂), 5.01 (s, 2H), 4.37-4.25 (m, 4H), 4.11 (dd, *J* = 5.5 Hz, *J* = 11.0 Hz, 2H), 4.08-4.03 (m, 2H), 3.75-3.69 (m, 2H), 3.67 (s, 3H, CH₃), 3.66 (s, 3H, CH₃), 3.69-3.64 (m, 2H), 3.62 (s, 3H, CH₃), 3.59 (s, 3H, CH₃), 3.58 (s, 3H, CH₃), 3.61-3.53 (m, 3H), 3.51 (s, 3H, CH₃), 3.50 (s, 3H, CH₃), 3.54-3.45 (m, 2H), 3.44-3.36 (m, 3H), 3.26 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.16 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.12 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 2.85-2.71 (m, 3H), 2.65-2.54 (m, 3H), 2.46-2.34 (m, 3H), 2.33-2.17 (m, 5H), 2.19-1.90 (m, 3H), 2.03 (s, 3H, CH₃), 1.96 (s, 3H, CH₃), 1.90-1.78 (m, 3H), 1.76-1.64 (m, 3H), 1.64-1.53 (m, 1H), 1.50-1.42 (m, 3H), 1.40 (s, 3H, CH₃), 1.28 (s, 3H, CH₃), 1.24 (s, 3H, CH₃), 1.11 (s, 3H, CH₃), 1.09 (s, 3H, CH₃), 0.86 (s, 3H, CH₃), -4.20 (bs, 2H, NH pirol). **¹³C NMR** (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 175.4, 174.9, 174.8,

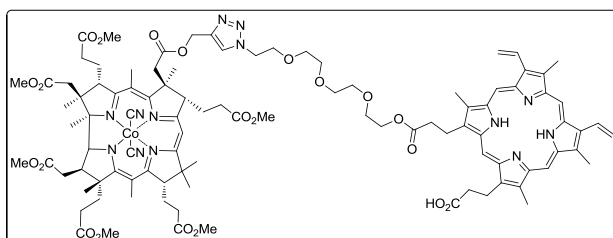
174.0, 173.1, 172.8, 172.4, 172.3, 172.27, 172.25, 171.5, 170.5, 169.5, 162.7, 162.4, 141.4, 130.0, 124.8, 121.0, 103.2, 101.6, 97.6, 97.3, 97.0, 96.9, 90.2, 82.1, 74.0, 68.2, 67.8, 63.1, 57.6, 57.3, 56.2, 53.3, 51.9, 51.6, 51.4, 51.2, 48.9, 47.9, 46.0, 45.2, 41.6, 41.0, 38.8, 36.7, 36.4, 34.2, 32.9, 31.4, 30.9, 30.5, 30.3, 30.2, 29.1, 26.3, 25.9, 25.2, 24.2, 22.0, 21.6, 21.2, 21.1, 18.8, 18.7, 17.5, 16.1, 15.1, 14.7, 13.9, 12.6, 11.3.



Hybryda 177ab. Wydajność: 58 %.

Analiza elementarna (%) obliczona dla $C_{96}H_{118}CoN_{13}O_{20}+2H_2O$: C 61.69, H 6.58, N 9.74; otrzymano C 61.55, H 6.51, N 9.48. **MS**

ESI, (m/z) obliczono dla $C_{95}H_{118}CoN_{12}O_{20}$ $[M-CN]^+$ 1805.79; otrzymano 1806.10; dla $C_{96}H_{118}CoN_{13}O_{20}Na$ $[M+Na]^+$ 1854.78, otrzymano 1855.0. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 629 (4.45×10^3), 579 (2.83×10^4), 542 (2.34×10^4), 508 (1.50×10^4), 406 (1.56×10^5). **1H NMR** (500 MHz, DMSO- d_6 , 358 K), δ (ppm): 10.20 (s, 1H), 10.16 (s, 1H), 10.14 (s, 2H), 8.42-8.29 (m, 2H), 7.80 (s, 1H), 6.47-6.35 (m, 2H), 6.24-6.16 (m, 2H), 5.66 (s, 1H), 5.08 (d, $J = 4.1$ Hz, 2H), 4.40-4.27 (m, 4H), 4.20 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H), 4.13-4.03 (m, 2H), 3.68 (s, 3H), 3.67 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.60 (s, 3H), 3.61 (s, 3H), 3.60 (s, 3H), 3.58 (s, 3H), 3.57 (s, 3H), 3.53 (s, 3H), 3.52 (s, 3H), 3.50-3.42 (m, 4H), 3.38-3.34 (m, 2H), 3.31-3.25 (m, 2H), 3.23-3.16 (m, 3H), 3.15-3.11 (m, 2H), 3.08-3.05 (m, 2H), 2.90-2.85 (m, 1H), 2.73 (dd, $J = 16.3$, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.67-2.59 (m, 2H), 2.58-2.50 (m, 4H), 2.45-2.09 (m, 6H), 2.08 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.01-1.72 (m, 4H), 1.64-1.49 (m, 2H), 1.46 (s, 3H), 1.34 (s, 3H), 1.28 (s, 3H), 1.20 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), -3.81 (bs, 2H). **^{13}C NMR** (125 MHz, DMSO- d_6 , 358 K), δ (ppm): 175.1, 174.6, 174.5, 173.1, 172.5, 172.2, 171.9, 171.7, 171.5, 170.9, 170.2, 169.0, 162.4, 162.3, 141.1, 136.8, 136.0, 129.6, 124.0, 120.5, 102.87, 101.2, 97.2, 96.8, 96.6, 96.3, 89.8, 81.8, 73.9, 68.93, 68.85, 67.9, 67.7, 62.8, 57.4, 57.0, 56.1, 53.4, 52.5, 51.3, 51.0, 50.8, 50.6, 48.8, 47.8, 45.9, 45.3, 41.7, 40.9, 36.2, 36.0, 32.7, 31.4, 30.4, 30.24, 30.17, 21.0, 28.8, 25.6, 24.9, 24.0, 21.0, 20.8, 18.5, 18.4, 17.0, 15.7, 14.6, 14.1, 11.8, 10.7.

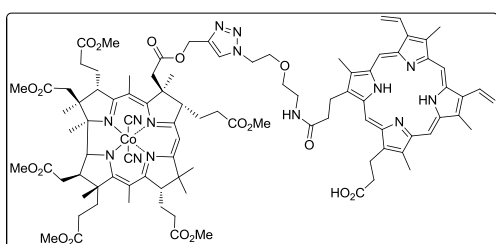


Hybryda 177ac. Wydajność: 61 %.

Analiza elementarna (%) obliczona dla $C_{98}H_{122}CoN_{13}O_{21}+3H_2O$: C 60.95, H 6.68, N 9.43; otrzymano C 61.26, H 6.37, N

9.19. **MS ESI**, (m/z): obliczono dla $C_{97}H_{122}CoN_{12}O_{21}$ $[M-CN]^+$ 1849.8; otrzymano 1850.1; dla $C_{98}H_{122}CoN_{13}O_{21}Na$ $[M+Na]^+$ 1898.8, otrzymano 1890.0. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 630 (3.98×10^3), 580 (2.75×10^4), 542 (2.12×10^4), 508 (1.67×10^4), 406 (1.70×10^5). **1H NMR** (500 MHz, DMSO- d_6 , 358 K), δ (ppm): 11.79 (bs, 1H), 10.21 (s, 1H), 10.17 (s, 1H), 10.15

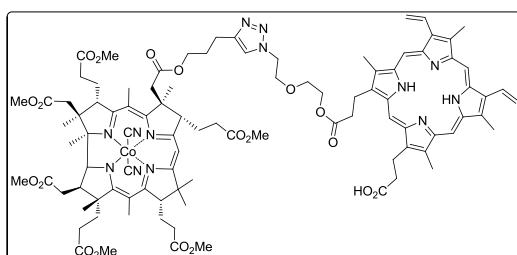
(s, 2H), 8.50-8.13 (m, 2H), 7.88 (s, 1H), 6.68-6.12 (m, 4H), 5.66 (s, 1H), 5.11 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H), 4.39-4.24 (m, 4H), 4.14-4.04 (m, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.67 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.61 (s, 6H), 3.60 (s, 3H), 3.59 i 3.58 (s, s, 3H), 3.54 (s, 3H), 3.53 (s, 3H), 3.39 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 3.32-3.26 (m, 2H), 3.24-3.11 (m, 8H), 3.08-3.04 (m, 2H), 2.94-2.89 (m, 1H), 2.73 (dd, $J = 7.5$, $J = 16.2$ Hz, 2H), 2.68-2.51 (m, 5H), 2.45-2.28 (m, 6H), 2.28-2.11 (m, 6H), 2.09 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.02-1.70 (m, 6H), 1.65-1.52 (m, 2H), 1.48 (s, 3H), 1.34 (s, 3H), 1.28 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), -3.80 (bs, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6 , 358 K), δ (ppm): 175.4, 174.4, 173.6, 173.3, 173.0, 172.8, 172.7, 171.9, 170.0, 162.9, 141.8, 130.5, 125.4, 102.1, 82.6, 69.7, 69.6, 68.8, 68.4, 63.8, 55.3, 52.4, 52.1, 51.8, 51.7, 49.6, 48.4, 45.7, 37.2, 36.9, 33.4, 31.1, 31.0, 30.8, 29.6, 22.0, 21.7, 19.3, 19.2, 18.0, 16.6, 15.6, 15.1, 11.0, 11.7, 10.8.



Hybryda 177ad. Wydajność: 27 %.

Analiza elementarna (%) obliczona dla $\text{C}_{94}\text{H}_{115}\text{CoN}_{14}\text{O}_{18} + \text{H}_2\text{O}$: C 62.52, H 6.53, N 10.86; otrzymano C 62.34, H 6.51, N 10.51. **MS ESI**, (m/z): obliczono dla $\text{C}_{93}\text{H}_{115}\text{CoN}_{13}\text{O}_{18}$ $[\text{M}-\text{CN}]^+$

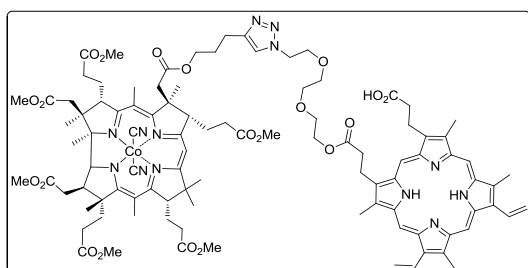
1760.78; otrzymano 1760.80; dla $\text{C}_{94}\text{H}_{115}\text{CoN}_{14}\text{O}_{18}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1809.77, otrzymano 1809.90. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): 630 (5.32×10^3), 578 (3.23×10^4), 540 (2.89×10^4), 508 (1.65×10^4), 406 (1.66×10^5). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6 , 358 K), δ (ppm): 14.36 (bs, 1H), 10.21 (s, 1H), 10.16 (s, 1H), 10.13 (s, 1H), 10.09 (s, 1H), 8.42-8.29 (m, 2H), 7.75 (bs, 1H), 7.69 (s, 1H), 6.45-6.34 (m, 2H), 6.24-5.15 (m, 2H), 5.54 (s, 1H), 5.09-5.01 (m, 2H), 4.37-4.24 (m, 4H), 4.03-3.95 (m, 2H), 3.69 (s, 2H), 3.68 (s, 3H), 3.66 and 3.65 (s, s, 3H), 3.64 (s, 3H), 3.62 (s, 6H), 3.59 and 3.56 (s, s, 3H), 3.58 (s, 3H), 3.55 (s, 3H), 3.54 (s, 3H), 3.52-3.48 (m, 2H), 3.38-3.32 (m, 4H), 2.90-2.84 (m, 2H), 2.78-2.70 (m, 2H), 2.70-2.52 (m, 6H), 2.47-2.36 (m, 6H), 2.36-2.11 (m, 8H), 2.09 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.01-1.75 (m, 6H), 1.64-1.49 (m, 2H), 1.46 (s, 3H), 1.36 (s, 3H), 1.30 (s, 3H), 1.21 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), -3.89 (bs, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6 , 358 K), δ (ppm): 175.1, 174.7, 174.5, 172.5, 172.2, 171.73, 171.71, 171.5, 171.4, 170.9, 170.2, 169.0, 162.4, 162.3, 141.1, 136.3, 129.7, 123.9, 120.4, 102.9, 101.2, 97.1, 96.7, 96.6, 96.5, 89.8, 81.8, 73.9, 68.4, 67.6, 57.4, 57.0, 56.1, 53.4, 52.5, 51.4, 51.0, 50.8, 50.6, 50.5, 48.6, 47.8, 45.6, 45.3, 38.1, 37.7, 32.7, 31.4, 30.4, 30.24, 30.18, 30.0, 28.9, 25.6, 24.9, 24.0, 21.6, 21.1, 18.5, 18.4, 17.1, 15.8, 14.7, 14.1, 11.8, 10.73, 10.71.



Hybryda 177ba. Wydajność 47%

Analiza elementarna (%) obliczona dla $\text{C}_{96}\text{H}_{118}\text{CoN}_{13}\text{O}_{19} + 2\text{H}_2\text{O}$: C 62.22, H 6.64, N 9.83; otrzymano C 62.31, H 6.69, N 9.61. **MS ESI**, (m/z):

obliczono dla $C_{96}H_{118}CoN_{13}O_{29} [M-CN]^+$ 1789.8; otrzymano 1789.9, dla $C_{96}H_{118}CoN_{13}O_{19}+Na^+$ $[M+Na]^+$ 1838.8, otrzymano 1838.9. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 629 (4.31×10^3), 574 (1.17×10^4), 540 (1.72×10^4), 505 (1.74×10^4), 406 (1.45×10^5), 276 (2.16×10^4). **1H NMR** (500 MHz, DMSO- d_6 , 358 K), δ (ppm): 14.40 (bs, 1H), 10.18 (s, 1H), 10.15 (s, 1H), 10.14 (s, 1H), 10.12 (s, 1H), 8.40-8.31 (m, 2H), 7.36 (s, 1H), 6.45-6.36 (m, 2H), 6.24-6.17 (m, 2H), 5.58 (s, 1H), 4.40-4.30 (m, 4H), 4.13-4.08 (m, 2H), 4.07-4.02 (m, 2H), 4.00-3.93 (m, 2H), 3.73 (d, $J = 10.0$ Hz, 2H), 3.70 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 3.67 i 3.66 (s,s, 3H), 3.65 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 3.61 (s, 2H), 3.60 (s, 3H), 3.58 (s, 3H), 3.55 (s, 3H), 3.54 (s, 3H), 3.52-3.47 (m, 3H), 3.44-3.39 (m, 3H), 3.29 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H), 3.24-3.17 (m, 3H), 2.92-2.86 (m, 2H), 2.78- 2.71 (m, 2H), 2.70-2.52 (m, 5H), 2.47-2.29 (m, 4H), 2.28-2.12 (m, 4H), 2.11 (s, 3H), 2.07 (m, 3H), 2.04-1.83 (m, 4H), 1.82-1.75 (m, 2H), 1.47 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.31 (s, 3H), 1.21 (s, 3H), 1.14 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), -3.86 (bs, 2H). **^{13}C NMR** (125 MHz, DMSO- d_6 , 358 K), δ (ppm) 175.1, 174.7, 174.5, 172.5, 172.2, 171.8, 171.74, 171.71, 171.5, 170.9, 170.3, 169.3, 162.5, 162.4, 162.3, 145.2, 143.9, 143.7, 136.7, 136.5, 135.9, 135.8, 129.64, 129.63, 129.61, 121.24, 120.51, 120.46, 102.8, 101.2, 97.2, 96.8, 96.6, 96.3, 89.8, 81.8, 73.9, 68.0, 67.6, 63.1, 62.7, 57.3, 56.1, 53.4, 52.4, 51.3, 50.96, 50.95, 50.8, 50.57, 50.55, 48.4, 47.7, 45.8, 45.3, 41.8, 40.8, 38.7, 36.3, 36.0, 31.4, 30.4, 30.3, 30.2, 28.8, 27.3, 25.5, 24.9, 24.0, 20.8, 18.49, 18.47, 17.0, 15.7, 14.6, 13.1, 11.8, 10.7.

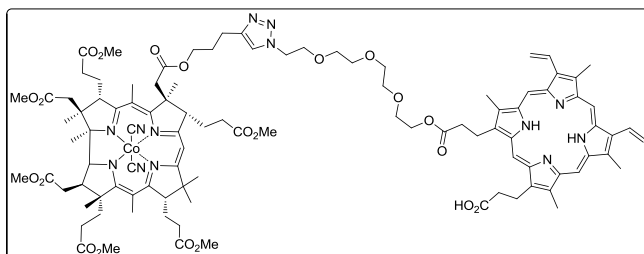


Hybryda 177bb. Wydajność 86%.

Analiza elementarna (%) obliczona dla $C_{98}H_{122}CoN_{13}O_{20}+ H_2O$: C 62.64, H 6.65, N 9.69; otrzymano C 62.50, H 6.74, N 9.44. **MS ESI**, (m/z): obliczono dla $C_{97}H_{122}CoN_{12}O_{20} [M-CN]^+$ 1833.8; otrzymano 1833.9; dla

$C_{98}H_{122}CoN_{13}O_{20}+Na^+ [M+Na]^+$: 1882.8, otrzymano 1882.9. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 629 (3.79×10^3), 574 (1.37×10^4), 541 (1.59×10^4), 506 (1.42×10^4), 406 (1.34×10^5), 277 (2.09×10^4). **1H NMR** (500 MHz, DMSO- d_6 , 358K), δ (ppm): 10.24 (s, 1H), 10.20 (s, 1H), 10.18 (s, 1H), 10.17 (s, 1H), 8.45-8.33 (m, 2H), 7.48 (s, 1H), 6.68-6.18 (m, 4H), 5.60 (m, 1H), 4.42-4.31 (m, 4H), 4.18-4.12 (m, 2H), 4.11-4.07 (m, 2H), 4.05-3.99 (m, 2H), 3.76-3.73 (m, 2H), 3.71 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.65 (s, 3H), 3.64 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.62 i 3.61 (s,s, 3H), 3.60 (s, 3H), 3.56 (s, 3H), 3.55 (s, 3H), 3.45-3.41 (m, 2H), 3.38-3.35 (m, 2H), 3.33-3.27 (m, 4H), 3.25-3.17 (m, 4H), 3.16 -3.12 (m, 2H), 3.09-3.05 (m, 2H), 2.95-2.89 (m, 1H), 2.80-2.70 (m, 1H), 2.69-2.50 (m, 6H), 2.47-2.15 (m, 10H), 2.13 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.07-1.74 (m 5H), 1.68-1.54 (m, 2H), 1.50 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.31 (s, 3H), 1.24 (s, 3H), 1.15 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), -4.50 (bs, 2H). **^{13}C NMR** (125 MHz, DMSO- d_6 , 358K), δ (ppm): 175.1, 174.6, 174.4, 173.1, 172.5, 172.23, 171.9, 171.71, 171.69, 171.5, 170.9, 170.3, 169.3, 162.5, 162.3, 145.2, 136.5, 136.0, 129.6, 121.3, 120.5, 102.8, 101.2, 97.3, 96.8, 96.6, 96.3, 89.8, 81.8, 73.9, 68.9, 68.9, 68.0, 67.7, 63.1, 62.81,

57.4, 56.0, 53.4, 52.5, 51.3, 50.9, 50.8, 50.6, 50.5, 48.5, 47.7, 45.9, 45.3, 41.8, 408, 38.7, 36.2, 36.0, 32.7, 31.4, 30.4, 30.3, 30.2, 30.0, 28.8, 27.4, 25.5, 24.9, 24.0, 21.1, 21.0, 20.9, 20.8, 18.5, 17.0, 15.7, 14.7, 14.2, 11.8, 10.7

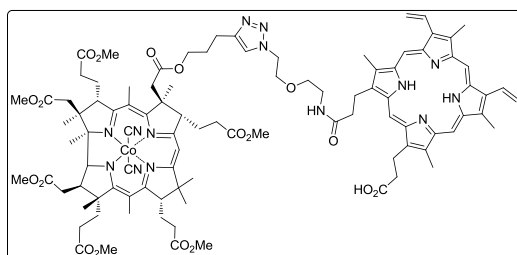


Hybryda 177bc. Wydajność: 41%.

Analiza elementarna (%) obliczona dla

$C_{100}H_{126}CoN_{13}O_{21}+H_2O$: C 62.46, H 6.71, N 9.47; otrzymano C 62.46, H 6.74, N 9.28. **MS ESI**, (m/z): obliczono dla $C_{99}H_{126}CoN_{12}O_{21}$ $[M-CN]^+$ 1877.85;

otrzymano 1878.00; dla $C_{100}H_{126}CoN_{13}O_{21}Na$ $[M+Na]^+$ 1926.84, otrzymano 1926.90. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 630 (4.78×10^3), 580 (2.91×10^4), 542 (2.33×10^4), 508 (1.67×10^4), 406 (1.82×10^5). **1H NMR** (500 MHz, DMSO- d_6 , 358 K), δ (ppm): 12.42 (bs, 1H), 10.00 (s, 2H), 9.97 (s, 1H), 9.92 i 9.90 (s, s, 2H), 8.41-8.22 (m, 2H), 7.57 (s, 1H), 6.42-6.29 (m, 2H), 6.22-6.08 (m, 2H), 5.60 (s, 1H), 4.35-4.16 (m, 6H), 4.05 (bs, 2H), 3.99 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 3.67 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.61 (s, 3H), 3.60 (s, 3H), 3.58 (s, 3H), 3.57 i 3.56 (s, s, 3H), 3.52 (s, 6H), 3.52 (s, 3H), 3.50 i 3.49 (s, 3H), 3.28-3.09 (m, 10H), 3.04-2.99 (m, 2H), 2.99-2.95 (m, 2H), 2.87-2.82 (m, 2H), 2.81-2.74 (m, 2H), 2.70-2.53 (m, 8H), 2.47-2.12 (m, 12H), 2.10 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.95-1.62 (m, 6H), 1.57-1.51 (m, 2H), 1.49 (s, 3H), 1.30 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.16 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), -4.50 (bs, 2H). **^{13}C NMR** (125 MHz, DMSO- d_6 , 358 K), δ (ppm): 175.5, 174.9, 174.8, 174.0, 173.1, 172.9, 172.5, 172.4, 172.3, 172.2, 171.5, 170.6, 169.9, 162.8, 162.4, 145.6, 129.9, 122.0, 120.8, 103.2, 101.6, 97.3, 97.0, 96.7, 96.6, 90.2, 82.1, 74.0, 69.3, 69.1, 68.4, 68.0, 63.5, 63.3, 57.6, 56.2, 53.4, 52.4, 51.9, 51.6, 51.6, 51.4, 51.2, 49.0, 47.9, 46.1, 45.2, 41.8, 41.0, 36.9, 36.4, 33.0, 31.4, 30.7, 30.5, 30.4, 30.3, 29.1, 27.7, 25.9, 25.2, 24.2, 21.7, 21.4, 21.2, 21.1, 18.9, 18.8, 17.4, 16.1, 15.2, 14.7, 13.9, 12.5, 11.2.



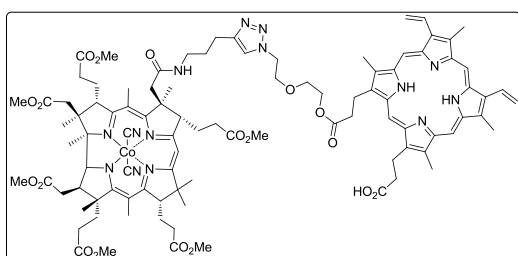
Hybryda 177bd. Wydajność: 60%.

Analiza elementarna (%) obliczona dla

$C_{96}H_{119}CoN_{14}O_{18}+H_2O$: C 62.87, H 6.65, N 10.69; otrzymano C 62.55, H 6.71, N 10.45. **MS ESI**, (m/z): obliczono dla $C_{95}H_{119}CoN_{13}O_{18}$ $[M-CN]^+$

1788.81; otrzymano 1789.00; dla $C_{96}H_{119}CoN_{14}O_{18}Na$ $[M+Na]^+$ 1837.81; otrzymano 1837.90. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 630 (6.01×10^3), 580 (3.91×10^4), 542 (3.55×10^4), 508 (2.50×10^4), 406 (1.98×10^5). **1H NMR** (500 MHz, DMSO- d_6 , 358 K), δ (ppm): 14.30 (bs, 1H), 10.26 (s, 1H), 10.25 (s, 1H), 10.21 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 8.46-8.34 (m, 2H), 7.67 (bs, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.48-6.37 (m, 2H), 6.26-6.15 (m, 2H), 5.59 (s, 1H), 4.41-4.28 (m, 4H), 4.02-3.95 (m, 2H), 3.94-3.84 (m, 2H), 3.73 i 3.72 (s, s, 3H), 3.71 i 3.70 (s, s, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.64 (s, 3H), 3.63 (s,

6H), 3.62 (s, 3H), 3.61 i 3.60 (s, s, 3H), 3.56 (s, 3H), 3.55 (s, 3H), 3.53-3.45 (m, 4H), 3.25-3.16 (m, 4H), 3.16-3.11 (m, 6H), 2.95-2.90 (m, 3H), 2.90 -2.71 (m, 2H), 2.71-2.52 (m, 5H), 2.48-2.33 (m, 6H), 2.24-2.13 (m, 4H), 2.12 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 1.84-1.76 (m, 4H), 1.67-1.53 (m, 3H), 1.49 (s, 3H), 1.36 (s, 3H), 1.31 (s, 3H), 1.23 (s, 3H), 1.14 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), -3.73 (bs, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6 , 358 K), δ (ppm): 175.1, 174.7, 174.5, 172.5, 172.3, 171.7, 171.6, 171.0, 170.3, 169.3 162.5, 129.7, 121.2, 120.6, 102.8, 96.8, 89.8, 81.8, 68.4, 67.7, 63.1, 57.4, 52.5, 51.3, 51.0, 50.8, 50.59, 50.57, 48.4, 47.7, 45.9, 45.3, 41.8, 39.5, 39.3, 39.2, 39.0, 38.7, 38.1, 37.8, 32.7, 30.4, 30.3, 30.2, 30.0. 28.9, 27.3, 25.5, 25.0, 24.0, 21.6, 21.1, 18.5, 17.1, 15.8, 14.7, 14.2, 11.8, 10.8.



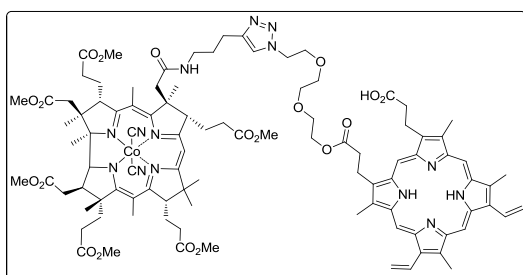
Hybryda 177da. Wydajność: 70 %.

Analiza elementarna (%) obliczona dla $\text{C}_{96}\text{H}_{119}\text{CoN}_{14}\text{O}_{18}+2\text{H}_2\text{O}$: C 62.26, H 6.69, N 10.59; otrzymano C 62.45, H 6.85, N 10.23. **MS ESI**, (m/z): obliczono dla $\text{C}_{95}\text{H}_{119}\text{CoN}_{13}\text{O}_{18}$ $[\text{M}-\text{CN}]^+$

1788.81; otrzymano 1788.90; dla $\text{C}_{96}\text{H}_{119}\text{CoN}_{14}\text{O}_{18}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1837.81; otrzymano 1837.90.

UV/Vis (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): 630 (4.38×10^3), 579 (4.87×10^4), 542 (2.73×10^4), 508 (1.76×10^4), 406 (1.45×10^5). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , 358 K), δ (ppm): 10.16 (s, 1H), 10.13 (s, 1H), 10.10 (s, 2H), 8.40-8.21 (m, 2H), 7.60-7.52 (m, 1H), 7.34 (s, 1H), 6.44-6.35 (m, 2H), 6.22-6.12 (m, 2H), 5.52 (s, 1H), 4.39-4.25 (m, 4H), 4.11-4.04 (m, 2H), 4.05-4.00 (m, 2H),

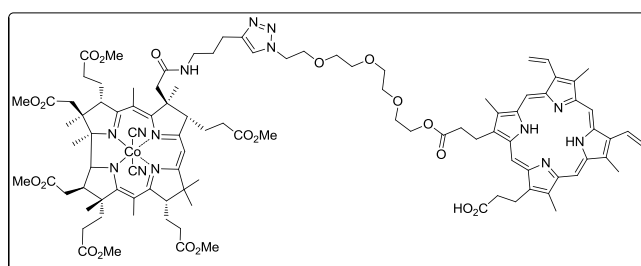
3.68 (s, 3H), 3.67 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.62 i 3.61 (s, s, 3H), 3.60 (s, 3H), 3.59 (s, 3H), 3.57 (s, 3H), 3.55 (s, 3H), 3.54 (s, 3H), 5.53 (s, 3H), 3.49-3.46 (m, 2H), 3.42-3.37 (m, 2H), 3.30-3.14 (m, 6H), 3.13-3.04 (m, 2H), 2.93-2.83 (m, 2H), 2.77-2.69 (m, 2H), 2.68-2.51 (m, 4H), 2.46-2.08 (m, 11H), 2.07 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.96-1.70 (m, 6H), 1.67-1.53 (m, 4H), 1.48 (s, 3H), 1.34 (s, 3H), 1.28 (s, 3H), 1.20 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), -3.87 (bs, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6 , 358 K), δ (ppm): 174.9, 174.7, 174.4, 173.1, 172.5, 172.3, 171.8, 171.7, 171.5, 171.0, 170.9, 168.4, 162.5, 162.4, 145.6, 136.7, 136.0, 135.8, 129.6, 121.2, 120.5, 103.6, 101.1, 97.2, 96.8, 96.6, 96.3, 90.1, 81.8, 73.8, 68.1, 67.7, 62.7, 57.4, 56.0, 54.6, 52.5, 51.3, 51.0, 50.9, 50.8, 50.6, 49.1, 48.4, 45.8, 45.4, 43.7, 41.0, 37.9, 36.2, 36.0, 32.7, 31.6, 30.6, 30.4, 30.2, 28.8, 28.1, 27.9, 27.8, 25.5, 24.9, 24.0, 22.1, 21.4, 21.0, 20.9, 20.8, 18.5, 17.8, 17.0, 15.8, 14.6, 14.2, 13.2, 11.8, 10.7.



Hybryda 177db. Wydajność: 56 %.

Analiza elementarna (%) obliczona dla $\text{C}_{98}\text{H}_{123}\text{CoN}_{14}\text{O}_{19}+2\text{H}_2\text{O}$: C 62.08, H 6.75, N 10.34; otrzymano C 61.83, H 6.85, N 10.03. **MS ESI**, (m/z): obliczono dla $\text{C}_{97}\text{H}_{123}\text{CoN}_{13}\text{O}_{19}$ $[\text{M}-\text{CN}]^+$

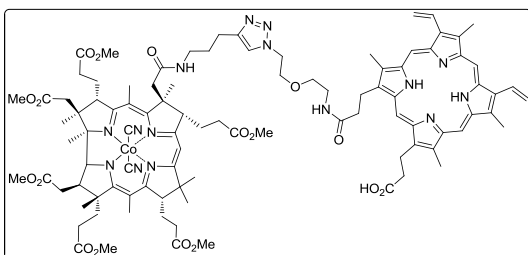
1832.84; otrzymano 1833.4. **UV/Vis** (DCM) λ_{\max} (nm) (ϵ , L·mol⁻¹·cm⁻¹): 630 (5.22x10³), 580 (2.84x10⁴), 543 (4.43x10⁴), 508 (2.32x10⁴), 406 (2.01x10⁵). **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-d₆, 358 K), δ (ppm): 10.09 (s, 1H), 10.08 (s, 2H), 10.05 (s, 1H), 8.36-8.25 (m, 2H), 7.36 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 6.41-6.31 (m, 2H), 6.22 (m, 2H), 5.66 (s, 1H), 4.37-4.25 (m, 4H), 4.13 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H), 4.10-4.05 (m, 2H), 3.68 (s, 3H), 3.63 (s, 6H), 3.61 (s, 9H), 3.57 (s, 3H), 3.56 (s, 3H), 3.55 (s, 3H), 3.54 (s, 3H), 3.44-3.39 (m, 2H), 3.37-3.33 (m, 2H), 3.32-3.24 (m, 4H), 3.20-3.09 (m, 4H), 2.96-2.87 (m, 4H), 2.78-2.70 (m, 2H), 2.68-2.51 (m, 4H), 2.45-2.25 (m, 11H), 2.25-2.11 (m, 2H), 2.09 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.98-1.86 (m, 4H), 1.86-1.72 (m, 2H), 1.68-1.56 (m, 4H), 1.51 (s, 3H), 1.35 (s, 3H), 1.29 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), -3.98 (bs, 2H). **¹³C NMR** (125 MHz, DMSO-d₆, 358 K), δ (ppm): 174.9, 174.7, 174.5, 172.5, 172.3, 171.8, 171.7, 171.5, 171.1, 170.9, 168.5, 162.5, 162.4, 136.7, 129.61, 129.58, 121.2, 120.4, 103.6, 101.0, 97.1, 96.6, 96.5, 96.2, 90.1, 81.8, 73.8, 68.9, 68.8, 68.0, 67.7, 62.8, 57.4, 56.0, 54.7, 52.5, 51.3, 51.0, 50.9, 50.8, 50.6, 49.2, 48.6, 45.8, 45.4, 43.7, 41.0, 37.9, 36.0, 32.7, 31.4, 30.4, 30.2, 28.8, 28.2, 25.6, 24.9, 24.0, 22.2, 21.0, 20.8, 18.5, 17.9, 17.0, 15.8, 14.6, 14.7, 11.7, 10.7.



Hybryda 177dc. Wydajność: 39 %.

Analiza elementarna (%) obliczona dla C₁₀₀H₁₂₇CoN₁₄O₂₀+2H₂O: C 61.91, H 6.81, N 10.11; otrzymano C 62.04, H 6.54, N 9.97. **MS ESI, (m/z):** obliczono dla C₉₉H₁₂₇CoN₁₃O₂₀ [M-CN]⁺ 1876.89;

otrzymano 1877.00. **UV/Vis** (DCM), λ_{\max} (nm) (ϵ , L·mol⁻¹·cm⁻¹): 630 (4.45x10³), 580 (2.83x10⁴), 541 (2.34x10⁴), 508 (2.13x10⁴), 406 (1.78x10⁵). **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-d₆, 358 K), δ (ppm): 14.37 (bs, 1H), 10.27 (s, 1H), 10.21 (s, 1H), 10.20 (s, 1H), 10.18 (s, 1H), 8.45-8.29 (m, 2H), 7.65 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 7.52 (s, 1H), 6.48-6.37 (m, 2H), 6.24-6.16 (m, 2H), 5.57 (s, 1H), 4.40-4.30 (m, 4H), 4.24 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H), 4.12-4.05 (m, 2H), 3.72 i 3.71 (s, s, 3H), 3.70 i 3.69 (s, s, 3H), 3.67 (s, 3H), 3.64 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.61 (s, 3H), 3.60 (s, 3H), 3.59 i 3.57 (s, s, 3H), 3.54 (s, 3H), 3.53 (s, 3H), 3.39-3.32 (m, 4H), 3.29 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.22-3.09 (m, 4H), 2.74 (dd, $J = 7.5$, $J = 16.1$ Hz, 2H), 2.68-2.54 (m, 6H), 2.45-2.26 (m, 10H), 2.25-2.11 (m, 5H), 2.10 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.06-1.73 (m, 12H), 1.67-1.60 (m, 4H), 1.51 (s, 3H), 1.35 (s, 3H), 1.29 (s, 3H), 1.23 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), -3.72 (bs, 2H). **¹³C NMR** (125 MHz, DMSO-d₆, 358 K), δ (ppm): 175.5, 174.9, 174.8, 174.0, 173.1, 172.9, 172.5, 172.4, 172.3, 172.2, 171.5, 170.6, 169.9, 162.8, 162.4, 145.6, 129.9, 122.0, 120.8, 103.2, 101.6, 97.3, 97.0, 96.7, 96.6, 90.2, 82.1, 74.0, 69.3, 69.1, 68.4, 68.0, 63.5, 63.3, 57.6, 56.2, 53.4, 52.4, 51.9, 51.6, 51.6, 51.4, 51.2, 49.0, 47.9, 46.1, 45.2, 41.8, 41.0, 36.9, 36.4, 33.0, 31.4, 30.7, 30.5, 30.4, 30.3, 29.1, 27.7, 25.9, 25.2, 24.2, 21.7, 21.4, 21.2, 21.1, 18.9, 18.8, 17.4, 16.1, 15.2, 14.7, 13.9, 12.5, 11.2.

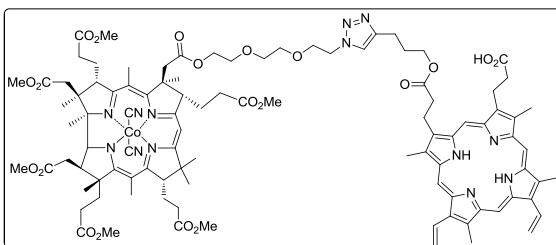


Hybryda 177dd. Wydajność: 79 %.

Analiza elementarna (%) obliczona dla $C_{96}H_{120}CoN_{15}O_{17}+2H_2O$: C 62.29, H 6.75, N 11.35; otrzymano C 62.11, H 6.82, N 11.07.

MS ESI, (*m/z*): obliczono dla $C_{95}H_{120}CoN_{14}O_{17}$ $[M-CN]^+$ 1787.83; otrzymano 1787.90. **UV/Vis**

(DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 630(4.45×10^3), 580 (2.83×10^4), 541 (2.34×10^4), 508 (1.50×10^4), 406 (1.60×10^5). **1H NMR** (500 MHz, DMSO- d_6 , 358 K), δ (ppm): 14.40 (bs, 1H), 10.19, (s, 1H), 10.13 (s, 1H), 10.10 (s, 1H), 10.06 (s, 1H), 8.39 (m, 2H), 7.84 (bs, 1H), 7.61 (bs, 1H), 7.29 (s, 1H), 6.43-6.35 (m, 2H), 6.22-6.13 (m, 2H), 5.52 (s, 1H), 4.34-4.19 (m, 4H), 3.93-2.85 (m, 2H), 3.67 (s, 3H), 3.66 i 3.65 (s, s, 3H), 3.64 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.60 (s, 3H), 3.59 (s, 3H), 3.56 (s, 3H), 3.55 (s, 3H), 3.54 (s, 6H), 3.51-3.46 (m, 3H), 3.32-3.26 (m, 4H), 3.10-3.00 (m, 5H), 2.94-2.82 (m, 4H), 2.78-2.69 (m, 2H), 2.68-2.51 (m, 4H), 2.45-2.40 (m, 4H), 2.38-2.34 (m, 3H), 2.33-2.09 (m, 6H), 2.08 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 1.96-1.71 (m, 4H), 1.65-1.53 (m, 4H), 1.48 (s, 3H), 1.34 (s, 3H), 1.29 (s, 3H), 1.21 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), -3.92 (bs, 2H). **^{13}C NMR** (500 MHz, DMSO- d_6 , 358 K), δ (ppm): 174.9, 174.7, 174.5, 172.5, 172.3, 171.7, 171.6, 171.0, 170.9, 168.5, 162.5, 162.4, 129.7, 121.2, 120.4, 103.6, 96.8, 96.6, 96.2, 90.1, 81.8, 73.8, 68.4, 67.7, 57.4, 56.0, 52.5, 51.3, 51.0, 50.8, 50.6, 49.1, 48.4, 45.8, 45.4, 38.1, 37.9, 32.7, 31.4, 30.4, 30.2, 28.8, 28.2, 25.5, 25.0, 24.0, 22.1, 21.7, 21.0, 18.5, 17.8, 17.0, 15.8, 14.6, 14.2, 11.8, 10.7.



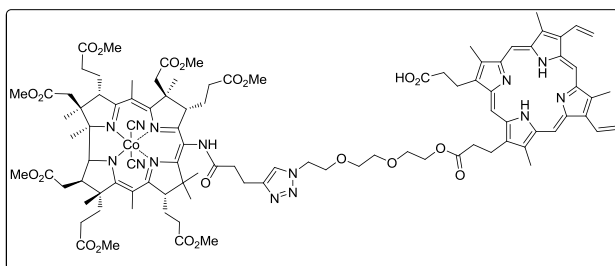
Hybryda 178. Wydajność: 73 %.

Analiza elementarna (%) obliczona dla $C_{98}H_{122}CoN_{13}O_{20}+2H_2O$: C 62.05, H 6.69, N 9.60; otrzymano C 62.12, H 6.92, N 9.44. **MS**

ESI, (*m/z*): obliczono dla $C_{97}H_{122}CoN_{12}O_{20}$ $[M-$

$CN]^+$ 1833.82; otrzymano 1833.80; dla $C_{98}H_{122}CoN_{13}O_{20}Na[M+Na]^+$ 1882.82; otrzymano 1882.70. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 630 (3.97×10^3), 580 (2.01×10^4), 542 (2.55×10^4), 508 (1.86×10^4), 406 (1.72×10^5). **1H NMR** (500 MHz, DMSO- d_6 , 358 K), δ (ppm): 14.30 (bs, 1H), 10.20 (s, 1H), 10.12 i 10.10 (s, s, 1H), 10.07 (s, 1H), 10.04 (s, 1H), 8.47-8.17 (m, 2H), 7.22 (s, 1H), 6.46 (m, 2H), 6.21 (m, 2H), 5.56 (s, 1H), 4.39-4.14 (m, 4H), 4.11-3.99 (m, 4H), 3.70 and 3.69 (s, s, 3H), 3.68 (s, 3H), 3.63 (s, 6H), 3.62 (s, 3H), 3.60 (s, 3H), 3.57 (s, 3H), 3.55 (s, 3H), 3.54 (s, 3H), 3.53 (s, 3H), 3.47-3.01 (m, 15H), 2.79-2.67 (m, 4H), 2.64-2.51 (m, 4H), 2.45-2.14 (m, 12H), 2.10 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.00-1.84 (m, 4H), 1.83-1.55 (m, 6H), 1.49 (s, 3H), 1.35 (s, 3H), 1.29 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), -3.97 (bs, 2H). **^{13}C NMR** (500 MHz, DMSO- d_6 , 358 K), δ (ppm): 175.1, 174.5, 172.5, 172.3, 171.9, 171.7, 171.5, 170.9, 170.3, 169.2, 162.5, 136.4, 136.2, 130.6, 129.7, 129.6, 120.4, 118.8, 102.9, 96.9, 96.5, 96.2, 89.8, 81.8, 69.1, 69.1, 68.2, 67.7, 63.0, 62.8, 57.4, 56.1, 53.4, 52.5, 51.3, 51.0, 50.8, 50.6, 50.3, 48.7, 48.1, 47.7,

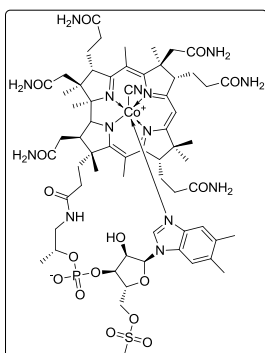
45.9, 45.3, 41.8, 40.9, 36.6, 36.1, 32.7, 31.4, 30.4, 30.3, 30.2, 28.9, 27.4, 25.5, 24.9, 24.0, 21.1, 20.9, 18.5, 17.1, 15.8, 14.7, 14.2, 12.0, 11.8, 10.7.



Hybryda 179: Wydajność: 64%.

Analiza elementarna (%) obliczona dla $C_{99}H_{123}CoN_{14}O_{21}+2H_2O$: C 61.29, H 6.60, N 10.11; otrzymano C 61.03, H 6.75, N 10.84. **MS ESI**, (m/z): obliczono dla $C_{98}H_{123}CoN_{13}O_{21}$ $[M-CN]^+$ 1876.83;

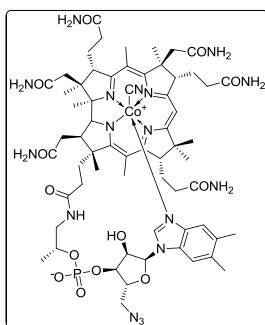
otrzymano 1876.90; dla $C_{99}H_{123}CoN_{14}O_{21}Na$ $[M+Na]^+$ 1925.82; otrzymano: 1925.90. **UV/Vis** (DCM), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot m^{-1} \cdot cm^{-1}$): (5.47x10³), 574 (1.29x10⁴), 541 (1.70x10⁴), 505 (1.69x10⁴), 406 (1.48x10⁵). **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-d₆, 358 K), δ (ppm): 10.08 (s, 1H), 10.07 (s, 1H), 10.05 (s, 1H), 10.02 i 10.00 (s, s, 1H), 9.06 (s, 1H), 8.43-8.31 (m, 2H), 7.62 (s, 1H), 6.41-6.30 (m, 2H), 6.22-6.12 (m, 2H), 4.33-4.19 (m, 4H), 4.16-4.09 (m, 2H), 4.06-3.99 (m, 2H), 3.65 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 3.61 (s, 3H), 3.60 (s, 3H), 3.59 (s, 3H), 3.54 (s, 3H), 3.51 (s, 3H), 3.49 (s, 3H), 3.46 (s, 3H), 3.45 (s, 3H), 3.42 (m, 2H), 3.36-3.27 (m, 5H), 3.26-3.21 (m, 4H), 3.20-3.15 (m, 2H), 3.14-3.07 (m, 2H), 3.05-3.00 (m, 2H), 2.94-2.90 (m, 2H), 2.86-2.67 (m, 4H), 2.63-2.51 (m, 4H), 2.45-2.23 (m, 8H), 2.22-2.09 (m, 4H), 2.05 (s, 3H), 2.02-1.85 (m, 6H), 1.82 (s, 3H), 1.75-1.52 (m, 6H), 1.27 (s, 3H), 1.23 (s, 3H), 1.08 (s, 3H), 1.07 (s, 3H), 0.62 (s, 3H), -4.30 (bs, 2H). **¹³C NMR** (500 MHz, DMSO, 358 K), δ (ppm): 174.7, 173.8, 173.0, 172.8, 172.6, 172.04, 171.97, 171.9, 171.8, 171.4, 171.1, 170.3, 162.9, 161.5, 145.1, 129.6, 129.6, 121.7, 103.7, 103.2, 101.0, 97.0, 96.7, 96.4, 81.7, 73.1, 68.7, 68.6, 67.9, 67.6, 62.8, 56.9, 55.4, 53.1, 51.5, 51.2, 51.0, 50.7, 50.6, 48.4, 46.6, 46.4, 44.8, 36.1, 34.3, 32.5, 30.8, 30.1, 29.8, 29.3, 29.2, 28.6, 24.9, 24.6, 23.9, 21.3, 21.1, 20.7, 20.3, 17.7, 16.6, 15.8, 14.9, 14.4, 13.5, 12.1, 10.8.



Mesylan 180. Witaminę B₁₂ (1360 mg, 1.0 mmol) rozpuszczono w NMP (5 mL). Do otrzymanego roztworu dodawano w godzinnych odstępach 3 porcje roztworu chlorku mesylu (500mg, 4.4 mmol) w NMP (2.7 ml) i DIPEA (2.7 ml). Po dodaniu ostatniej porcji, mieszaninę reakcyjną mieszano przez godzinę a następnie rozcieńczono wodą destylowaną (100 ml) i przemyto DCM (3 porcje po 100 ml). Fazę wodną ekstrahowano roztworem fenolu w DCM (20g fenolu w 20 ml DCM). Fazę organiczną przemyto wodą destylowaną (3 porcje po 20 ml) a następnie rozcieńczono DCM do objętości 200 ml i ekstrahowano wodą destylowaną porcjami po 20 ml do uzyskania bezbarwnej fazy organicznej. Zebrane fazy wodne przemyto DCM (100 ml) a następnie odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość po odparowaniu rozworzono

w MeOH (10 ml), wytrącono eterem dietylowym, odwirowano i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując mesylan **180** o czystości >95% (HPLC). Wydajność 1290 mg, 90%.

Próbka analityczna została dodatkowo oczyszczona metodą chromatografii kolumnowej na odwróconych fazach stosując mieszaninę woda/MeOH jako eluent (10-20% v/v). **MS ESI**, (m/z): obliczono dla $C_{64}H_{90}CoN_{14}O_{16}PS+Na$ $[M+Na]^+$ 1455.5; otrzymano: 1455.8. **UV/Vis** (H_2O), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 361 (2.34×10^4). **1H NMR** (500 MHz, $DMSO-d_6$), δ (ppm): 7.83 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.36 (bs, 2H), 7.15 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 7.06 (s, 1H), 7.03 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.78 (s, 1H), 6.72 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.44 (s, 1H), 6.36 (bs, 1H), 6.30 (s, 1H), 5.90 (s, 1H), 4.74-6.61 (m, 3H), 4.55 (dd, $J = 9.4$, $J = 30.4$ Hz, 2H), 4.19-4.10 (m, 2H), 3.98 (bs, 1H), 3.94 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H), 3.70 (dd, $J = 5.5$, $J = 9.6$ Hz, 1H), 3.54-3.44 (m, 2H), 3.28 (s, 3H), 3.06 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 2.86-2.72 (m, 3H), 2.68-2.55 (m, 2H), 2.47 (s, 3H), 2.44 (bs, 1H), 2.38 (s, 3H), 2.37-2.34 (m, 1H), 2.33-2.20 (m, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.08-1.96 (m, 3H), 1.86-1.56 (m, 6H), 1.69 (s, 3H), 1.54-1.46 (m, 1H), 1.32 (s, 3H), 1.23 (s, 3H), 1.17 (s, 3H), 1.15-1.02 (m, 4H), 1.06 (s, 3H), 0.89 (bs, 1H), 0.30 (s, 3H). **^{13}C NMR** (125 MHz, $DMSO-d_6$), δ (ppm): 179.6, 178.3, 175.2, 173.7, 173.3, 172.9, 172.6, 172.5, 171.2, 171.1, 165.4, 164.7, 142.3, 136.3, 132.7, 131.4, 129.7, 116.4, 111.5, 105.9, 103.0, 93.6, 85.9, 84.4, 79.2, 79.1, 74.8, 71.7, 70.7, 69.0, 68.8, 58.6, 55.0, 54.0, 53.2, 52.4, 52.3, 50.4, 47.4, 46.6, 45.0, 42.1, 41.7, 38.2, 36.8, 35.8, 35.1, 33.85, 31.8, 31.2, 30.0, 27.0, 25.8, 25.6, 20.3, 20.2, 20.0, 19.9, 19.7, 18.7, 16.53, 16.45, 15.7, 15.1 **HPLC**: $t_r = 14.18$ min.



Azydek 181. Mesylan **180** (720 mg, 0.5 mmol) rozpuszczono w HMPA (5 ml). Do otrzymanego roztworu dodano NaN_3 (325 mg, 5.0 mmol) i intensywnie mieszano w 40 °C przez noc. Mieszaninę preakcyjną rozcieńczono wodą destylowaną (150 ml) i DCM (3 porcje po 100 ml). Fazę wodną ekstrahowano roztworem fenolu w DCM (20 g fenolu w 20 ml DCM). Fazę organiczną przemywano wodą destylowaną (3 porcje po 20 ml) a następnie rozcieńczono DCM

do objętości 200 ml i ekstrahowano wodą destylowaną porcjami po 20 ml do uzyskania bezbarwnej fazy organicznej. Zebrane fazy wodne przemyto DCM (100 ml) a następnie odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość po odparowaniu roztworzono w MeOH (5 ml), wytrącono eterem dietylowym, odwirowano i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując azydek **181** o czystości >98% (HPLC). Wydajność 640 mg, 93%.

Próbka analityczna została dodatkowo oczyszczona metodą chromatografii kolumnowej na odwróconych fazach stosując mieszaninę woda/MeOH jako eluent (10-20% v/v).

MS ESI, (m/z): obliczono dla $C_{63}H_{87}CoN_{17}O_{13}P+Na$ $[M+Na]^+$ 1402.5; otrzymano 1402.6.

IR (KBr), ν (cm^{-1}): 3386, 3192, 2969, 2935, 2106, 2028, 1667, 1573, 1497, 1449, 1401, 1350, 1217, 1144, 1110, 1075, 868, 848, 560. **UV/Vis** (H_2O), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 361

(2.52×10^4). **^1H NMR** (600 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 8.02 (s, 1H, NH amid), 7.93 (s, 1H, NH amid), 7.65 (s, 1H, NH amid), 7.60 (s, 1H, NH amid), 7.55 (s, 1H, NH amid), 7.39 (s, 1H, B7), 7.36 (s, 1H, NH amid), 7.12 (s, 1H, NH amid), 7.10 (s, 1H, NH amid), 7.04 (s, 2H, B2 i NH amid), 6.99 (s, 1H, NH amid), 6.79 (s, 1H, NH amid), 6.74 (s, 1H, NH amid), 6.55 (s, 1H, NH amid), 6.45 (s, 1H, B4), 6.34 (bs, 1H, R2-OH), 6.32 (s, 1H, R1) 5.92 (s, 1H, 10), 4.73 (s, 1H, 3), 4.58 (s, 1H, R3), 4.14 - 4.06 (m, 1H, Pr2), 4.06-4.01 (d, $J = 7.2$ Hz, R1), 3.98 (bs, 1H, R2), 3.95 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, 19), 3.86 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H, R5), 3.76-3.68 (m, 1H, 8), 3.59 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H, R5), 3.50-3.43 (m, 1H, Pr1), 3.10 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H, 13), 2.87-2.80 (m, 1H, Pr1), 2.79-2.72 (bs, 1H, 18), 2.69-2.58 (m, 2H 56 lub 55 i 42 lub 41), 2.47 (s, 3H, 35), 2.49-2.32 (m, 6H, 30 lub 31, 37, 49, 55, 56), 2.39 (s, 3H, 53), 2.30-2.12 (m, 2H, 26, 30 lub 31), 2.17 (s, 3H, B10), 2.16 (s, 3H, B11), 2.08-1.93 (m, 2H, 26, 42 lub 41), 1.85-1.58 (m, 6H, 30 lub 31, 37, 41 lub 42, 48, 55 lub 56), 1.70 (s, 3H, 36), 1.59-1.50 (m, 1H, 60), 1.32 (s, 3H, 47), 1.24 (s, 3H, 54), 1.23-1.15 (m, 1H, 60), 1.17 (s, 3H, 25), 1.08 (s, 3H, 46), 1.03 (d, $J = 5.9$ Hz 3H, Pr3), 0.92 (bs, 1H, 41 lub 42), 0.29 (s, 3H, 20). **^{13}C NMR** (150 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 179.6 (4), 178.3 (16), 175.3 (11), 173.74 (9), 173.66 (C=O amid), 173.3 (C=O amid), 172.9 (C=O amid), 172.7 (C=O amid), 172.6 (C=O amid), 171.2 (C=O amid), 171.1 (C=O amid), 165.4 (6), 164.6 (14), 142.2 (B2), 136.3 (B9), 132.7 (B6), 131.6 (B5), 129.7 (B8), 116.4 (B4), 111.6 (B7), 105.9 (C5), 103.1 (15), 93.5 (10), 85.9 (R1), 84.4 (1), 80.2 (R4), 74.8 (19), 72.8 (R3), 70.6 (Pr2), 68.9 (R2), 58.6 (17), 55.0 (3), 54.0 (8), 53.2 (13), 51.2 (R5), 50.3 (7), 47.4 (12), 46.6 (2), 44.8 (Pr1), 42.2 (37), 41.5 (26), 38.2 (18), 35.2 (31 lub 30), 34.0 (49), 31.9 (60), 31.7 (46,56 lub 55), 31.2 (55 lub 56), 30.0 (42 lub 41), 26.9 (48), 26.0 (41 lub 42), 25.6 (30 lub 31), 20.23 i 20.19 (Pr3), 20.0 (47), 19.96 (B11), 19.86 (B10), 19.74 (20), 18.7 (36), 16.47 (54), 16.43 (25), 15.7 (35), 15.2 (53). **HPLC**: $t_r = 13.90$ min.

Przypisanie sygnałów w widmach ^1H i ^{13}C NMR dla azydku **181**.

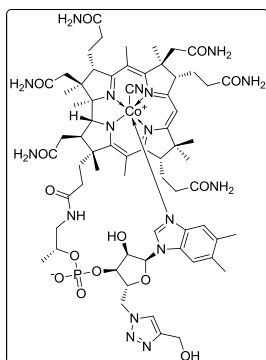
Przypisanie	^{13}C NMR [ppm]	Obserwowane korelacje		Przypisanie	^{13}C NMR [ppm]	Obserwowane korelacje	
		HQSC [ppm]	HMBC			HQSC [ppm]	HMBC
4	179.6		C3, C35	3	55.0	4.71	C25
16	178.3		C53, C54	8	54.0	3.71	C10, C35 ^b , C36, C37
11	175.3		C10, C13, C46, C47	13	53.2	3.10	C46, C47, C49 ^b
9	173.74		C10	R5	51.2	3.86; 3.59	R3 ^b
	173.66			7	50.3		C8, C35 ^b , C36, C37 ^b , C42 ^b
	173.3			12	47.4		C10, C13, C46, C47, C48
27, 32, 38, 43, 50, 57, 60 ^a	172.9			2	46.6		C3, C25, C26, C20
	172.7			Pr1	44.8	3.46; 2.83	Pr3
	172.6			37	42.2	2.46; 1.72	C8, C30, C35
	171.2			26	41.5	2.21; 2.04	C3, C25
	171.1			18	38.2	2.77	C19, C54, C55, C56
6	165.4		C8, C35, C36	31 lub 30	35.2	2.28; 2.22	C3
14	164.6		C13, C53	49	34.0	2.38	C13, C47, C48
B2	142.2	7.04	R1	60	31.9	1.54; 1.20	C19, C55
B9	136.3		B2, B7	46; 56 lub 55	31.7	1.07; 2.54 1.201.20; 2.47	C13, C47
B6	132.7		B4, B10	55 lub 56	31.2	2.38; 1.77	C54
B5	131.6		B7, B11	42 lub 41	30.0	2.63; 2.02	
B8	129.7		B2, B4	48	26.9	2.02; 1.65	C13, C46, C53
B4	116.4	6.45	B10	41 lub 42	26.0	1.77; 0.92	C8, C36
B7	111.6	7.40	B11	30 lub 31	25.6	1.77; 1.66	C3, C31
5	105.9		C35		20.23		
15	103.1		C13, C53	Pr3	20.19	1.03	
10	93.5	5.92	C8	47	20.06	1.32	C46
R1	85.9	6.32	R2, R ^b	B11	19.96	2.16	B7
1	84.4		C3, C19, C20, C25	B10	19.86	2.17	B4
R4	80.2	4.03	R5 ^b	20	19.74	0.29	C19
19	74.8	3.95	C20	36	18.7	1.70	C35, C37
R3	72.6	4.58	R4, R5 ^b	54	16.47	1.24	
Pr2	70.6	4.09	Pr1 ^b , Pr3	25	16.43	1.17	C26
R2	68.9	3.99	R1	35	15.7	2.48	C36
17	58.6		C54, C56	53	15.2	2.40	C48

[a] atomy węgla grup karbonylowych, ze względu na nakładanie się sygnałów jednoznaczne przypisanie było niemożliwe; [b] sygnały korelacyjne o słabej intensywności.

Dane krystalograficzne	
Stechiometria związku	C ₆₃ H ₈₇ CoN ₁₇ O ₁₃ P
Grupa przestrzenna	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Długości krawędzi komórki (Å)	a 15.7650(4); b 22.4091(5); c 24.8830(8)
Kąty (°)	α 90.00; β 90.00; γ 90.00
Objętość komórki (Å ³)	8790.7(4)
Z, Z'	Z: 4 Z': 0
R (%)	5.90
Numer depozytu w bazie CCDC	906734

Ogólna procedura katalizowanej miedzią [1,3] dipolarnej cykloaddycji azydku **181** do alkinów.

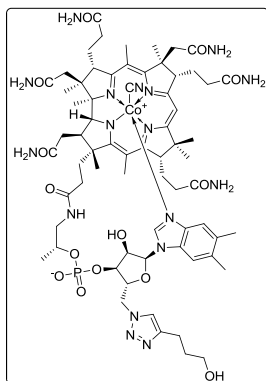
CuI (1.0 mg, 0.005 mmol) i TBTA (5.0 mg, 0.01 mmol) dodane zostały do mieszaniny DMF/woda (0.5 ml, 1/1 v/v). Otrzymaną zawiesinę mieszano intensywnie do uzyskania klarownego roztworu (ok. 20 min), dodano azydek **181** (30 mg, 0.02 mmol) i alkin (0.035 mmol) i mieszano przez noc w temperaturze pokojowej. Mieszaninę poreakcyjną wytrącono eterem dietylowym (15ml) i odwirowano. Uzyskany osad wysuszono pod zmniejszonym ciśnieniem a następnie rozтворzono w wodzie o temperaturze ok 4 °C i odwirowano. Roztwór nad osadem zawierający surowy produkt, został nałożony na kolumnę chromatograficzną ze złożem RP i eluowany mieszaniną woda/MeOH (10-40%, v/v). Zebrane frakcje zawierające produkt odparowano, pozostałość rozтворzono w MeOH (1ml), wytrącono eterem dietylowym i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem.



Pochodna **182a**. Wydajność: 96 %.

MS ESI, (*m/z*): obliczono dla C₆₆H₉₁CoN₁₇O₁₄P+Na [M+Na]⁺ 1458.6; otrzymano 1458.6. **UV/Vis** (H₂O), λ_{max} (nm) (ε, L·mol⁻¹·cm⁻¹): 361 (2.37x10⁴). **¹H NMR** (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 8.52 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.63 (s, 2H), 7.54 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.05 (s, 1H), 7.04 (s, 1H), 7.01 (s, 1H), 6.80 (s, 1H), 6.78 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.44 (s, 1H), 6.31 (bs, 1H), 5.99 (s, 1H), 5.91 (s, 1H), 5.37 (s, 1H), 4.91 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.74 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 4.68 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 4.51 (d, *J* = 4.2 Hz, 2H), 4.35 (s, 1H), 4.24-4.03 (m, 2H), 3.97-3.86 (m, 2H), 3.71 (dd, *J* = 5.2, *J* = 9.9 Hz, 1H), 3.53-3.44 (m, 1H), 3.10 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H), 2.81-2.70 (m, 2H), 2.69-2.55 (m, 2H), 2.49-2.37 (m, 3H), 2.48 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 2.31-2.16 (m, 4H), 2.14 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.09-1.95 (m, 4H), 1.84-1.72 (m, 5H), 1.70 (s, 3H), 1.66-1.58 (m, 3H), 1.57-1.48 (m, 2H), 1.37 (s, 3H), 1.23 (s, 3H), 1.17 (s, 3H), 1.07 (s, 3H), 0.89 (bs, 2H), 0.28 (s, 3H). **¹³C NMR** (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 179.5, 178.2, 175.9, 173.8, 173.2, 172.7, 172.5, 172.4, 171.0, 170.9, 165.3, 164.7, 147.3, 142.1, 136.2, 132.7, 131.3, 129.5, 125.0,

116.3, 111.4, 105.9, 102.9, 93.5, 85.6, 84.4, 79.2, 78.8, 74.9, 72.5, 70.6, 68.5, 58.7, 55.1, 54.9, 54.6, 53.1, 50.3, 48.6, 47.5, 46.6, 45.2, 42.1, 41.7, 38.0, 35.1, 33.7, 31.8, 31.6, 31.5, 31.3, 30.0, 27.5, 25.7, 25.5, 20.2, 19.9, 19.8, 19.6, 18.7, 16.6, 16.4, 15.6, 14.9. **HPLC:** $t_r = 13.02$ min.

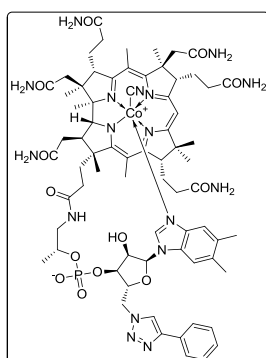


Pochodna 182b. Wydajność: 92 %.

MS ESI, (m/z): obliczono dla $C_{68}H_{95}CoN_{17}O_{14}P+Na$ $[M+Na]^+$ 1486.6; otrzymano 1486.6. **UV/Vis** (H_2O), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 361 (2.50×10^4). **1H NMR** (600 MHz, $DMSO-d_6$), δ (ppm): 8.47 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.63 (s, 2H), 7.54 (s, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.05 (s, 1H), 7.03 (s, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.78 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.44 (s, 1H), 6.26 (s, 1H), 5.95 (s, 1H), 5.90 (s, 1H), 4.91 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.72-4.62 (m, 3H), 4.29-

4.22 (m, 1H), 4.21-4.10 (m, 2H), 3.93 (d, $J = 10.7$, 1H), 3.89 (s, 1H), 3.71 (dd, $J = 5.3$, $J = 9.9$ Hz, 1H), 3.59-3.49 (m, 2H), 3.43 (dd, $J = 6.1$, $J = 11.4$ Hz, 2H), 3.17 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H), 3.18 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 2.82-2.71 (m, 2H), 2.70-2.57 (m, 4H), 2.50-2.36 (m, 3H), 2.48 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 2.34-1.94 (m, 8H), 2.15 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 1.91-1.59 (m, 8H), 1.70 (s, 3H), 1.57-1.48 (m, 2H), 1.37 (s, 3H), 1.23 (s, 3H), 1.17 (s, 3H), 1.07 (s, 3H), 0.89 (bs, 2H), 0.28 (s, 3H). **^{13}C NMR** (150 MHz, $DMSO-d_6$), δ (ppm): 179.5, 178.2, 174.9, 173.7, 173.2, 172.7, 172.5, 172.4, 171.1, 170.9, 165.3, 164.6, 146.2, 142.3, 136.2, 132.6, 131.3, 129.5, 124.1, 116.3, 111.5, 105.9, 102.9, 93.5, 85.6, 84.3, 78.9, 74.9, 72.0, 70.7, 68.5, 60.0, 58.7, 54.9, 54.0, 53.2, 50.3, 48.6, 48.3, 47.5, 46.6, 45.2, 42.1, 41.7, 38.0, 35.1, 33.6, 32.2, 31.8, 31.5, 31.3, 30.0, 27.6, 25.6, 25.5, 21.7, 20.32, 20.29, 19.9, 19.8, 19.5, 18.7, 16.7, 16.4, 15.6, 14.9.

HPLC: $t_r = 13.35$ min.

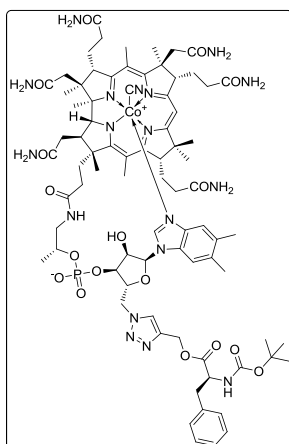


Pochodna 182c. Wydajność 92 %.

MS ESI, (m/z): obliczono dla $C_{71}H_{93}CoN_{17}O_{13}P+Na$ $[M+Na]^+$ 1504.6, otrzymano 1504.6. **UV/Vis** (H_2O), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 361 (2.43×10^4). **1H NMR** (600 MHz, $DMSO-d_6$), δ (ppm): 9.35 (s, 1H), 7.87-7.77 (m, 3H), 7.70 (s, 1H), 7.66-7.57 (m, 2H), 7.53 (s, 1H), 7.47-7.40 (m, 2H), 7.35-7.29 (m, 2H), 7.27 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.06 (s, 1H), 7.03 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.77 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.44 (s, 1H), 6.28 (s, 1H), 6.01 (s, 1H), 5.90 (s, 1H), 5.04 (d, $J =$

11.9 Hz, 1H), 4.78 (d, $J = 13.4$ Hz, 1H), 4.68 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 4.40-4.28 (m, 1H), 4.27-4.21 (m, 1H), 4.20-4.14 (m, 1H), 3.94 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 3.72 (dd, $J = 5.4$ Hz, $J = 10.0$ Hz, 1H), 3.61-3.49 (m, 1H), 3.10 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H), 2.82-2.74 (m, 1H), 2.73-2.58 (m, 2H), 2.49-2.38 (m, 7H), 2.48 (s, 3H), 2.44 (s, 3H), 2.29-2.15 (m, 4H), 2.14 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.08-1.96 (m, 3H), 1.89-1.58 (m, 7H), 1.70 (s, 3H), 1.57-1.47 (m, 2H), 1.38 (s, 3H), 1.24 (s, 3H), 1.20-1.16 (m, 2H),

1.16 (s, 3H), 1.08 (s, 3H), 0.90 (bs, 1H), 0.28 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 180.0, 178.7, 175.4, 174.2, 173.6, 173.1, 172.9, 172.9, 171.5, 171.3, 165.7, 165.1, 146.3, 142.8, 136.6, 133.0, 131.7, 131.5, 129.9, 129.3, 128.1, 125.6, 124.3, 116.7, 111.9, 110.0, 106.4, 103.3, 94.0, 86.1, 84.8, 79.2, 75.3, 72.4, 71.1, 68.8, 65.4, 59.1, 55.4, 54.5, 53.7, 50.8, 49.0, 48.9, 48.0, 47.0, 45.9, 42.6, 42.1, 38.4, 35.5, 34.2, 32.3, 32.0, 31.8, 30.5, 28.2, 26.1, 25.9, 20.8, 20.3, 20.2, 20.0, 19.2, 17.2, 16.8, 16.1, 15.6, 15.3. **HPLC**: $t_r = 21.90$ min.

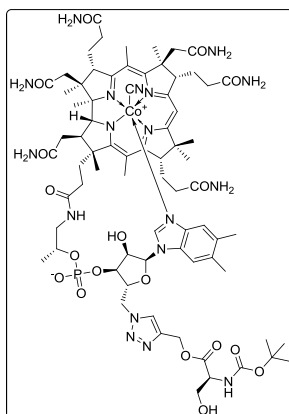


Pochodna 182d. Wydajność: 96 %.

MS ESI, (m/z): obliczono dla $\text{C}_{80}\text{H}_{108}\text{CoN}_{18}\text{O}_{17}\text{P}+\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1705.6; otrzymano 1705.5. **UV/Vis** (H_2O), λ_{max} (nm) (ϵ , $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): 361 (2.33×10^4). $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 8.82 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.66-7.56 (m, 3H), 7.53 (s, 1H), 7.38 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.26-7.20 (m, 4H), 7.19-7.07 (m, 3H), 7.05 (s, 1H), 7.03 (s, 1H), 6.99 (s, 1H), 6.78 (s, 2H), 6.50 (s, 1H), 6.45 (s, 1H), 6.25 (s, 1H), 5.96 (s, 1H), 5.91 (s, 1H), 5.23-5.08 (m, 2H), 5.01 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H), 4.74 (d, $J = 14.3$ Hz, 1H), 4.66 (d, $J = 7.2$, 1H), 4.30-4.13 (m,

4H), 3.93 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H), 3.87 (s, 1H), 3.75-3.66 (m, 1H), 3.61-3.52 (m, 1H), 3.08 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 3.05-2.97 (m, 1H), 2.93-2.83 (m, 1H), 2.81-2.56 (m, 3H), 2.49-2.38 (m, 6H), 2.48 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 2.30-2.16 (m, 2H), 2.14 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.10-1.95 (m, 3H), 1.86-1.72 (m, 4H), 1.70 (s, 3H), 1.65-1.42 (m, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.28 (s, 9H), 1.22 (s, 3H), 1.20-1.18 (m, 2H), 1.17 (s, 3H), 1.14-1.11 (m, 3H), 1.07 (s, 3H), 0.90 (bs, 1H), 0.27 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 180.0, 178.7, 175.4, 174.2, 174.2, 173.6, 173.1, 172.9, 172.8, 172.2, 171.5, 171.3, 165.7, 165.1, 155.9, 142.7, 141.5, 138.1, 136.7, 133.1, 131.8, 129.9, 129.6, 128.5, 127.4, 126.8, 116.7, 111.9, 106.4, 103.3, 94.0, 86.1, 84.8, 79.3, 78.7, 75.4, 72.2, 71.2, 68.9, 59.1, 58.2, 55.6, 55.4, 54.5, 53.7, 50.8, 48.9, 48.0, 47.0, 45.8, 42.6, 42.2, 38.5, 36.7, 35.5, 34.1, 32.3, 31.94, 31.88, 30.5, 28.5, 28.1, 26.1, 25.9, 20.8, 20.3, 20.2, 20.0, 19.2, 17.2, 16.8, 16.1, 15.3.

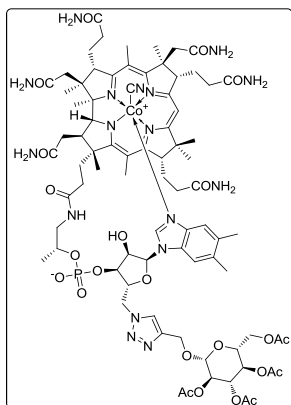
HPLC: $t_r = 27.70$ min.



Pochodna 182e. Wydajność: 71%.

MS ESI, (m/z): obliczono dla $\text{C}_{74}\text{H}_{104}\text{CoN}_{18}\text{O}_{18}\text{P}+\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1645.7; otrzymano 1645.8. **UV/Vis** (H_2O), λ_{max} (nm) (ϵ , $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): 361 (2.54×10^4). $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 8.78 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.33 (s, 2H), 7.20 (s, 1H), 7.14 (s, 1H), 7.07 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.04 (s, 2H), 7.00 (s, 1H), 6.80 (s, 1H), 6.77 (s, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.45 (s, 1H), 6.21 (s, 1H), 6.07 (s, 1H), 5.92 (s, 1H), 5.90 (s, 1H), 5.34 (d, $J =$

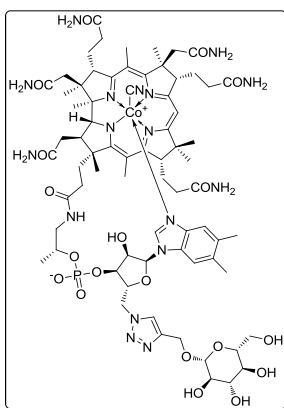
13.1 Hz, 1H), 5.16 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H), 5.00 (d, $J = 13.0$, 1H), 4.70 (d, $J = 14.1$ Hz, 1H), 4.65 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 4.24-4.08 (m, 4H), 3.93 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 3.85 (s, 1H), 3.79-3.67 (m, 2H), 3.66-3.51 (m, 2H), 3.08 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 2.82-2.58 (m, 3H), 2.49-2.39 (m, 6H), 2.48 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 2.32-2.17 (m, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.11-1.94 (m, 3H), 1.92-1.57 (m, 6H), 1.70 (s, 3H), 1.56-1.46 (m, 1H), 1.45-1.34 (m, 3H), 1.37 (s, 9H), 1.31 (s, 1H), 1.22 (s, 3H), 1.17 (s, 3H), 1.13 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H), 1.07 (s, 3H), 0.89 (bs, 1H), 0.28 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 180.0, 178.7, 175.4, 174.2, 174.2, 173.6, 173.1, 172.86, 172.85, 171.5, 171.4, 171.3, 165.7, 165.1, 155.9, 142.6, 136.6, 133.1, 131.7, 129.9, 126.7, 116.7, 106.4, 103.3, 94.0, 86.0, 84.8, 78.7, 75.4, 68.8, 65.4, 61.8, 58.4, 56.6, 55.4, 54.5, 53.7, 50.8, 48.0, 47.0, 42.6, 42.2, 38.4, 35.5, 34.1, 32.2, 31.9, 31.7, 30.5, 28.6, 25.9, 20.7, 20.3, 20.2, 19.9, 19.2, 17.2, 16.8, 16.1, 15.6. **HPLC**: $t_r = 21.43$ min.



Pochodna 182f. Wydajność 87 %.

MS ESI, (m/z): obliczono dla $\text{C}_{80}\text{H}_{109}\text{CoN}_{17}\text{O}_{23}\text{P}+\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1788.7; otrzymano 1788.9. **UV/Vis** (H_2O), λ_{max} (nm) (ϵ , $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): 361 (2.42×10^4). $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 8.81 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.59 (s, 2H), 7.51 (s, 2H), 7.30 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.42 (s, 1H), 6.19 (s, 1H), 5.88 (s, 2H), 5.22 (t, $J = 9.6$ Hz, 1H), 4.99 (d, $J = 13.1$ Hz, 1H), 4.88 (t, $J = 9.6$ Hz, 1H), 4.84 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.78 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 4.75-4.67 (m,

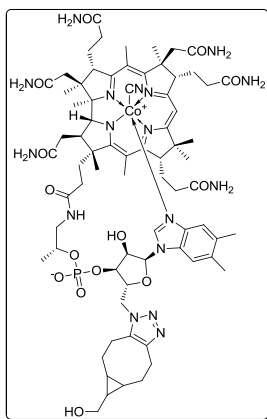
2H), 4.66-4.59 (m, 2H), 4.24-4.07 (m, 4H), 4.06-3.99 (m, 2H), 3.89 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 3.84 (s, 1H), 3.68 (dd, $J = 5.3$, $J = 10.1$ Hz, 1H), 3.57-3.50 (m, 1H), 3.05 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 2.78-2.65 (m, 2H), 2.64-2.55 (m, 1H), 2.46-2.37 (m, 5H), 2.45 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 2.28-2.14 (m, 2H), 2.11 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.04-1.97 (m, 2H), 2.00 (s, 3H), 1.94 (s, 3H), 1.92 (s, 3H), 1.88 (s, 3H), 1.83-1.68 (m, 4H), 1.67 (s, 3H), 1.64-1.45 (m, 3H), 1.35 (s, 3H), 1.24-1.11 (m, 3H), 1.19 (s, 3H), 1.14 (s, 3H), 1.07 (s, 3H), 1.04 (s, 3H), 0.86 (bs, 1H), 0.24 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 180.0, 178.7, 175.4, 174.3, 174.2, 173.6, 173.1, 172.9, 171.5, 171.3, 170.5, 170.0, 169.7, 169.6, 165.7, 165.1, 142.8, 136.7, 133.0, 131.8, 129.9, 127.2, 116.7, 111.8, 106.4, 103.3, 98.5, 94.0, 86.1, 84.8, 75.3, 72.6, 71.4, 71.0, 68.5, 62.2, 62.0, 59.2, 55.4, 54.5, 53.7, 50.6, 48.7, 48.0, 47.0, 38.4, 35.5, 34.1, 32.2, 31.94, 31.87, 28.2, 25.9, 21.0, 20.83, 20.75, 20.71, 20.3, 20.24, 20.18, 19.9, 19.2, 17.2, 16.7, 16.1, 15.3. **HPLC**: $t_r = 26.07$ min.



Pochodna 182g. Wydajność 82 %.

MS ESI, (m/z): obliczono dla $C_{72}H_{101}CoN_{17}O_{17}P+Na$ $[M+Na]^+$ 1620.6; otrzymano 1620.8. **UV/Vis** (H_2O), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 361 (2.26×10^4). **1H NMR** (600 MHz, $DMSO-d_6$), δ (ppm): 8.82 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.58 (s, 2H), 7.53 (s, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.14 (s, 1H), 7.05 (s, 1H), 7.03 (s, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.82 (s, 1H), 6.77 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.45 (s, 1H), 6.25 (s, 1H), 5.89 (s, 1H), 5.82 (s, 1H), 5.38-5.31 (m, 1H), 5.26 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 5.00 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H), 4.93 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H), 4.86 (d, $J = 4.7$ Hz,

1H), 4.81-4.69 (m, 3H), 4.68-4.60 (m, 1H), 4.26-4.14 (m, 4H), 4.10 (dd, $J = 5.2$, $J = 10.5$ Hz, 1H), 3.92 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 3.84 (s, 1H), 3.79-3.67 (m, 2H), 3.63-3.54 (m, 1H), 3.48-3.42 (m, 1H), 3.26-2.93 (m, 5H), 2.81-2.58 (m, 4H), 2.49-2.35 (m, 5H), 2.48 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 2.30-1.93 (m, 6H), 2.14 (s, 6H), 1.91-1.58 (m, 6H), 1.70 (s, 3H), 1.57-1.48 (m, 1H), 1.39 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 1.17 (s, 3H), 1.14-1.11 (m, 3H), 1.07 (s, 3H), 0.90 (bs, 1H), 0.28 (s, 3H). **^{13}C NMR** (150 MHz, $DMSO-d_6$), δ (ppm): 180.0, 178.7, 175.3, 174.2, 173.6, 173.1, 172.9, 171.5, 171.3, 165.7, 165.2, 143.5, 142.8, 136.6, 133.2, 131.8, 129.8, 127.8, 116.7, 111.9, 106.5, 103.3, 102.3, 94.0, 86.0, 84.8, 79.3, 77.5, 75.4, 73.8, 72.0, 71.4, 70.9, 68.8, 65.4, 61.4, 59.2, 55.4, 54.5, 53.8, 50.8, 49.0, 48.6, 48.0, 47.0, 45.7, 42.6, 42.2, 38.4, 35.5, 34.1, 32.3, 31.9, 31.7, 28.2, 26.0, 20.7, 20.3, 20.2, 20.0, 19.2, 17.2, 16.8, 16.0, 15.6. **HPLC**: $t_r = 12.48$ min.

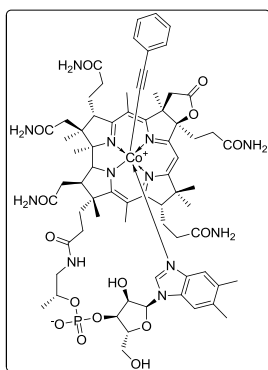


Pochodna 183. Azydek **180** (30 mg, 0.02 mmol) i endo/exo bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-yl-metanol **22d** (5.3 mg, 0.035 mmol) roztworzono w mieszaninie woda/MeCN (0.5 ml, 2/3 v/v) i mieszano przez noc w temperaturze pokojowej. Mieszaninę poreakcyjną wytrącono eterem dietylowym (15ml), odwirowano, uzyskany osad wysuszono pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt, został nałożony na kolumnę chromatograficzną ze złożem RP i eluowany mieszaniną woda/MeOH (10-40%, v/v). Zebrane frakcje zawierające produkt odparowano, pozostałość roztworzono w MeOH (1ml),

wytrącono eterem dietylowym i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem. Wydajność 95 % (~1/1 endo/exo).

MS ESI, (m/z): obliczono dla $C_{73}H_{101}CoN_{17}O_{14}P+Na$ $[M+Na]^+$ 1552.6; otrzymano 1552.6. **UV/Vis** (H_2O), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 361 (1.46×10^4). **1H NMR** (600 MHz, $DMSO-d_6$), δ (ppm): 7.95 (s, 1H), 7.89 (s, 2H), 7.83 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.31 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H), 7.20-7.11 (m, 2H), 7.10-7.04 (m, 1H), 7.02 (s, 2H), 6.78 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 6.65-6.50 (m, 2H), 6.43 (s, 1H), 6.15-5.86 (m, 2H), 4.84-4.62 (m, 2H), 4.58-4.36 (m, 3H), 4.34-4.06 (m, 3H), 4.05-3.85 (m, 2H), 3.72 (m, 1H), 3.26-2.83 (m, 8H), 2.82-2.56 (m, 5H), 2.47 (s, 3H),

2.37 (s, 3H), 2.31-2.19 (m, 5H), 2.17 (s, 6H), 2.08-1.86 (m, 5H), 1.83-1.72 (m, 4H), 1.69 (s, 3H), 1.60-1.37 (m, 4H), 1.36-1.29 (m, 1H), 1.31 (s, 3H), 1.24 (s, 3H), 1.18 (s, 3H), 1.12-0.99 (m, 5H), 0.92-0.75 (m, 2H), 0.74-0.60 (m, 2H), 0.58-0.36 (m, 2H), 0.30 (s, 3H). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 180.0, 178.7, 175.4, 174.2, 173.6, 173.1, 172.92, 172.87, 171.5, 171.3, 165.7, 165.1, 146.3, 142.8, 136.6, 133.0, 131.7, 131.5, 129.9, 129.3, 128.1, 125.6, 124.3, 116.7, 111.9, 110.0, 106.4, 103.3, 94.0, 86.1, 84.8, 79.2, 75.3, 72.4, 71.1, 68.8, 65.4, 59.1, 55.4, 54.5, 53.7, 50.8, 49.0, 48.9, 48.0, 47.0, 45.9, 42.6, 42.1, 38.4, 35.5, 34.2, 32.0, 31.8, 30.5, 28.2, 26.1, 25.9, 20.8, 20.3, 20.2, 20.0, 19.2, 17.2, 16.8, 16.1, 15.6, 15.3. **HPLC**: t_r = 14.23 min i 14.37 min.



Lakton 186. Witaminę B₁₂ (67 mg, 0.05 mmol), acetylenek miedzi (I) (82 mg, 0.50 mmol) i Ph₃P (130 mg, 0.50 mmol) rozтворzono w bezwodnym i odtlenionym DMF (5ml). Do roztworu dodano sita molekularne 4Å (500 mg). Mieszaninę reakcyjną umieszczono w łaźni olejowej i powoli ogrzano do 60 °C. Po osiągnięciu zadanej temperatury mieszano przez 20 godzin. Mieszaninę reakcyjną przesączono przez warstwę celitu, przesącz wytrącono eterem dietylowym i odwirowano. Wytrącony osad przemyto dwukrotnie eterem dietylowym, odwirowano

i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem. Lakton **186** wydzielono techniką chromatografii kolumnowej na żelu RP C2 stosując jako eluent mieszaninę woda/MeCN (10-70% v/v). Frakcje, niezwłocznie po zebraniu odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem, bez ogrzewania. Frakcje zawierające czysty lakton **186** (analiza HPLC) rozтворzono w MeOH, produkt wytrącono eterem dietylowym, odwirowano i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem. Wydajność: 15 mg (22%).

HRMS ESI (m/z): obliczono dla C₇₀H₉₁N₁₂O₁₅PCo[M+H]⁺ 1429.5796, otrzymano 1429.5784. ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 7.74 (s, 1H), 7.59 (s, 2H), 7.52 (s, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 7.06 (s, 1H), 7.05-7.01 (m, 2H), 7.00-6.95 (m, 1H), 6.99-6.97 (m, 2H), 6.89 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.70 (m, 2H), 6.65 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 6.38 (s, 1H), 6.25 (s, 1H), 6.08 (s, 1H), 5.83 (s, 1H), 4.56 (s, J = 5.7 Hz, 1H), 4.51 (bs, 1H), 4.17 (d, J = 11.2 Hz, 1H), 4.10 (bs, 1H), 3.94 (s, 1H), 3.90-3.83 (m, 1H), 3.60-3.47 (m, 3H), 3.26 (d, J = 18.5 Hz, 1H), 3.07 (d, J = 11.1 Hz, 1H), 2.79-2.67 (m, 3H), 2.64 (m, 2H), 2.45-2.32 (m, 4H), 2.44 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 2.30-2.16 (m, 3H), 2.16- 1.99 (m, 5H), 2.14 (s, 6H), 1.77 (s, 3H), 1.74-1.54 (m, 5H), 1.36 (s, 3H), 1.15 (s, 6H), 1.04 (d, J = 5.7 Hz, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.33 (s, 3H). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 178.5, 177.7, 176.8, 174.0, 173.7, 173.6, 173.1, 173.0, 172.5, 171.4, 166.2, 164.1, 160.9, 143.1, 137.3, 132.8, 131.6, 130.7, 130.3, 128.6, 126.8, 126.1, 116.9, 111.9, 105.9, 104.9, 100.4, 94.9, 90.5, 85.9, 84.9, 81.8, 75.4, 74.8, 71.3, 69.7, 62.0, 58.8, 55.2, 53.2, 51.5, 48.2, 47.0, 45.7, 41.9, 40.9, 38.3, 35.7, 34.1, 32.2, 31.7, 31.3, 30.3, 29.7, 29.0, 27.7, 25.9, 20.7, 20.4, 20.3, 19.7, 17.0, 16.9, 16.7, 15.5. **HPLC**: t_r = 12.52 min.

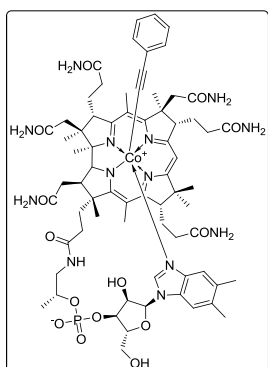
Przypisania sygnałów w widmiach ^1H i ^{13}C NMR laktonu **186**.

Przypisanie	^{13}C NMR [ppm]	Zaobserwowane korelacje		Przypisanie	^{13}C NMR [ppm]	Zaobserwowane korelacje	
		HQSC [ppm]	HMBC			HQSC [ppm]	HMBC
C4	178.5		C35	R3	74.8	4.51	
C16	177.7		C53, C54	Pr2	71.3	4.10	Pr3
				R2	69.7	3.94	
C11	176.8		C10, C13, C46, C47	R5	62.0	3.56	
	174.0			C17	58.8		C53, C54
	173.70			C3	55.2	4.56	C25
	173.65			C13	53.2	3.07	C46, C47
C27, C32, C38, C43, C50, C57, C61 ^a	173.05			C7	51.5		C36, C37
	173.02			C12	48.2		C13, C46, C47
	172.5			C2	47.0		C20, C25
	171.4			Pr1	45.7	3.53, 2.71	Pr3
C9	166.2		C10	C26	41.9	2.12	C25
C14	164.1		C13, C53	C37	40.9	3.25, 2.64	C36
C6	160.9		C35, C36, C37	C18	38.3	2.72	C54
B2	143.1	7.09		C31	35.7	2.20	
B9	137.3		B2	C49	34.1	2.36, 2.27	C13
B6	132.8		B4, B10	C60	32.2	2.46	
B5	131.6		B11	C55	31.7	1.73	C54
L4	130.7	6.86	L6	C46	31.3	0.93	C13, C47
B8	130.3		B2, B4	C56	30.3	2.63, 2.03	
L5	128.6	7.04		C41	29.7	1.61	C42
L3	126.8		L5	C42	29.0	2.09, 1.94	C41
L6	126.1	6.98	L4	C48	27.7	1.92, 1.57	C13
B4	116.9	6.37	B11	C30	25.9	1.70	C31
B7	111.9	7.30	B10	Pr3	20.7	1.04	
C5	105.9		C35	B10/B11	20.4	2.14	B4/B7
C15	104.9		C53	C20	20.3	0.33	
L2	100.4		L4	C47	20.3	1.35	
C8	94.9		C10, C 36, C37, C41, C42	C36	19.7	1.77	C37, C41, C42
C10	90.5	5.83		C25	17.0	1.15	
R1	85.9	6.25		C35	16.9	2.43	
C1	84.9		C3, C19, C20, C25	C54	16.7	1.15	
R4	81.8	3.88		C53	15.5	2.39	
C19	75.4	4.18	C20				

[a] atomy węgla grup karbonylowych, ze względu na nakładanie się sygnałów jednoznaczne przypisanie było niemożliwe.

Ogólna procedura otrzymywania alkynyłowych pochodnych B₁₂ 185, i 188a-h i 186a-189a-e.

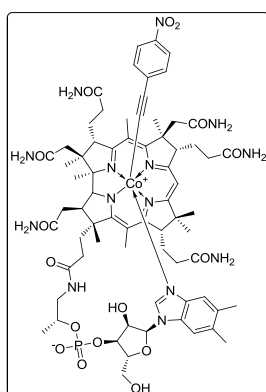
Witaminę B₁₂ (135 mg, 0.1 mmol), CuAcO (12 mg, 0.1 mmol) rozтворzono w DMA (1.5 ml). Do otrzymanego roztworu dodano odpowiedni alkin (1.0 mmol) a następnie roztwór DBU (76 µl, 0.5 mmol) w DMA (0.5 ml). Mieszaninę reakcyjną intensywnie mieszano w temperaturze pokojowej i monitorowano HPLC. Po stwierdzeniu całkowitego przereagowania substratu, mieszaninę reakcyjną wytrącono eterem dietylowym (15 ml) i odwirowywano. Wytrącony osad przemywano dwukrotnie eterem dietylowym (2 x 15 ml), odwirowywano i suszono na powietrzu. Otrzymany osad rozтворzano w wodzie destylowanej (30 ml) odwirowywano. Czerwony roztwór zlewano z nad żółto-brązowego osadu i zateżano. Produkt oczyszczano techniką chromatografii kolumnowej na żelu RP C18 stosując mieszaninę woda/MeCN (10-70% v/v) jako eluent. Frakcje zawierające produkt łączono i odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymane ciało stałe rozтворzano w MeOH (2 ml), wytrącano eterem dietylowym (15 ml) i odwirowywano. Osad suszono pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 50 °C



Pochodna 185. Wydajność: 85%.

HRMS ESI (m/z): obliczono dla C₇₀H₉₃N₁₃O₁₄PCoNa [M+Na]⁺ 1452.5932, otrzymano 1452.5931. **IR** (KBr) ν (cm⁻¹) = 3333, 3189, 2967, 2937, 1223, 1666, 1574, 1496, 1217, 1151, 1068, 995, 847, 759. **UV/Vis** (H₂O), λ_{\max} (nm) (ϵ , L·mol⁻¹·cm⁻¹) = 551 (7.5x10³), 522 (6.5x10³), 363 (1.3x10⁴), 259, 218. **¹H NMR** (600 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 7.69 (s, 1H), 7.57 (s, 2H), 7.48 (s, 2H), 7.30 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 7.05-6.99 (m, 3H), 6.98-6.94 (m, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 6.74-6.70 (m, 1H), 6.63 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.33-6.27 (m, 1H), 6.25 (s, 1H), 6.06 (bs, 1H), 5.83 (s, 1H), 4.58 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 4.51-4.41 (m, 1H), 4.20 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 4.11-4.04 (m, 1H) 3.92-3.38 (m, 2H), 3.75 (dd, J = 5.5, J = 9.6 Hz, 1H), 3.60-3.49 (m, 3H), 3.03 (d, J = 11.1 Hz, 1H), 2.74-2.56 (m, 3H), 2.46-2.31 (m, 5H), 2.44 (s, 3H), 2.36 (s, 3H), 2.28-2.08 (m, 4H), 2.14 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.08-1.99 (m, 1H), 1.94-1.82 (m, 4H), 1.80-1.66 (m, 4H), 1.64 (s, 3H), 1.60-1.49 (m, 2H), 1.32 (s, 3H), 1.25-1.17 (m, 1H), 1.16 (s, 3H), 1.14 (s, 3H), 1.01 (d, J = 5.9 Hz, 3H), 0.95 (s, 4H), 0.29 (s, 3H). **¹³C NMR** (150 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 178.3, 176.9, 174.1, 173.99, 173.74, 173.35, 173.23, 173.10, 172.7, 171.80, 171.5, 164.9, 164.3, 143.1, 137.3, 132.3, 131.1, 130.7, 130.2, 128.5, 127.3, 125.7, 117.4, 111.5, 105.6, 103.1, 100.3, 93.6, 85.2, 84.7, 81.7, 75.1, 74.8, 71.1, 69.7, 62.3, 58.7, 55.1, 53.9, 53.4, 50.4, 47.6, 46.8, 45.9, 42.2, 42.0, 38.3, 35.7, 34.2, 32.5, 32.4, 31.8, 31.6, 30.3, 27.7, 26.4, 26.0, 20.7, 20.34, 20.32, 20.2, 19.2, 16.9, 16.8, 16.1, 15.4. **HPLC**: t_r = 11.72 min.

Dane krystalograficzne	
Stechiometria związku	C ₇₀ H ₉₃ N ₁₃ O ₁₄ PCo
Grupa przestrzenna	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Długości krawędzi komórki (Å)	a 15.8504(3); b 21.6765(4); c 26.2587(5)
Kąty (°)	α 90.00; β 90.00; γ 90.00
Objętość komórki (Å ³)	9022
Z, Z'	Z: 4 Z': 0
R (%)	4.22
Numer depozytu w bazie CCDC	961230



Pochodna 188a. Wydajność: 90%.

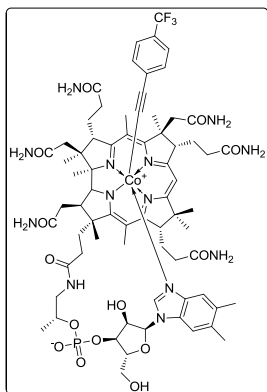
HRMS ESI (m/z): obliczono dla C₇₀H₉₂N₁₄O₁₆PCoNa [M+Na]⁺

1497.5783, otrzymano 1497.5770. **UV/Vis** (H₂O): λ_{max} (nm) (ε, L·mol⁻¹·cm⁻¹)= 549 (6.8x10³), 522 (5.3x10³), 363 (1.7x10⁴), 263, 216. **¹H NMR**

(500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7.97 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.14 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 7.05 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.98 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 6.66 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.37-6.29 (m,

1H), 6.27 (s, 1H), 6.07 (s, 1H), 5.87 (s, 1H), 4.56 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.51-4.44 (m, 1H), 4.18-4.03 (m, 2H), 3.95-3.83 (m, 2H), 3.78 (dd, $J = 5.3$, $J = 9.6$ Hz, 1H), 3.64-3.49 (m, 3H), 3.07 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 2.77-2.56 (m, 3H), 2.47-2.32 (m, 5H), 2.46 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 2.31-2.22 (m, 4H), 2.18 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.12-1.98 (m, 4H), 1.95-1.69 (m, 6H), 1.66 (s, 2H), 1.61-1.51 (m, 2H), 1.34 (s, 3H), 1.26-1.19 (m, 2H), 1.18 (s, 3H), 1.17 (s, 3H), 1.04 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H), 0.97 (s, 4H), 0.31 (s, 3H). **¹³C NMR** (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 178.6, 177.3, 174.4, 174.0, 173.7, 173.3, 173.09, 173.1, 171.7, 171.4, 165.2, 164.4, 144.9, 143.1, 137.2, 133.9, 132.5, 131.5, 131.2, 130.2, 124.1, 117.3, 111.6, 105.6, 103.2, 100.9, 93.7, 85.7, 84.7, 81.8, 75.1, 74.8, 71.1, 69.7, 62.3, 58.8, 55.2, 54.0, 53.4, 50.3, 49.0, 47.7, 46.8, 45.9, 42.1, 38.4, 35.7, 34.2, 32.5, 32.4, 31.7, 30.4, 27.7, 26.4, 26.0, 20.7, 20.4, 20.3, 20.14, 19.2, 19.0, 16.9, 16.1, 15. **HPLC**: t_i = 12.08 min.

Dane krystalograficzne	
Stechiometria związku	C ₇₀ H ₉₂ N ₁₄ O ₁₆ PCo
Grupa przestrzenna	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Długości krawędzi komórki (Å)	a 12.8063(3); b 22.7406(6); c 29.1298(7)
Kąty (°)	α 90.00; β 90.00; γ 90.00
Objętość komórki (Å ³)	8483.27
Z, Z'	Z: 4 Z': 0
R (%)	5.22
Numer depozytu w bazie CCDC	961228



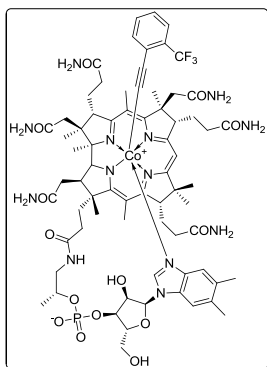
Pochodna 188b. Wydajność 70%.

MS ESI, (m/z): obliczono dla $C_{71}H_{92}N_{13}O_{14}F_3PCoNa_2$ $[M+2Na]^{2+}$

771.7833 ; otrzymano 771.7833. **UV/Vis** (H_2O), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot m^{-1} \cdot cm^{-1}$): 551 (6.3×10^3), 522 (5.0×10^3), 363 (1.2×10^4), 274, 213.

1H NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$), δ (ppm): 7.70 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 7.06 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.91 (s, 1H), 6.77 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 6.51 (s, 1H),

6.39-6.31 (m, 1H), 6.28 (s, 1H), 6.08 (s, 1H), 5.87 (s, 1H), 4.58 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H), 4.53-4.44 (m, 1H), 4.18 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 3.97-3.86 (m, 2H), 3.83-3.72 (m, 1H), 3.65-3.50 (m, 3H), 3.07 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 2.78-2.54 (m, 3H), 2.48-2.34 (m, 4H), 2.47 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 2.32- 2.22 (m, 5H), 2.19 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.15-2.01 (m, 5H), 1.97-1.86 (m, 1H), 1.84-1.71 (m, 4H), 1.67 (s, 3H), 1.63-1.52 (m, 2H), 1.36 (s, 3H), 1.29-1.21 (m, 2H), 1.19 (s, 6H), 1.05 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H), 0.98 (s, 4H), 0.32 (s, 3H). **^{13}C NMR** (150 MHz, $DMSO-d_6$), δ (ppm): 178.5, 177.2, 174.2, 174.0, 173.7, 173.3, 173.1, 173.0, 172.9, 171.7, 171.4, 165.1, 164.4, 143.2, 137.2, 132.4, 131.2, 131.2, 131.2, 130.2, 126.1, 125.8, 125.7, 125.6, 125.5, 123.5, 117.3, 111.6, 105.7, 103.2, 99.9, 93.6, 85.7, 84.7, 81.8, 75.1, 74.8, 71.1, 69.7, 62.3, 58.7, 55.2, 54.0, 53.4, 50.3, 49.0, 47.7, 46.8, 45.9, 42.2, 38.4, 35.7, 34.2, 32.5, 32.4, 31.8, 31.6, 30.3, 27.7, 26.4, 26.0, 20.7, 20.4, 20.3, 20.2, 19.2, 16.9, 16.8, 16.1, 15.4. **HPLC**: $t_r = 13.25$ min.



Pochodna 188c. Wydajność 81%.

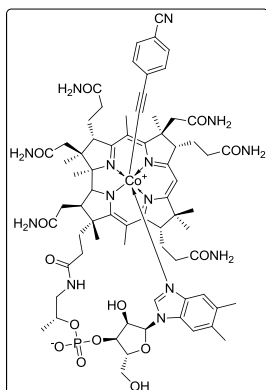
MS ESI, (m/z): obliczono dla $C_{71}H_{93}N_{13}O_{14}F_3Pco$ $[M+H]^+$ 1498.5987;

otrzymano 1498.5964. **UV/Vis** (H_2O), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot m^{-1} \cdot cm^{-1}$): 551 (4.8×10^3), 520 (4.0×10^3), 369 (1.6×10^4), 263, 216. **1H NMR** (600 MHz,

$DMSO-d_6$), δ (ppm): 7.66 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.54 (s, 2H), 7.49 (s, 1H), 7.44 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.37-7.26 (m, 3H), 7.21-7.10 (m, 2H), 7.09 (s, 1H), 7.03 (s, 1H), 6.91-6.86 (m, 3H), 6.77 (s, 1H), 6.66 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.32 (s, 1H), 6.27 (s, 1H), 6.07 (s, 1H), 5.87

(s, 1H), 4.69 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 4.54-4.44 (m, 1H), 4.22-4.07 (m, 2H), 3.95-3.85 (m, 2H), 3.84-3.76 (m, 1H), 3.64-3.51 (m, 3H), 3.08 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 2.82-2.56 (m, 3H), 2.49-2.20 (m, 7H), 2.47 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.15-2.00 (m, 7H), 1.98-1.84 (m, 1H), 1.83-1.58 (m, 4H), 1.59-1.49 (m, 2H), 1.36 (s, 3H), 1.26-1.17 (m, 2H), 1.16 (s, 3H), 1.15 (s, 3H), 1.05 (d, $J = 5.9$ Hz, 3H), 1.02 (s, 3H), 0.97-0.85 (m, 1H), 0.32 (s, 3H). **^{13}C NMR** (150 MHz, $DMSO-d_6$), δ (ppm): 178.5, 177.1, 174.3, 174.0, 173.8, 173.36, 173.3, 173.1, 172.9, 171.8, 171.5, 165.2, 164.3, 143.1, 137.2, 134.7, 132.4, 132.1, 131.1, 130.2, 128.7, 128.5, 128.2, 128.0, 125.8, 125.1, 125.0, 123.0, 117.4, 111.6, 105.6, 103.2, 97.2, 93.6, 85.8, 84.8, 81.8, 75.1, 71.1, 69.7, 65.4, 62.3,

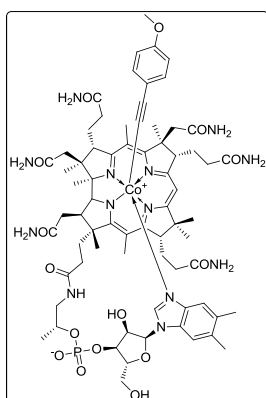
54.9, 53.7, 53.4, 50.3, 47.6, 46.8, 45.9, 42.1, 38.4, 35.8, 34.2, 32.5, 32.2, 31.9, 31.7, 30.3, 27.7, 26.5, 26.1, 20.7, 20.4, 20.3, 20.2, 19.1, 17.0, 16.9, 16.1, 15.4. **HPLC**: $t_r = 12.30$ min.



Pochodna 188d. Wydajność 64%.

HRMS ESI, (m/z): obliczono dla $C_{71}H_{93}N_{14}O_{14}Pco$ $[M+H]^+$ 1455.6065; otrzymano 1455.6056. **UV/Vis** (H_2O), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 551 (6.3×10^3), 522 (5.2×10^3), 363 (1.3×10^4), 266, 218. **1H NMR** (600 MHz, $DMSO-d_6$), δ (ppm): 7.69 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.54 (s, 2H), 7.51 (s, 2H), 7.33 (s, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.16 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 6.69 (s, 1H), 6.90 (s, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.77 (s, 1H), 6.67 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.36-6.33 (m, 1H), 6.28

(s, 1H), 6.08 (s, 1H), 5.87 (s, 1H), 4.57 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 4.54-4.43 (m, 1H), 4.20-4.06 (m, 2H), 3.94-3.85 (m, 2H), 3.78 (dd, $J = 5.4, 9.8$ Hz, 1H), 3.66-3.49 (m, 3H), 3.07 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H), 2.78-2.56 (m, 3H), 2.48-2.35 (m, 4H), 2.46 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 2.32-2.21 (m, 3H), 2.18 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.13-1.99 (m, 3H), 1.97-1.85 (m, 1H), 1.83-1.69 (m, 5H), 1.67 (s, 3H), 1.64-1.51 (m, 2H), 1.35 (s, 3H), 1.28-1.20 (m, 2H), 1.18 (s, 6H), 1.05 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H), 0.97 (s, 4H), 0.32 (s, 3H). **^{13}C NMR** (150 MHz, $DMSO-d_6$), δ (ppm): 178.5, 177.3, 174.3, 174.0, 173.7, 173.3, 173.1, 173.04, 173.00, 171.7, 171.4, 165.1, 164.4, 143.1, 137.2, 132.6, 132.5, 131.7, 131.4, 131.2, 130.2, 119.2, 117.3, 111.6, 107.9, 105.6, 103.2, 100.6, 93.7, 85.7, 84.7, 81.8, 75.2, 74.8, 71.1, 69.7, 62.3, 58.7, 55.2, 54.0, 53.4, 50.4, 47.7, 46.8, 45.9, 42.1, 39.8, 39.6, 39.5, 38.4, 35.7, 34.2, 32.5, 32.4, 31.8, 31.6, 30.3, 27.7, 26.4, 26.0, 20.8, 20.7, 20.4, 20.3, 20.1, 19.2, 17.0, 16.9, 16.1, 15.4. **HPLC**: $t_r = 11.50$ min.



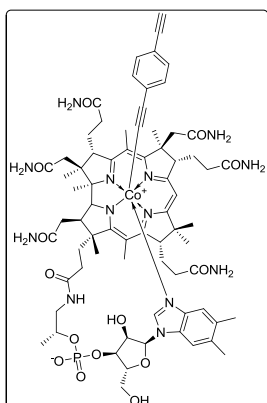
Pochodna 188e. Wydajność 80%.

HRMS ESI, (m/z): obliczono dla $C_{71}H_{95}N_{13}O_{15}PCoNa$ $[M+Na]^+$ 1482.6032, otrzymano 1482.6035. **UV/Vis** (H_2O), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) = 550 (5.8×10^3), 522 (4.4×10^3), 364 (1.2×10^4), 262, 218. **1H NMR** (500 MHz, $DMSO-d_6$), δ (ppm): 7.65 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 1.50 (s, 3H), 7.32 (s, 1H), 1.29 (s, 1H), 7.16 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 7.05 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 6.70-6.60 (m, 5H), 6.52 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.39-6.32 (m, 1H), 6.26 (s, 1H), 6.05 (s, 1H), 5.85 (s, 1H), 4.59

(d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 4.54-4.42 (m, 1H), 4.21 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 4.17-4.05 (m, 1H), 3.39-3.85 (m, 2H), 3.75 (dd, $J = 5.3, 9.9$ Hz, 1H), 3.63 (s, 3H), 3.61-3.52 (m, 3H), 3.05 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 2.72-2.57 (m, 3H), 2.49-2.35 (m, 5H), 2.46 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 2.32-2.20 (m, 6H), 2.18 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.12-2.01 (m, 1H), 1.95-1.82 (m, 1H), 1.83-1.50 (m, 6H), 1.67 (s, 3H), 1.35 (s, 3H), 1.29-1.20 (m, 1H), 1.18 (s, 3H), 1.17 (s, 3H), 1.06 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 0.97 (s, 4H), 0.31 (s,

3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 178.2, 176.8, 174.0, 173.8, 173.4, 173.2, 173.1, 172.7, 171.9, 171.5, 164.8, 164.2, 157.5, 143.2, 137.3, 132.3, 131.9, 131.1, 130.2, 119.8, 117.4, 114.1, 110.0, 105.6, 103.1, 99.5, 93.5, 85.7, 84.7, 75.1, 74.7, 69.7, 62.3, 58.7, 55.5, 55.0, 54.0, 53.4, 50.4, 47.6, 46.7, 45.9, 42.3, 35.7, 34.2, 32.5, 32.4, 31.6, 26.4, 26.0, 20.7, 20.3, 20.2, 20.1, 19.3, 16.9, 16.8, 16.2, 15.4. **HPLC**: t_r = 11.68 min.

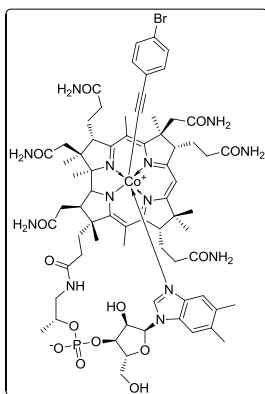
Dane krystalograficzne	
Stechiometria związku	$\text{C}_{71}\text{H}_{95}\text{N}_{13}\text{O}_{15}\text{PCo}$
Grupa przestrzenna	$P\ 2_1\ 2_1\ 2_1$
Długości krawędzi komórki (Å)	a 15.8339(4); b 22.4091(5); c 24.8830(8)
Kąty ($^\circ$)	$\alpha\ 90.00$; $\beta\ 90.00$; $\gamma\ 90.00$
Objętość komórki (Å 3)	8971.8
Z, Z'	Z: 4 Z': 0
R (%)	5.83
Numer depozytu w bazie CCDC	961229



Pochodna 188g. Wydajność: 70%.

HRMS ESI, (m/z): obliczono dla $\text{C}_{72}\text{H}_{93}\text{N}_{13}\text{O}_{14}\text{PCoNa}_2$ [$M+2\text{Na}$] $^{2+}$ 749.7909; otrzymano 749.7908. **UV/Vis** (H_2O), λ_{max} (nm) (ϵ , $\text{L}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): 550 (8.1×10^3), 522 (6.2×10^3), 364 (1.6×10^4), 283, 218. ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 7.69 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.19 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.15 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 7.05 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.90 (s, 1H), 6.77 (s, 1H), 6.74 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.67 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.36-6.29 (m, 1H), 6.28 (s, 1H), 6.06 (s, 1H), 5.86 (s, 1H), 4.59 (d, $J = 6.4$ Hz,

1H), 4.54-4.43 (m, 1H), 4.18 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H), 4.13 (s, 1H), 4.12-4.06 (m, 1H), 3.97-3.86 (m, 2H), 3.81-3.73 (m, 1H), 3.65-3.51 (m, 3H), 3.06 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H), 2.78-2.56 (m, 3H), 2.49-2.33 (m, 4H), 2.46 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 2.33-2.21 (m, 3H), 2.18 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.13-1.97 (m, 3H), 1.95-1.84 (m, 1H), 1.84-1.71 (m, 5H), 1.67 (s, 3H), 1.63-1.51 (m, 3H), 1.35 (s, 3H), 1.28-1.21 (m, 2H), 1.18 (s, 3H), 1.17 (s, 3H), 1.05 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H), 0.97 (s, 4H), 0.32 (s, 3H). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 177.9, 176.6, 173.7, 173.6, 173.3, 172.9, 172.7, 172.6, 172.4, 171.4, 171.0, 164.6, 163.9, 142.7, 136.8, 132.0, 131.5, 130.7, 130.4, 129.8, 127.2, 118.4, 116.9, 111.1, 105.2, 102.7, 100.0, 93.2, 85.3, 84.3, 83.3, 81.4, 81.3, 74.6, 74.3, 70.6, 69.3, 61.8, 58.3, 54.7, 53.5, 52.9, 49.9, 48.6, 47.2, 46.3, 45.4, 41.7, 41.6, 20.3, 19.90, 19.88, 19.7, 18.8, 16.5, 16.4, 15.7, 14.9. **HPLC**: t_r = 12.27 min.

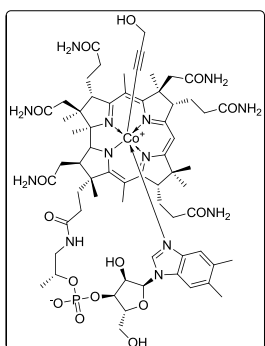


Pochodna 188h. Wydajność 71%.

HRMS ESI, (m/z): obliczono dla $C_{70}H_{94}N_{13}O_{14}PcoBr$ $[M+2H]^{2+}$

754.7631; otrzymano 754.7642. **UV/Vis** (H_2O), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot m^{-1} \cdot cm^{-1}$): 551 (4.3×10^3), 522 (4.2×10^3), 364 (1.0×10^4), 267, 213. **1H NMR** (600 MHz, $DMSO-d_6$), δ (ppm): 7.65 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.50 (s, 3H), 7.33 (s, 1H), 7.30 (s, 3H), 7.27 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.16 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 7.05 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.77 (s, 1H), 6.68 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.66 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.35 (s, 1H), 6.27 (s, 1H), 5.86 (s, 1H),

4.57 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H), 4.49 (s, 1H), 4.17 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 4.11 (s, 1H), 3.90 (bs, 2H), 3.77 (dd, $J = 5.3, 9.9$ Hz, 1H), 3.67-3.47 (m, 3H), 3.06 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 2.81-2.58 (m, 3H), 2.48-2.34 (m, 2H), 2.46 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 2.31-2.21 (m, 3H), 2.19 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.15-1.99 (m, 4H), 1.97-1.84 (m, 1H), 1.83-1.69 (m, 5H), 1.67 (s, 3H), 1.64-1.51 (m, 3H), 1.35 (s, 3H), 1.28-1.20 (m, 2H), 1.17 (s, 6H), 1.06 (d, $J = 5.3$ Hz, 3H), 0.97 (s, 4H), 0.31 (s, 3H). **^{13}C NMR** (150 MHz, $DMSO-d_6$), δ (ppm): 178.4, 177.1, 174.2, 174.0, 173.7, 173.35, 173.2, 173.1, 172.9, 171.8, 171.4, 165.0, 164.3, 143.1, 137.3, 132.6, 132.4, 131.5, 131.2, 130.2, 126.3, 118.7, 117.3, 111.5, 110.0, 105.6, 103.1, 99.4, 93.6, 85.7, 84.7, 81.7, 75.2, 74.8, 71.1, 69.7, 62.3, 58.7, 55.1, 54.0, 53.4, 50.4, 47.6, 46.7, 45.9, 42.1, 38.3, 35.7, 34.2, 32.4, 31.8, 31.6, 30.4, 27.7, 26.4, 26.0, 20.7, 20.4, 20.3, 20.2, 19.2, 16.9, 16.8, 16.1, 15.4. **HPLC:** $t_r = 12.95$ min.

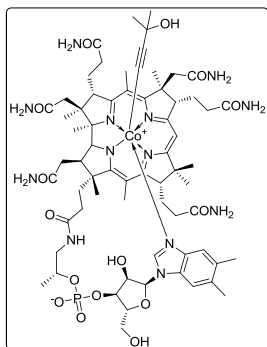


Pochodna 189b. Wydajność: 52%

HRMS ESI, (m/z): obliczono dla $C_{65}H_{91}N_{13}O_{15}PCoNa$ $[M+Na]^+$

1406.5725; otrzymano 1406.5713. **UV/Vis** (H_2O), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot m^{-1} \cdot cm^{-1}$): 547 (5.4×10^3), 522 (4.2×10^3), 367 (9.9×10^3), 269, 215. **1H NMR** (600 MHz, $DMSO-d_6$), δ (ppm): 7.58 (s, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 7.04 (s, 2H), 6.94 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 6.60 (s, 1H),

6.46 (s, 1H), 6.25 (s, 1H), 6.23 (s, 1H), 6.01 (s, 1H), 5.76 (s, 1H), 4.54-4.41 (m, 2H), 4.28 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 4.20 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H), 4.14-4.04 (m, 2H), 3.91 (s, 1H), 3.88-3.82 (m, 2H), 3.71 (s, 2H), 3.61-3.50 (m, 5H), 3.02 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 2.76-2.54 (m, 3H), 2.45-2.21 (m, 3H), 2.42 (s, 3H), 2.37 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.13-1.97 (m, 4H), 1.95-1.84 (m, 2H), 1.81-1.69 (m, 3H), 1.67 (s, 3H), 1.65-1.46 (m, 5H), 1.30 (s, 3H), 1.25-1.20 (m, 2H), 1.18 (s, 6H), 1.05 (d, $J = 5.9$ Hz, 3H), 0.98 (s, 4H), 0.25 (s, 3H). **^{13}C NMR** (150 MHz, $DMSO-d_6$), δ (ppm): 177.8, 176.6, 174.0, 173.9, 173.8, 173.6, 173.4, 173.1, 172.5, 172.1, 171.6, 164.7, 164.1, 143.1, 137.4, 132.3, 131.0, 130.2, 117.5, 111.4, 98.7, 93.3, 85.7, 84.7, 81.7, 75.0, 74.5, 71.2, 69.6, 62.2, 55.6, 54.2, 53.3, 50.7, 50.2, 47.4, 46.6, 45.8, 42.4, 42.0, 38.2, 35.7, 34.3, 32.4, 31.9, 30.4, 27.6, 26.4, 26.1, 20.7, 20.5, 20.3, 20.1, 19.5, 17.0, 16.9, 16.2, 15.5. **HPLC:** $t_r = 9.38$ min.



Pochodna 188c. Wydajność: 53%.

HRMS ESI, (m/z): obliczono dla $C_{67}H_{96}N_{13}O_{15}PCo$ $[M+H]^+$ 1412.6218;

otrzymano 1412.6202. **UV/Vis (H_2O), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot m^{-1} \cdot cm^{-1}$):** 545

(5.1×10^3), 522 (4.1×10^3), 368 (9.2×10^3), 269, 215. **1H NMR** (600 MHz,

DMSO- d_6), δ (ppm): 7.59 (s, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.49 (s,

2H), 7.31 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 7.06 (s, 1H), 7.01 (s, 1H),

6.92 (s, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.47

(s, 1H), 6.31 (s, 1H), 6.24 (s, 1H), 6.01 (s, 1H), 5.77 (s, 1H), 4.52-4.43 (m, 1H), 4.30 (d, $J = 6.5$

Hz, 1H), 4.26-4.17 (m, 2H), 4.15-4.04 (m, 1H), 3.95-3.85 (m, 2H), 3.70-3.62 (m, 1H), 3.61-3.45

(m, 3H), 3.03 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 2.78-2.56 (m, 3H), 2.47-2.33 (m, 5H), 2.44 (s, 3H), 2.38 (s,

3H), 2.31-2.22 (m, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.12-1.98 (m, 2H), 1.91-1.70 (m, 5H), 1.68 (s,

3H), 1.64-1.47 (m, 3H), 1.33 (s, 3H), 1.27-1.23 (m, 2H), 1.21 (s, 3H), 1.20 (s, 3H), 1.06 (d, $J =$

5.3, 3H), 1.01 (s, 3H), 0.99 (s, 7H), 0.27 (s, 3H). **^{13}C NMR** (150 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm):

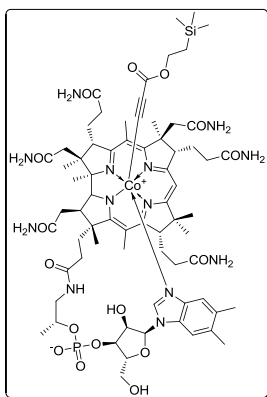
177.3, 176.0, 173.5, 173.3, 173.2, 173.0, 172.9, 172.6, 171.9, 171.6, 171.1, 164.1, 163.6, 142.6,

136.9, 131.7, 130.4, 129.8, 117.1, 110.9, 105.1, 102.5, 92.8, 85.2, 84.2, 81.3, 74.6, 74.0, 70.6,

69.2, 63.7, 61.8, 57.9, 55.0, 53.6, 52.9, 49.6, 46.9, 46.1, 45.4, 41.6, 37.7, 35.2, 33.7, 33.2, 33.1,

32.0, 31.5, 31.0, 29.9, 27.2, 25.9, 25.6, 20.3, 19.8, 19.6, 19.0, 16.5, 16.3, 15.6, 14.9. **HPLC:** $t_r =$

9.98 min.



Pochodna 188e. Wydajność: 85%.

HRMS ESI, (m/z): obliczono dla $C_{70}H_{102}N_{13}O_{16}PCoSi$ $[M+H]^+$

1498.6406, otrzymano 1498.6396. **UV/Vis (H_2O): λ_{max} (nm) (ϵ $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) =** 547

(5.3×10^3), 522 (4.3×10^3), 367 (9.6×10^3), 269, 215.

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 7.62 (s, 1H), 7.59 (s, 1H),

7.54 (s, 2H), 7.50 (s, 1H), 7.30 (s, 2H), 7.14 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 7.06

(s, 1H), 6.99 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.63 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.46 (s,

1H), 6.40-6.32 (m, 1H), 6.28 (s, 1H), 6.09 (s, 1H), 5.85 (s, 1H), 4.59 (d,

$J = 6.7$ Hz, 1H), 4.52-4.44 (m, 1H), 4.15-4.05 (m, 1H), 4.03 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H), 3.94-3.84 (m,

4H), 3.80 (dd, $J = 5.5$, $J = 9.8$ Hz, 1H), 3.66-3.48 (m, 3H), 3.08 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H), 2.76-2.57

(m, 3H), 2.48-2.35 (m, 4H), 2.47 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 2.31-1.97 (m, 5H), 2.18 (s, 3H), 2.16 (s,

3H), 1.97-1.84 (m, 1H), 1.82-1.70 (m, 4H), 1.67 (s, 3H), 1.64-1.46 (m, 6H), 1.33 (s, 3H), 1.25-

1.14 (m, 1H), 1.18 (s, 3H), 1.16 (s, 3H), 1.06 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H), 1.01 (s, 3H), 0.97-0.85 (m, 1H),

0.78-0.67 (m, 2H), 0.29 (s, 3H), -0.08 (s, 9H). **^{13}C NMR** (125 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 178.3,

177.1, 174.2, 173.4, 173.2, 172.9, 172.79, 172.7, 172.5, 171.3, 170.7, 164.9, 164.1, 151.4, 142.6,

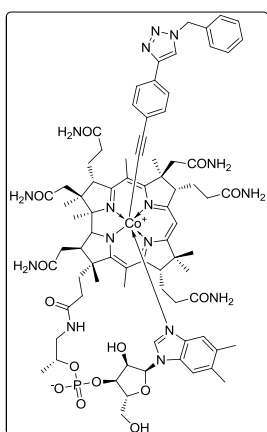
136.6, 132.1, 130.8, 129.7, 116.7, 111.2, 105.2, 102.7, 93.2, 85.3, 84.3, 81.3, 74.7, 74.3, 70.6,

69.2, 62.0, 61.7, 58.3, 54.7, 53.3, 52.9, 49.9, 47.2, 46.3, 45.4, 41.7, 37.8, 35.1, 33.7, 31.9, 31.3,

29.8, 27.1, 26.0, 25.5, 20.3, 19.9, 19.8, 19.6, 18.7, 16.4, 16.2, 15.6, 14.9, -1.5. **HPLC**: $t_r = 13.25$ min.

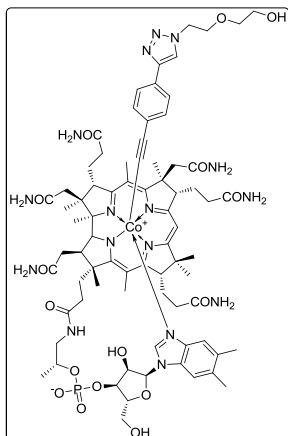
Ogólna procedura katalizowanej miedzią [1,3] dipolarnej cykloaddycji azydków do alkinu **188g**.

CuI (1.0 mg, 0.005 mmol) i TBTA (5.0 mg, 0.01 mmol) dodane zostały do mieszaniny DMF/woda (0.5 ml, 1/1 v/v). Otrzymaną zawiesinę mieszano intensywnie do uzyskania klarownego roztworu (ok. 20 min), dodano alkin **188g** (30 mg, 0.02 mmol) i odpowiedni azydek (0.03 mmol) i mieszano przez noc w temperaturze pokojowej. Mieszaninę poreakcyjną wytrącono eterem dietylowym (15ml) i odwirowano. Uzyskany osad wysuszono pod zmniejszonym ciśnieniem a następnie rozтворzono w wodzie o temperaturze ok 4 °C i odwirowano. Roztwór nad osadem zawierający surowy produkt, został nałożony na kolumnę chromatograficzną ze złożem RP i eluowany mieszaniną woda/MeOH (10-70%, v/v). Zebrane frakcje zawierające produkt odparowano, pozostałość rozтворzono w MeOH (1ml), wytrącono eterem dietylowym i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem.



Pochodna 190a. Wydajność: 75%.

HRMS ESI, (m/z): obliczono dla $C_{79}H_{101}N_{16}O_{14}PCo$ $[M+H]^+$ 1587.6753; otrzymano 1587.6737. **UV/Vis** (H_2O), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot m^{-1} \cdot cm^{-1}$): 551 (5.7×10^3), 520 (4.3×10^3), 364 (1.5×10^4), 262, 218. **1H NMR** (600 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 8.48 (s, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.39-7.27 (m, 7H), 7.25 (m, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 6.80 (s, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.24 (s, 1H), 6.06 (bs, 1H), 5.86 (s, 1H), 5.58 (s, 2H), 4.58 (bs, 2H), 4.21 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 4.13 (bs, 1H), 3.96 (bs, 1H), 3.90 (bs, 1H), 3.80-3.66 (m, 1H), 3.64-3.45 (m, 2H), 3.04 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H), 2.81-2.54 (m, 3H), 2.47-2.30 (m, 8H), 2.46 (s, 3H), 2.38 (s, 3H), 2.29-2.19 (m, 8H), 2.15 (s, 3H), 2.13-1.98 (m, 2H), 1.95-1.85 (m, 1H), 1.84-1.69 (m, 3H), 1.66 (s, 3H), 1.61-1.59 (m, 2H), 1.34 (s, 3H), 1.28-1.20 (m, 2H), 1.18 (s, 3H), 1.16 (s, 3H), 1.11-1.02 (m, 3H), 0.97 (s, 4H), 0.32 (s, 3H). **^{13}C NMR** (150 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 177.9, 176.5, 173.7, 173.6, 173.3, 172.9, 172.7, 172.6, 172.4, 171.4, 171.0, 164.6, 163.9, 146.3, 142.6, 136.8, 135.9, 132.0, 130.8, 129.8, 128.8, 128.2, 127.9, 127.7, 126.2, 124.7, 121.3, 116.9, 110.9, 109.5, 93.2, 85.3, 84.2, 81.3, 74.3, 69.2, 58.2, 54.6, 53.6, 52.9, 49.9, 47.2, 46.2, 41.8, 41.6, 37.8, 35.2, 33.8, 32.0, 31.2, 29.9, 27.2, 26.0, 25.6, 20.2, 19.9, 19.7, 18.8, 16.5, 16.4, 15.7, 14.9. **HPLC**: $t_r = 13.05$ min.



Pochodna 190b. Wydajność: 78%.

HRMS ESI, (m/z): obliczono dla $C_{76}H_{102}N_{16}O_{16}PCoNa_2$ [$M+2Na$] $^{2+}$ 793.3437; otrzymano 793.3428. **UV/Vis** (H_2O), λ_{max} (nm) (ϵ , $L \cdot m^{-1} \cdot cm^{-1}$): 550 (5.5×10^3), 522 (4.1×10^3), 364 (1.4×10^4), 262, 218. **1H NMR** (600 MHz, $DMSO-d_6$), δ (ppm): 8.42 (s, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.54 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.50 (s, 2H), 7.32 (s, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 6.81 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.76 (s, 1H), 6.65 (s, 1H), 6.50 (bs, 2H), 6.33 (s, 1H), 6.26 (s, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.86 (s, 1H), 4.65 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 4.59 (d, $J = 7.2$, 1H), 4.51 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H), 4.49-4.44 (m, 1H), 4.22 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 4.15-4.05 (m, 1H), 3.93-3.84 (m, 2H), 3.81 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 3.80-3.74 (m, 1H), 3.64-3.50 (m, 3H), 3.48-3.39 (m, 4H), 3.06 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H), 2.76-2.55 (m, 3H), 2.48-2.32 (m, 5H), 2.47 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 2.31-2.19 (m, 4H), 2.17 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.12-1.99 (m, 2H), 1.96-1.85 (m, 2H), 1.85-1.70 (m, 4H), 1.67 (s, 3H), 1.63-1.51 (m, 2H), 1.34 (s, 3H), 1.28-1.21 (m, 2H), 1.19 (s, 3H), 1.17 (s, 3H), 1.05 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H), 0.98 (s, 4H), 0.32 (s, 3H). **^{13}C NMR** (150 MHz, $DMSO-d_6$), δ (ppm): 178.3, 177.0, 174.1, 174.0, 173.8, 173.4, 173.2, 173.1, 172.8, 171.9, 171.5, 165.0, 164.3, 146.3, 143.1, 137.3, 132.4, 131.2, 131.1, 130.2, 128.3, 126.6, 125.3, 122.0, 117.4, 111.5, 110.0, 105.7, 103.2, 100.4, 93.6, 85.7, 84.7, 75.1, 74.8, 72.5, 71.1, 69.0, 65.4, 62.3, 60.5, 55.1, 54.0, 53.4, 50.4, 50.0, 47.6, 46.8, 45.9, 42.2, 38.3, 35.7, 34.2, 32.5, 32.4, 31.8, 31.6, 30.3, 27.7, 26.5, 26.0, 20.8, 20.4, 20.3, 20.2, 20.1, 19.2, 17.0, 16.9, 16.2, 15.4. **HPLC**: $t_r = 10.62$ min.

Procedura badania aktywności sGC *in vitro*.¹²¹

Roztwór zawierający TEA (25 mM), BSA (1 ng/ml), DTT (1 mM), $MgCl_2$ (4 mM), kinazę keratynową (0.05 mg/ml) i fosfokreatynę (5 mM) i oczyszczoną sGC¹²¹ (0.1 μg) inkubowano z badanym związkiem przez 10 min. w 37 °C. Do roztworu dodawano następnie roztwór GTP / $[\alpha\text{-}^{32}P]$ GTP (~150000 cpm) (całkowite stężenie GTP wynosiło 1 mM) i inkubowano przez 10 min. w 37 °C. Reakcję przerywano dodając roztwór octanu cynku (400 μl , 100mM) i węglanu sodu (500 μl , 120 mM). Osad zawierający nieprzereagowany GTP odwirowywano, roztwór nad osadem наносono na kolumnę chromatograficzną wypełnioną Al_2O_3 . Wytworzony cGMP eluowano buforem pH = 7.5 (10 ml) i umieszczano w liczniku scyntylacyjnym. Zawartość cGMP w eluencie oznaczano pomiarem emisji promieniowania Czerniakowa a wynik normalizowano względem ilości cGMP otrzymanej w reakcji kontrolnej katalizowanej czystą sGC.

6. Literatura cytowana.

1. E. R. Derbyshire, M. A. Marletta, *Annu. Rev. Biochem.*, 2012, **81**, 533-559.
2. J.-P. Stasch, P. Pacher, O. V. Evgenov, *Circulation*, 2011, **123**, 2263-2273.
3. O. V. Evgenov, P. Pacher, P. M. Schmidt, G. Hasko, H. H. H. W. Schmidt, J.-P. Stasch, *Nat Rev Drug Discov*, 2006, **5**, 755-768.
4. M. Follmann, N. Griebenow, M. G. Hahn, I. Hartung, F.-J. Mais, J. Mittendorf, M. Schäfer, H. Schirok, J.-P. Stasch, F. Stoll, A. Straub, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, **52**, 9442-9462.
5. L. J. Ignarro, K. S. Wood, M. S. Wolin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, **79**, 2870-2873.
6. L. J. Ignarro, in *Advances in Pharmacology*, ed. M. Ferid, Academic Press, 1994, vol. Volume 26, pp. 35-65.
7. I. Sharina, M. Sobolevsky, M.-F. Doursout, D. Gryko, E. Martin, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 2012, **340**, 723-732.
8. K. ó Proinsias, D. T. Gryko, Y. Hisaeda, E. Martin, J. L. Sessler, D. Gryko, *J. Med. Chem.*, 2012, **55**, 8943-8947.
9. K. ó Proinsias, M. Giedyk, I. G. Sharina, E. Martin, D. Gryko, *ACS Med. Chem. Lett.*, 2012, **3**, 476-479.
10. R. Morphy, Z. Rankovic, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 6523-6543.
11. R. Morphy, Z. Rankovic, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 4961-4970.
12. A. K. Petrus, T. J. Fairchild, R. P. Doyle, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, **48**, 1022-1028.
13. J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, *Organic Chemistry*, OUP Oxford, 2012.
14. M. B. Smith, J. March, *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, Structure*, Wiley, 2007.
15. A. Michael, *J. Prakt. Chem.*, 1893, **48**, 94-95.
16. R. Huisgen, G. Szeimies, L. Möbius, *Chem. Ber.*, 1967, **100**, 2494-2507.
17. R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1963, **2**, 565-598.
18. V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, **41**, 2596-2599.
19. C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 3057-3064.
20. L. Zhang, X. Chen, P. Xue, H. H. Y. Sun, I. D. Williams, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, G. Jia, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 15998-15999.
21. J. McNulty, K. Keskar, R. Vemula, *Chem. Eur. J.*, 2011, **17**, 14727-14730.
22. L. Hong, W. Lin, F. Zhang, R. Liu, X. Zhou, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 5589-5591.
23. X. Meng, X. Xu, T. Gao, B. Chen, *Eur. J. Org. Chem.*, 2010, 5409-5414.
24. M. Boominathan, N. Pugazhenthiran, M. Nagaraj, S. Muthusubramanian, S. Murugesan, N. Bhuvanesh, *ACS Sustainable Chem.*, 2013, DOI: 10.1021/sc400147r.
25. S. W. Kwok, J. R. Fotsing, R. J. Fraser, V. O. Rodionov, V. V. Fokin, *Org. Lett.*, 2010, **12**, 4217-4219.
26. J. C. Jewett, C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 1272-1279.
27. V. D. Bock, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Eur. J. Org. Chem.*, 2006, 51-68.
28. D. Cantillo, M. Avalos, R. Babiano, P. Cintas, J. L. Jimenez, J. C. Palacios, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 2952-2958.
29. F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **127**, 210-216.
30. J. E. Hein, V. V. Fokin, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 1302-1315.
31. B. R. Buckley, S. E. Dann, H. Heaney, *Chem. Eur. J.*, 2010, **16**, 6278-6284.
32. M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 2952-3015.
33. S. Diez-Gonzalez, *Catal. Sci. Technol.*, 2011, **1**, 166-178.
34. C. Shao, X. Wang, J. Xu, J. Zhao, Q. Zhang, Y. Hu, *J. Org. Chem.*, 2010, **75**, 7002-7005.
35. C. Shao, G. Cheng, D. Su, J. Xu, X. Wang, Y. Hu, *Adv. Synth. Cat.*, 2010, **352**, 1587-1592.
36. T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.*, 2004, **6**, 2853-2855.

37. V. O. Rodionov, S. I. Presolski, D. Díaz Díaz, V. V. Fokin, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 12705-12712.
38. W. Wang, S. Hong, A. Tran, H. Jiang, R. Triano, Y. Liu, X. Chen, P. Wu, *Chem. Asian J.*, 2011, **6**, 2796-2802.
39. V. O. Rodionov, S. I. Presolski, S. Gardinier, Y.-H. Lim, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 12696-12704.
40. S. I. Presolski, V. Hong, S.-H. Cho, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 14570-14576.
41. P. Bertrand, J. P. Gesson, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 3596-3599.
42. S. S. Gupta, J. Kuzelka, P. Singh, W. G. Lewis, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconjugate Chem.*, 2005, **16**, 1572-1579.
43. D. Wang, M. Zhao, X. Liu, Y. Chen, N. Li, B. Chen, *Org. Biomol. Chem.*, 2012, **10**, 229-231.
44. F. Pérez-Balderas, M. Ortega-Muñoz, J. Morales-Sanfrutos, F. Hernández-Mateo, F. G. Calvo-Flores, J. A. Calvo-Asín, J. Isac-García, F. Santoyo-González, *Org. Lett.*, 2003, **5**, 1951-1954.
45. S. Díez-González, A. Correa, L. Cavallo, S. P. Nolan, *Chem. Eur. J.*, 2006, **12**, 7558-7564.
46. S. Díez-González, S. P. Nolan, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, **47**, 8881-8884.
47. C. O. Kappe, E. Van der Eycken, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 1280-1290.
48. B. C. Boren, S. Narayan, L. K. Rasmussen, L. Zhang, H. Zhao, Z. Lin, G. Jia, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 8923-8930.
49. P. N. Liu, H. X. Siyang, L. Zhang, S. K. S. Tse, G. Jia, *J. Org. Chem.*, 2012, **77**, 5844-5849.
50. P. N. Liu, J. Li, F. H. Su, K. D. Ju, L. Zhang, C. Shi, H. H. Y. Sung, I. D. Williams, V. V. Fokin, Z. Lin, G. Jia, *Organometallics*, 2012, **31**, 4904-4915.
51. J. R. Johansson, P. Lincoln, B. Nordén, N. Kann, *J. Org. Chem.*, 2011, **76**, 2355-2359.
52. J. McNulty, K. Keskar, *Eur. J. Org. Chem.*, 2012, 5462-5470.
53. E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Accounts Chem. Res.*, 2011, **44**, 666-676.
54. J. Dommerholt, S. Schmidt, R. Temming, L. J. A. Hendriks, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, D. J. Lefebber, P. Friedl, F. L. van Delft, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, **49**, 9422-9425.
55. R. Kharb, P. C. Sharma, M. S. Yar, *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.*, 2011, **26**, 1-21.
56. S. G. Agalave, S. R. Maujan, V. S. Pore, *Chem. Asian J.*, 2011, **6**, 2696-2718.
57. G. C. Tron, T. Piralí, R. A. Billington, P. L. Canonico, G. Sorba, A. A. Genazzani, *Med. Res. Rev.*, 2008, **28**, 278-308.
58. P. Thirumurugan, D. Matosiuk, K. Jozwiak, *Chem. Rev.*, 2013, **113**, 4905-4979.
59. X. Li, *Chem. Asian J.*, 2011, **6**, 2606-2616.
60. V. Aragão-Leoneti, V. L. Campo, A. S. Gomes, R. A. Field, I. Carvalho, *Tetrahedron*, 2010, **66**, 9475-9492.
61. J. Hou, X. Liu, J. Shen, G. Zhao, P. G. Wang, *Expert Opin. Drug Dis.*, 2012, **7**, 489-501.
62. A. Brik, J. Muldoon, Y.-C. Lin, J. H. Elder, D. S. Goodsell, A. J. Olson, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, C.-H. Wong, *ChemBioChem*, 2003, **4**, 1246-1248.
63. M. J. Giffin, H. Heaslet, A. Brik, Y.-C. Lin, G. Cauvi, C.-H. Wong, D. E. McRee, J. H. Elder, C. D. Stout, B. E. Torbett, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 6263-6270.
64. S. Kim, M. Cho, T. Lee, S. Lee, H.-Y. Min, S. K. Lee, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2007, **17**, 4584-4587.
65. F. Reck, F. Zhou, M. Girardot, G. Kern, C. J. Eyermann, N. J. Hales, R. R. Ramsay, M. B. Gravestock, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 499-506.
66. H.-N. Shin, S. H. Seo, H. Choo, G. Kuem, K. I. Choi, G. Nam, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2013, **23**, 1193-1196.
67. L. B. Peterson, B. S. J. Blagg, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, **20**, 3957-3960.
68. J. M. Holub, K. Kirshenbaum, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 1325-1337.
69. Y. L. Angell, K. Burgess, *Chem. Soc. Rev.*, 2007, **36**, 1674-1689.

70. V. D. Bock, R. Perciaccante, T. P. Jansen, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 919-922.
71. F. Pagliai, T. Pirali, E. Del Grosso, R. Di Brisco, G. C. Tron, G. Sorba, A. A. Genazzani, *J. Med. Chem.*, 2005, **49**, 467-470.
72. Y. Zhang, Z. Lv, H. Zhong, D. Geng, M. Zhang, T. Zhang, Y. Li, K. Li, *Eur. J. Med. Chem.*, 2012, **53**, 356-363.
73. S. A. Bakunov, S. M. Bakunova, T. Wenzler, M. Ghebru, K. A. Werbovetz, R. Brun, R. R. Tidwell, *J. Med. Chem.*, 2009, **53**, 254-272.
74. P. Singh, S. Sachdeva, R. Raj, V. Kumar, M. P. Mahajan, S. Nasser, L. Vivas, J. Gut, P. J. Rosenthal, T.-S. Feng, K. Chibale, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011, **21**, 4561-4563.
75. P. Singh, R. Raj, V. Kumar, M. P. Mahajan, P. M. S. Bedi, T. Kaur, A. K. Saxena, *Eur. J. Med. Chem.*, 2012, **47**, 594-600.
76. G. R. Pettit, M. R. Rhodes, D. L. Herald, E. Hamel, J. M. Schmidt, R. K. Pettit, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 4087-4099.
77. R. Raj, P. Singh, N. T. Haberkern, R. M. Faucher, N. Patel, K. M. Land, V. Kumar, *Eur. J. Med. Chem.*, 2013, **63**, 897-906.
78. K. Kumar, P. Singh, L. Kremer, Y. Guerardel, C. Biot, V. Kumar, *Dalton T.*, 2012, **41**, 5778-5781.
79. K. Kumar, S. Carrere-Kremer, L. Kremer, Y. Guerardel, C. Biot, V. Kumar, *Dalton T.*, 2013, **42**, 1492-1500.
80. P. Singh, P. Singh, M. Kumar, J. Gut, P. J. Rosenthal, K. Kumar, V. Kumar, M. P. Mahajan, K. Bisetty, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, **22**, 57-61.
81. J. Hu, J. R. Lu, Y. Ju, *Chem. Asian J.*, 2011, **6**, 2636-2647.
82. E. Chardon, G. L. Puleo, G. Dahm, S. Fournel, G. Guichard, S. Bellemin-Laponnaz, *ChemPlusChem*, 2012, **77**, 1028-1038.
83. R. N. Hanson, E. Hua, D. Labaree, R. B. Hochberg, K. Proffitt, J. M. Essigmann, R. G. Croy, *Org. Biomol. Chem.*, 2012, **10**, 8501-8508.
84. J. Adam Hendricks, R. N. Hanson, M. Amolins, J. M. Mihelcic, B. S. Blagg, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2013, **23**, 3635-3639.
85. A. Claussner, L. Nédélec, F. Nique, D. Philibert, G. Teutsch, P. Van de Velde, *J. Steroids Biochem. Mol. Biol.*, 1992, **41**, 609-614.
86. J. A. Lenhart, X. Ling, R. Gandhi, T. L. Guo, P. M. Gerk, D. H. Brunzell, S. Zhang, *J. Med. Chem.*, 2010, **53**, 6198-6209.
87. N. S. Vatmurge, B. G. Hazra, V. S. Pore, F. Shirazi, P. S. Chavan, M. V. Deshpande, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, **18**, 2043-2047.
88. T. S. Claudiu, in *Carbonic Anhydrase*, CRC Press, 2004.
89. B. L. Wilkinson, L. F. Bornaghi, T. A. Houston, A. Innocenti, C. T. Supuran, S.-A. Poulsen, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 6539-6548.
90. B. L. Wilkinson, L. F. Bornaghi, T. A. Houston, A. Innocenti, D. Vullo, C. T. Supuran, S.-A. Poulsen, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 1651-1657.
91. J. C. Morris, J. Chiche, C. Grellier, M. Lopez, L. F. Bornaghi, A. Maresca, C. T. Supuran, J. Pouysségur, S.-A. Poulsen, *J. Med. Chem.*, 2011, **54**, 6905-6918.
92. L. Li, G. Zhang, A. Zhu, L. Zhang, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 3630-3633.
93. Q. Wan, J. Chen, G. Chen, S. J. Danishefsky, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 8244-8249.
94. H. Lin, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 13998-14003.
95. S. Hotha, S. Kashyap, *J. Org. Chem.*, 2005, **71**, 852-852.
96. K. Karthik Kumar, S. Prabu Seenivasan, V. Kumar, T. Mohan Das, *Carbohydr. Res.*, 2011, **346**, 2084-2090.
97. V. Pokrovskaya, V. Belakhov, M. Hainrichson, S. Yaron, T. Baasov, *J. Med. Chem.*, 2009, **52**, 2243-2254.
98. C. Walsh, *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*, ASM Press, 2003.
99. J. Egger, C. Weckerle, B. Cutting, O. Schwardt, S. Rabbani, K. Lemme, B. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 9820-9828.
100. K. Ley, *Trends Mol. Med.*, 2003, **9**, 263-268.

101. Y. B. Malysheva, S. Combes, D. Allegro, V. Peyrot, P. Knochel, A. E. Gavryushin, A. Y. Fedorov, *Bioorg. Med. Chem.*, 2012, **20**, 4271-4278.
102. A. Kamal, S. Prabhakar, M. Janaki Ramaiah, P. Venkat Reddy, C. Ratna Reddy, A. Mallareddy, N. Shankaraiah, T. Lakshmi Narayan Reddy, S. N. C. V. L. Pushpavalli, M. Pal-Bhadra, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, **46**, 3820-3831.
103. K. Kumar, S. Sagar, L. Esau, M. Kaur, V. Kumar, *Eur. J. Med. Chem.*, 2012, **58**, 153-159.
104. K. S. Ko, M. E. Steffey, K. R. Brandvold, M. B. Soellner, *ACS Med. Chem. Lett.*, 2013, **4**, 779-783.
105. V. Ahsen, F. Dumoulin, *J. of Porphyrins, Phthalocyanines*, 2011, **15**, 481-504.
106. R. S. Loewe, A. Ambroise, K. Muthukumar, K. Padmaja, A. B. Lysenko, G. Mathur, Q. Li, D. F. Bocian, V. Misra, J. S. Lindsey, *J. Org. Chem.*, 2003, **69**, 1453-1460.
107. J. P. Collman, M. Zhong, Z. Wang, M. Rapta, E. Rose, *Org. Lett.*, 1999, **1**, 2121-2124.
108. H. Zheng, R. McDonald, D. G. Hall, *Chem. Eur. J.*, 2010, **16**, 5454-5460.
109. M. Séverac, L. L. Pleux, A. Scarpaci, E. Blart, F. Odobel, *Tetrahedron Lett.*, 2007, **48**, 6518-6522.
110. B. J. Littler, Y. Ciringh, J. S. Lindsey, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 2864-2872.
111. F. d. C. Santos, A. C. Cunha, M. C. B. V. de Souza, A. C. Tomé, M. G. P. M. S. Neves, V. F. Ferreira, J. A. S. Cavaleiro, *Tetrahedron Lett.*, 2008, **49**, 7268-7270.
112. X. Creary, A.erson, C. Brophy, F. Crowell, Z. Funk, *J. Org. Chem.*, 2012, **77**, 8756-8761.
113. K. ó Proinsias, M. Giedyk, D. Gryko, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 6605-6619.
114. V. Y. Pavlov, *Russ. J. Org. Chem.*, 2007, **43**, 1-34.
115. M. J. Pfammatter, T. Darbre, R. Keese, *Helv. Chim. Acta*, 1998, **81**, 1105-1116.
116. H. Shimakoshi, M. Tokunaga, K. Kuroiwa, N. Kimizuka, Y. Hisaeda, *Chem. Commun.*, 2004, 50-51.
117. K. ó Proinsias, S. Kurcoń, D. Gryko, *Eur. J. Org. Chem.*, 2012, 154-159.
118. K. ó Proinsias, M. Giedyk, Ł. Banach, D. Rutkowska-Zbik, D. Gryko, *Asian J. Org. Chem.*, 2013, **2**, 504-513.
119. P. S. Shirude, V. A. Kumar, K. N. Ganesh, *Eur. J. Org. Chem.*, 2005, 5207-5215.
120. P. Sieber, *Helv. Chim. Acta*, 1977, **60**, 2711-2716.
121. E. Martin, Y.-C. Lee, F. Murad, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, **98**, 12938-12942.
122. E. Martin, I. Sharina, A. Kots, F. Murad, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, **100**, 9208-9213.
123. R. Banerjee, *Chemistry, Biochemistry of B₁₂*, Wiley, 1999.
124. Z. Schneider, A. Stroiński, *Comprehensive B₁₂: Chemistry, Biochemistry, Nutrition, Ecology, Medicine*, De Gruyter, 1987.
125. B. Kräutler, B. T. Golding, D. Arigoni, *Vitamin B₁₂ and B₁₂-Proteins*, Wiley, 2008.
126. J. Wuerges, G. Garau, S. Geremia, S. N. Fedosov, T. E. Petersen, L. Randaccio, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, **103**, 4386-4391.
127. S. M. Clardy, D. G. Allis, T. J. Fairchild, R. P. Doyle, *Expert Opin. Drug Del.*, 2011, **8**, 127-140.
128. P. M. Pathare, D. S. Wilbur, S. Heusser, E. V. Quadros, P. McLoughlin, A. C. Morgan, *Bioconjugate Chem.*, 1996, **7**, 217-232.
129. G. Russell-Jones, S. Westwood, P. Farnworth, J. Findlay, H. Burger, *Bioconjugate Chem.*, 1995, **6**, 34-42.
130. J. F. McEwan, H. S. Veitch, G. J. Russell-Jones, *Bioconjugate Chem.*, 1999, **10**, 1131-1136.
131. S. Clardy-James, J. L. Bernstein, D. J. Kerwood, R. P. Doyle, *Synlett*, 2012, **23**, 2363-2366.
132. D. Gryko, R. Loska, A. Janiga, *Journal of Porphyrins, Phthalocyanines*, 2013, **17**, 104-117.
133. K. M. McCauley, D. A. Pratt, S. R. Wilson, J. Shey, T. J. Burkey, W. A. van der Donk, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 1126-1136.

134. M. Ruetz, C. Gherasim, K. Gruber, S. Fedosov, R. Banerjee, B. Kräutler, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, **52**, 2606-2610.
135. D. A. Baldwin, E. A. Betterton, J. M. Pratt, *J. Chem. Soc. Dalton*, 1983, 225-229.
136. S. Jónsdóttir, G. Klar, *Acta Chem. Scand.*, 1997, **51**, 797-799.
137. C. B. Perry, N. Shin, M. A. Fernandes, H. M. Marques, *Dalton T.*, 2013, **42**, 7555-7561.
138. M. Ruetz, S. N. Fedosov, B. Kräutler, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, **51**, 6780-6784.
139. D. M. Corsi, N. N. Murthy, V. G. Young, K. D. Karlin, *Inorg. Chem.*, 1999, **38**, 848-858.
140. M. Ruetz, R. Salchner, K. Wurst, S. Fedosov, B. Kräutler, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, **52**, 11406-11409.
141. W. L. F. Armarego, C. Chai, *Purification of Laboratory Chemicals*, Elsevier Science, 2009.

B. Org. 355/p3



Biblioteka Instytutu Chemii Organicznej PAN

O-B.355/13



90000000186677